

Autores

Cátia L. Marques, Marta S. Rafael,
Daniel M. Tiago, M. Leonor Cancela,
Vincent Laizé *

Afiliação

Centro de Ciências do Mar, Universidade
do Algarve, Campus de Gambelas,
8005-139 Faro, Portugal

* Vincent Laizé, Centro de Ciências do Mar (CCMAR),
Universidade do Algarve, Campus de Gambelas,
8005-139 Faro, Portugal.
Tel: +351 289800900; Fax: +351 289800069;
E-mail: vlaize@ualg.pt

ARTIGO CIENTÍFICO

Desenvolvimento de sistemas celulares de peixe adequados ao estudo da mineralização *in vitro*

Sistemas celulares derivados de osso de peixe

Resumo

Os peixes foram recentemente reconhecidos como organismos modelo apropriados para o estudo da biologia de vertebrados, particularmente de processos relacionados com a mineralização tecidual e o desenvolvimento do esqueleto. Apesar de existirem alguns estudos *in vivo*, a identificação de mecanismos associados à calcificação em

peixes tem sido prejudicada pelo facto de não existirem sistemas celulares para estudos *in vitro*. Este artigo descreve um protocolo simples e de baixo custo adequado ao desenvolvimento de culturas celulares mineralogénicas, derivadas de tecidos calcificados de peixes. O protocolo aqui descrito foi aplicado com sucesso ao desenvolvimento das primeiras linhas celulares com

Abstract

Fish have been recently recognized as a suitable model organism to study vertebrate biology, in particular physiological processes such as tissue mineralization and skeletal development. Despite various studies *in vivo*, identification of mechanisms associated with calcification in fish has been largely hampered by the lack of suitable *in vitro* cell systems. We describe here a simple and inexpensive protocol to develop mineralogenic cell cultures from fish calcified tissues. This protocol was successfully used to develop the first fish cell lines capable of mineralizing their extracellular matrix (from the vertebra of gilthead seabream *Sparus aurata*) and, more recently, applied to develop additional fish mineralogenic cell cultures from different fishes. We also describe a variety of biochemical and histological methods to characterize extracellular matrix during *in vitro* mineralization, in particular mineral deposition, and a protocol to enhance DNA transfer into fish bone-derived cells. Finally, we present recent expression data obtained using these cell lines to further demonstrate their suitability to study mechanisms of *in vitro* mineralization.

Keywords

In vitro cell system, calcified tissues, gilthead seabream (*Sparus aurata* L.), mineralization.





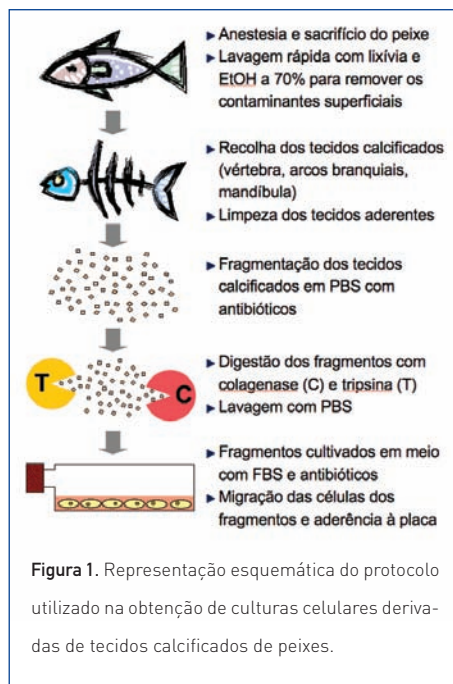
capacidade de mineralizar a sua matriz extracelular (a partir de vértebra de dourada) e, mais recentemente, ao desenvolvimento de outras culturas celulares mineralogénicas derivadas de diferentes espécies de peixes. Descrevem-se igualmente alguns métodos bioquímicos e histológicos utilizados para caracterizar a matriz extracelular durante o processo de mineralização *in vitro*, em particular para detectar a deposição de minerais, bem como um protocolo mais eficiente para introdução de DNA exógeno em linhas celulares derivadas de osso de peixe. Finalmente, apresentamos dados de expressão genética obtidos utilizando as células que aqui descrevemos, mais uma vez demonstrando a sua capacidade para estudar os mecanismos de mineralização *in vitro*.

