



Desenvolvimento do olho e diferenciação da retina em peixes *Betta splendens* Regan, 1909

[Eye development and retinal differentiation in a *Betta splendens* fish Regan, 1909]

“Artigo Científico/Scientific Article”

FF Oliveira¹, FB Sá¹

¹ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (DFMA), Recife-PE, Brasil.

Resumo

Descreve-se o desenvolvimento ocular, com ênfase na retina de peixe ornamental da espécie *Betta splendens*, que apresenta um desenvolvimento extra-embriônico, favorecendo pesquisas que envolvam um melhor entendimento de sua embriologia e estudos sobre degenerações e regenerações, ontogenia e diferenciação ocorridas no olho, esta pesquisa foi realizada do período embrionário até dez dias pós eclosão. O desenvolvimento do olho esta completo quando há a eclosão do animal. Para o estudo das etapas de desenvolvimento os animais foram anestesiados em Eugenol 50ppm em água, perfundidos com Paraformaldeído a 4% em Tampão Fosfato, desidratados e embebidos em Paraplast Plus. Em seguida, confeccionados cortes histológicos com 5 e 1µm de espessura e corados com HE, PAS e método TUNEL. Como resultado foi possível observar que os olhos surgiram de evaginações do diencéfalo, formando o cálice óptico. O neuroectoderma, o mesoderma e o ectoderma