Palavras-chave

Sistemas celulares *in vitro*, tecidos calcificados, dourada (*Sparus aurata* L.), mineralização.

Os peixes no estudo da mineralização em vertebrados

Por partilharem com os mamíferos um elevado número de características importantes, nomeadamente a composição e morfologia de órgãos e sistemas e ainda muitos mecanismos fisiológicos e bioquímicos, assim como por apresentarem várias vantagens técnicas (fertilização e desenvolvimento externos, rápido crescimento, fácil manutenção em laboratório) [1-3], os peixes tornaram-se um modelo adequado para o estudo do desenvolvimento em vertebrados, representando uma alternativa importante aos sistemas mamíferos [4, 5]. A identificação de um tipo de patologia próxima da *osteogenesis imperfecta* humana [que origina deformações severas no



esqueleto) em peixes zebra que contêm a mutação *chihuahua* (localizada no gene do colagénio I ($\alpha 1$)) [6] e a recente identificação de mutações em genes relacionados com duas síndromes humanas [7] demonstram que os peixes são modelos adequados à investigação de mecanismos que envolvam o desenvolvimento do esqueleto e a mineralização tecidular em vertebrados.

Como resultado do crescente interesse pelos peixes como modelos (peixe zebra, peixe balão Japonês, peixe balão verde, fundulo, peixe dourado, etc.), nas últimas décadas foram desenvolvidas muitas ferramentas e técnicas, incluindo sistemas celulares *in vitro*. No entanto, e apesar de estarem disponíveis várias linhas celulares, até recentemente nenhuma era derivada de osso ou cartilagem e poucas foram efectivamente caracterizadas (tendo sido a maioria desenvolvida para testes de susceptibilidade viral). Assim, continua a ser necessário o desenvolvimento de linhas celulares para o estudo do processo de mineralização em peixes.

Desenvolvimento de culturas celulares derivadas de tecidos calcificados de peixe

Actualmente, as únicas linhas celulares derivadas de tecidos calcificados de peixe foram desenvolvidas e caracterizadas no nosso la-

boratório (vértebra - VSa13 e VSa16 - e arcos branquiais - ABSa15) [8]. Todas são derivadas de dourada (*Sparus aurata* L.), um peixe teleósteeo marinho, cultivado na maioria dos países mediterrânicos e no sul de Portugal [9]. De modo a promover o desenvolvimento de novas culturas derivadas de tecidos de peixe, adequadas ao estudo dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos na formação do osso e do esqueleto, foi recentemente publicado um protocolo que descreve a preparação de culturas primárias a partir de tecidos calcificados. O protocolo, detalhado numa nota técnica por Marques e colaboradores [10] e esquematizado na figura 1, é de fácil aplicação, económico e eficiente, tendo sido aplicado com sucesso na produção de linhas celulares de dourada (células VSa13, VSa16 e ABSa15, Figura 2). A sua versatilidade permite a aplicação a outras espécies e tecidos, sendo apenas necessário o ajuste de alguns parâmetros, tais como tempos de digestão, temperatura e meio de cultura das células. Este protocolo foi também utilizado recentemente com sucesso no desenvolvimento de culturas primárias de tecidos calcificados de esturção, salmão e peixe zebra (resultados não publicados).

As referidas três linhas celulares, derivadas de tecidos calcificados de dourada, exibem um fenótipo estável e homogéneo, apresentando uma morfologia poligonal quando cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Figura 2) e comportam-se como células imortalizadas. Transformações espontâneas das células de uma cultura primária são comuns em algumas espécies [11], bem como em peixes [12, 13]. Estas linhas celulares estão bem adaptadas a meios padrão (DMEM ou meio L15) suplementados com soro de mamífero (10% de soro fetal bovino), o que diminui

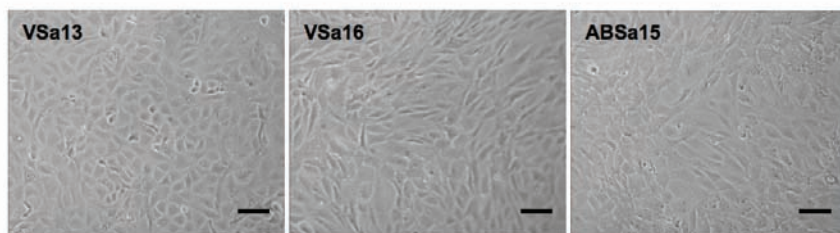


Figura 2. Micrografias de contraste de fase de células derivadas de vértebra, V Sa13 e V Sa16, e de arcos branquiais de dourada, ABSa15, cultivadas em meio DMEM suplementado com FBS (10%). A barra representa 100 μ m.

drasticamente os custos associados à manutenção de células (o soro de peixe está disponível comercialmente mas é cerca de 40 vezes mais caro) e permite uma comparação directa com estudos realizados em células de mamíferos [14-17].

Mineralização da matriz extracelular de células derivadas de tecidos calcificados

A biomineralização é o processo através do qual cristais de minerais são depositados de forma organizada nos organismos vivos [18]. Nas últimas décadas foram feitos muitos avanços no que respeita ao controlo dos processos de mineralização, no entanto ainda persistem inúmeras questões, especialmente no que se refere a este processo em organismos vertebrados. As células associadas ao osso (osteoblastos) e à cartilagem (condrócitos), são caracterizadas pela sua capacidade de produzir e depositar minerais de hidroxiapatite, compostos por cálcio e fosfato, na matriz extracelular (ECM). A indução da mineralização *in vitro* neste tipo de linhas celulares é promovida pelo suplemento do meio de cultura com uma fonte de fosfato (normalmente β -glicerofosfato numa concentração que varia entre 2 e 10 mM) e ácido ascórbico (50-100 μ g/ml). Em linhas celulares derivadas de osso de peixe, como aquelas aqui descritas, o meio de cultura é ainda suplementado com 4 mM de cloreto de cálcio. Uma possível explicação para esta necessidade baseia-se no facto do organismo dador ser um peixe marinho cujo ambiente natural é rico em cálcio (400-420 mg/L), o que o levaria a necessitar de um maior estímulo para iniciar a mineralização [8, 19]. O

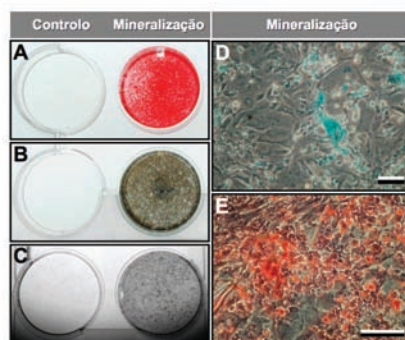


Figura 3. Micrografias de células V Sa13 cultivadas durante quatro semanas em condições controlo ou de mineralização, e respectiva detecção do nível de mineralização pelos métodos de vermelho de alizarin (A), von Kossa (B), determinação da actividade da fosfatase alcalina (C), detecção de mucopolissacarídeos e glucosaminoglicanos com azul de alcian (D), e detecção de fibras de colagénio com vermelho de sirius (E). A barra representa 100 μ m.

processo de mineralização *in vitro*, desde a diferenciação das células em cultura até à produção de minerais de hidroxiapatite, pode ser avaliado ao longo do tempo através da utilização de métodos bioquímicos e histológicos que detectam a quantidade de cálcio ou de fosfato depositado (Tabelas 1 e 2).

Adicionalmente, é também possível avaliar a presença e o papel de alguns dos marcadores moleculares determinantes para o processo de calcificação (Tabelas 1 e 2).

As células V Sa13 (bem como as V Sa16 e ABSa15) têm a capacidade de mineralizar a sua ECM quando cultivadas em condições

de mineralização (Figura 3), constituindo assim uma ferramenta importante no estudo dos mecanismos envolvidos no processo de calcificação [8]. Na figura 3 encontram-se ilustrados alguns exemplos de técnicas histológicas e bioquímicas utilizadas na análise do processo de mineralização *in vitro*, comparando com a situação controlo. Estas metodologias têm-se revelado fundamentais no estudo dos efeitos de factores externos (expressão genética alterada, xenobióticos ou fármacos, por exemplo) durante a mineralização [20, 21].

Introdução de DNA exógeno em células derivadas de tecidos calcificados

O aumento da informação genética disponível em bases de dados on-line resultante da massiva sequenciação genómica e o progresso de técnicas bioinformáticas, com a possibilidade de análises genéticas *in silico*, têm permitido atribuir possíveis funções, anteriormente desconhecidas, a inúmeros genes. É, no entanto, essencial complementar esta informação com análises funcionais, sendo na maioria dos casos necessário o uso de sistemas celulares *in vitro*.

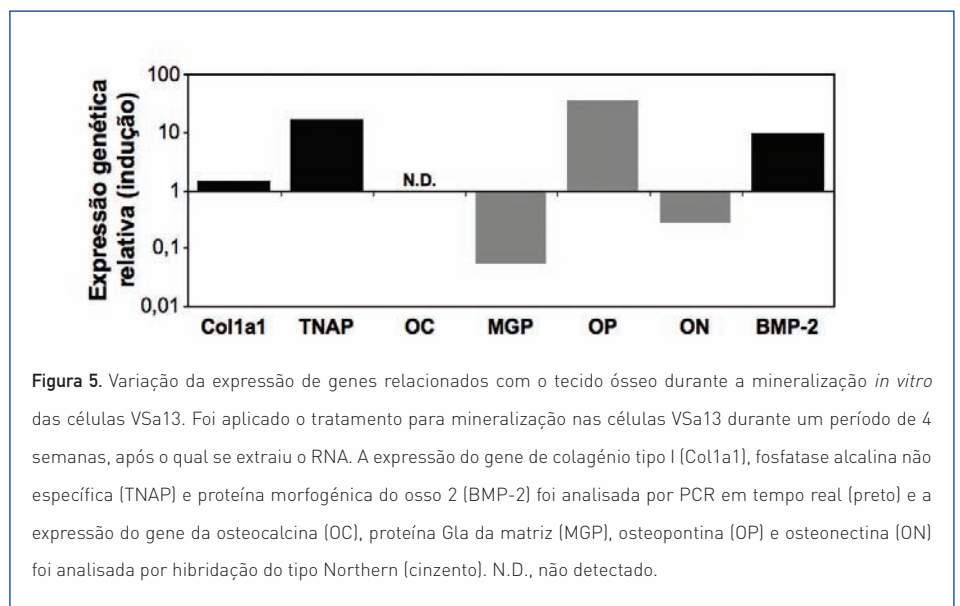
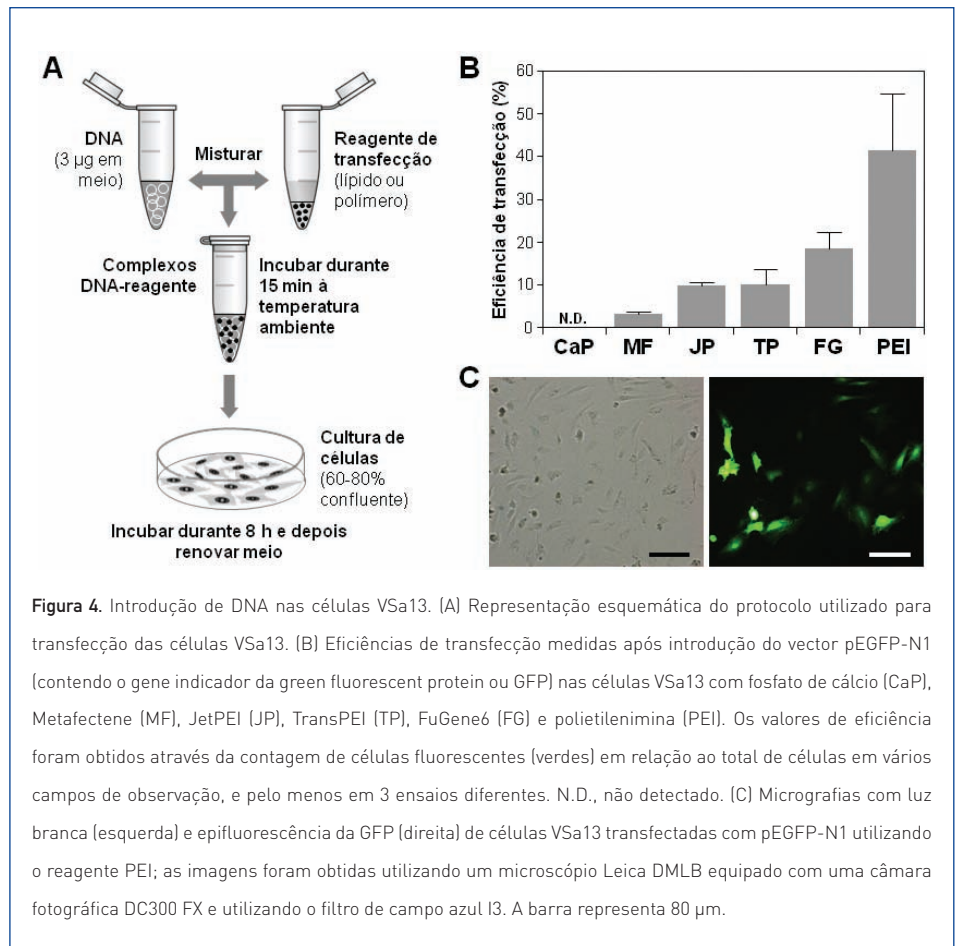
A produção de clones derivados de uma linha celular inicial, bem como estudos de genética transcripcional, são duas das aplicações das transfecções e dependem bastante da eficiente transferência de DNA em células alvo [22]. Este processo é particularmente delicado no caso das linhas celulares derivadas de osso, reconhecidas como sendo especialmente difíceis de transfectar. Existem vários métodos de transfecção e a eficiência da transfecção varia consideravelmente, consoante o tipo celular e o reagente utilizado. Alguns dos métodos de transfecção mais utilizados são:

i) físicos ou mecânicos, ii) químicos, iii) virais e iv) transfecção de base lipídica, que utiliza lipossomas ou polímeros catiónicos [23]. A abordagem lipídica é a mais amplamente estudada e uma das mais utilizadas, devido ao facto de ser uma estratégia menos tóxica e invasiva [24]. Neste método o DNA é misturado com o lípido ou polímero catiónico, formando complexos de DNA-reagente, que, durante o período de incubação com a cultura celular vão ser incorporados por via endocítica (Figura 4A). Ao contrário do que acontece em muitos sistemas estabelecidos de mamíferos, a transfecção em culturas de células como as VSa13 ou VSa16 não se encontra totalmente otimizada. Como tal, tem sido necessária a realização de vários testes, utilizando diversos reagentes de transfecção, ajustando parâmetros, como diluição ou tempo de incubação, de forma a serem alcançadas eficiências mais elevadas. Na figura 4 é possível observarem-se os resultados dessa mesma optimização realizada nas células VSa13. Dos métodos testados foi o que utiliza o PEI, polietilenimina, como reagente de transfecção, que apresentou os melhores resultados (cerca de 40% de eficiência).

Expressão genética

As células VSa13, VSa16 e ABSa15 representam um modelo adequado para estudar o processo de mineralização tecidual em vertebrados, particularmente os genes envolvidos neste processo. Nas células VSa13, a expressão de genes relacionados com o osso e a cartilagem tem sido avaliada durante o processo de mineralização *in vitro* utilizando técnicas de hibridação de tipo northern e PCR em tempo real (figura 5).

Neste sistema em particular, verifica-se uma indução, em condições de mineraliza-



ção, dos genes da fosfatase alcalina não-específica (TNAP), variante da fosfatase alcalina cuja importância para a formação óssea foi recentemente demonstrada [25], e da proteína morfogenética do osso 2 (BMP-2) [26], enquanto que nas mesmas condições os genes da proteína Gla da matriz (MGP) [8] e osteonectina [27] foram reprimidos.

A crescente utilização dos peixes como modelo de estudo dos processos bioquímicos e fisiológicos de vertebrados tornou urgente o desenvolvimento de novas ferramentas que permitam analisar a expressão genética em larga escala. Deste modo, a comunidade científica internacional, nomeadamente a comunidade europeia, reuniu recentemente

COMPILAÇÃO DOS MÉTODOS BIOQUÍMICOS UTILIZADOS PARA A CARACTERIZAÇÃO CELULAR.

MÉTODOS PROCEDIMENTO	Fosfatase alcalina (actividade)	Cálcio (quantidade)	Fosfato inorgânico (quantidade)	Proliferação celular ¹ (actividade)
Lavagem	3 × PBS	3 × PBS	3 × PBS	–
Lise celular	Triton X-100 0,1%	NaCl 0,1 M	NaCl 0,1 M	–
Substrato de detecção (temperatura)	Fosfato de p-nitrofenol (37°C)	Complexona de O-cresolphalein (TA) ²	Molibdato de amónia (TA)	MTS/PMS ³
Quantificação	Espectroscopia, 405 nm	Espectroscopia, 575 nm	Espectroscopia, 340 nm	Espectroscopia, 490 nm
Referência	Cortizo <i>et al</i> , 1995	Protocolo Sigma #587	Protocolo Sigma #360	Protocolo Promega #TB169

¹ Cell Titer 96 @ Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI)

² TA: temperatura ambiente

³ MTS: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxyphenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium, inner salt;
PMS: phenazine methosulfate



te esforços para a criação de consórcios, nomeadamente a rede de excelência Marine Genomics Europe (MGE), onde o nosso laboratório se encontra integrado. Através do MGE tem sido possível uma importante partilha de conhecimentos e o desenvolvimento de novas ferramentas genómicas, como microarrays contendo sondas para cerca de 20000 genes de dourada, disponíveis para utilização pelos vários parceiros científicos [28] e que serão brevemente

disponibilizadas para toda a comunidade internacional.

Conclusão

Os novos sistemas celulares *in vitro* recentemente desenvolvidos podem ser ferramentas moleculares importantes para análises genéticas em larga escala. A dourada, um dos peixes mais importantes na aquacultura dos países mediterrânicos e

no sul de Portugal, está a tornar-se, cada vez mais, um modelo reconhecido como adequado ao estudo do processo de calcificação e desenvolvimento do esqueleto em vertebrados, sendo uma alternativa promissora aos sistemas de mamíferos. De modo a complementar as ferramentas moleculares e celulares existentes e contribuir para o estabelecimento da dourada como modelo de estudo na mineralização do osso, o nosso laboratório e outros grupos de investigação no CCMAR estão, actualmente, a desenvolver projectos nessa área, visando estabelecer a dourada como modelo *in vivo* para estudos de mineralização tecidual e desenvolvimento do esqueleto. Técnicas histológicas, para a detecção de estruturas mineralizadas, foram já implementadas [29] e a microinjecção de embriões de dourada foi recentemente optimizada [30].

COMPILAÇÃO DOS PRINCIPAIS MÉTODOS HISTOLÓGICOS UTILIZADOS PARA CARACTERIZAÇÃO DA MINERALIZAÇÃO *IN VITRO*

MÉTODOS PROCEDIMENTO	von Kossa (Fosfato (hidroxiapatite))	Vermelho de alizarin S (Cálcio (hidroxiapatite))	Azul de alcian (Mucopolissacarídeos e glucosaminoglicanos)	Calceína ¹ (Cálcio (hidroxiapatite))	Vermelho de sirius (Colagénio total)
Lavagem 1	3 × PBS ²	3 × PBS	3 × PBS	2 × PBS	3 × PBS
Fixação (duração)	PFA 4% (1 h) ³	PFA 4% (1 h)	PFA 4% (1 h)	–	Fluído de Bouin (1 h) ⁴
Lavagem 2	3 × H ₂ O	3 × H ₂ O	3 × H ₂ O	–	1 × H ₂ O (15 min)
Deteção (duração)	Solução AgNO ₃ 5% (m/v) (20 min com luz UV)	Vermelho de alizarin S 40 mM em H ₂ O pH 4,2 (10 min)	Azul de alcian 1% em ácido acético 3% (30 min)	–	Vermelho de sirius 1 mg/ml em ácido pícrico saturado (1 h)
Lavagem 3	3 × H ₂ O	5 × H ₂ O	2 × EtOH 100%	–	5 × HCl 0,1 N
Solubilização (duração)	–	CPC 10% (15 min) ⁵	SDS 1% (10 min) ⁶	–	NaOH 0,1 N (5 min)
Quantificação	Densitometria	Espectroscopia, 562 nm	Espectroscopia, 480 nm	Fluorescência, 526 nm	Espectroscopia, 550 nm
Referência	Pombinho <i>et al</i> , 2004	Pombinho <i>et al</i> , 2004	Pombinho <i>et al</i> , 2004	Uchimura <i>et al.</i> , 2003	Tullberg-Reinert & Jundt, 1999

¹ Células cultivadas em meio suplementado com calceína (1 µg/ml de meio)

² PBS (phosphate-buffered saline): 137 mM NaCl / 2,7 mM KCl / 8,1 mM Na₂HPO₄ / 1,47 mM KH₂PO₄ / pH 7,4

³ PFA (paraformaldeído) 4% (m/v) em PBS

⁴ Fluído de Bouin: mistura de 15 ml solução saturada de ácido pícrico, 5 ml de solução de formaldeído 37% (v/v) e 1 ml de ácido acético glacial

⁵ CPC (cloreto de cetilpiridina) 10% (m/v) em fosfato de sódio 10 mM

⁶ SDS (dodecil sulfato de sódio) 1% (m/v)



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Patton, E. E. & Zon, L. I. (2001) The art and design of genetic screens: zebrafish, *Nat Rev Genet.* 2, 956-966.
2. Berghmans, S., Jette, C., Langenau, D., Hsu, K., Stewart, R., Look, T. & Kanki, J. P. (2005) Making waves in cancer research: New models in the zebrafish, *BioTechniques.* 39, 227-237.
3. McGonnell, I. M. & Fowkes, R. C. (2006) Fishing for gene function - endocrine modelling in the zebrafish, *J Endocrinol.* 189, 425-439.
4. Hightower, L. E. & Renfro, J. L. (1988) Recent applications of fish cell culture to biomedical research, *J Exp Zool.* 248, 290-302.
5. Kelly, K. A., Havrilla, C. M., Brady, T. C., Abramo, K. H. & Levin, E. D. (1998) Oxidative stress in toxicology: Established mammalian and emerging piscine model systems, *Environ Health Perspect.* 106, 375-384.
6. Fisher, S., Jagadeeswaran, P. & Halpern, M. E. (2003) Radiographic analysis of zebrafish skeletal defects, *Dev Biol.* 264, 64-76.
7. Nissen, R. M., Amsterdam, A. & Hopkins, N. (2006) A zebrafish screen for craniofacial mutants identifies *wdr68* as a highly conserved gene required for endothelin-1 expression, *Dev Biol.* 6, 28.
8. Pombinho, A. R., Laizé, V., Molha, D. M., Marques, S. M. & Cancela, M. L. (2004) Development of two bone-derived cell lines from the marine teleost *Sparus aurata*; Evidence for extracellular matrix mineralization and cell-type-specific expression of matrix Gla protein and osteocalcin, *Cell Tissue Res.* 315, 393-406.
9. Bejar, J., Borrego, J. J. & Alvarez, M. C. (1997) A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.), *Aquaculture.* 150, 143-153.
10. Marques, C. L., Rafael, M. S., Cancela, M. L. & Laizé, V. (2007) Establishment of primary cell cultures from fish calcified tissues, *Cytotechnology.* 55, 9-13.
11. Crane, M. S. (1999) Mutagenesis and cell transformation in cell culture, *Methods Cell Sci.* 21, 245-253.
12. Wolf, K. & Mann, J. A. (1980) Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fishes, *In Vitro.* 16, 168-179.
13. Fernandez, R. D., Yoshimizu, M., Kimura, T. & Ezura, Y. (1993) Establishment and characterization of seven continuous cell lines from freshwater fish, *J Aquat Anim Health.* 5, 137-147.
14. Kellermann, O., Buc-Caron, M. H., Marie, P. J., Lamblin, D. & Jacob, F. (1990) An immortalized osteogenic cell line derived from mouse teratocarcinoma is able to mineralize *in vivo* and *in vitro*, *J Cell Biol.* 110, 123-132.
15. Costa, M. A. & Fernandes, M. H. (2000) Long-term effects of parathyroid hormone, 1,25-dihydroxyvitamin d(3), and dexamethasone on the cell growth and functional activity of human osteogenic alveolar bone cell cultures, *Pharmacol Res.* 42, 345-353.
16. Fournier, B. & Price, P. A. (1991) Characterization of a new human osteosarcoma cell line OHS-4, *J Cell Biol.* 114, 577-583.
17. Stanford, C. M., Jacobson, P. A., Eanes, E. D., Lembke, L. A. & Midura, R. J. (1995) Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line, *J Biol Chem.* 270, 9420-9428.
18. Boskey, A. L. (1998) Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities, *J Cell Biochem Suppl.* 30-31, 83-91.
19. Guerreiro, P. M., Fuentes, J., Canario, A. V. & Power, D. M. (2002) Calcium balance in sea bream (*Sparus aurata*): the effect of oestradiol-17beta, *J Endocrinol.* 173, 377-385.
20. Tiago, D. M., Laizé, V., Aureliano, M. & Cancela, M. L. (2007) Vanadate effects on bone metabolism: Fish cell lines as an alternative to mammalian *in vitro* systems. in *Vanadium Biochemistry* (Aureliano, M., ed), Research Signpost, India.
21. Tiago, D. M., Laizé, V., Cancela, M. L. & Aureliano, M. (2008) Impairment of mineralization by metavanadate and decavanadate solutions in a fish bone-derived cell line, *Cell Biol Toxicol.* 24, 253-263.
22. Braga, D., Laizé, V., Tiago, D. M. & Cancela, M. L. (2006) Enhanced DNA transfer into fish bone cells using polyethylenimine, *Mol Biotechnol.* 34, 51-54.
23. Promega-Corporation. (1998) An introduction to transfection methods. In: *Promega transfection guide.* Chapter 1, 5-7.
24. Horbinski, C., Stachowiak, M. K., Higgins, D. & Finnegan, S. G. (2001) Polyethyleneimine-mediated transfection of cultured postmitotic neurons from rat sympathetic ganglia and adult human retina, *BMC Neurosci.* 2, 2.
25. Murshed, M., Harmey, D., Millan, J. L., McKee, M. D. & Karsenty, G. (2005) Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone, *Genes Dev.* 19, 1093-1104.
26. Rafael, M. S., Laizé, V. & Cancela, M. L. (2006) Identification of *Sparus aurata* bone morphogenetic protein 2: molecular cloning, gene expression and *in silico* analysis of protein conserved features in vertebrates, *Bone.* 39, 1373-1381.
27. Laizé, V., Pombinho, A. R. & Cancela, M. L. (2005) Characterization of *Sparus aurata* osteonectin cDNA and *in silico* analysis of protein conserved features: Evidence for more than one osteonectin in Salmonidae, *Biochimie.* 87, 411-420.
28. Sarropoulou, E., Kotoulas, G., Power, D. M. & Geisler, R. (2005) Gene expression profiling of gilthead sea bream during early development and detection of stress-related genes by the application of cDNA microarray technology, *Physiol. Genomics.* 23, 182-191.
29. 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, *Biotech Histochem.* 75, 79-84.
30. Beirão, J., Robles, V., Herráez, M. P., Sarasquete, C., Dinis, M. T. & Cabrita, E. (2006) Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos, *Aquaculture.* 261, 897-903.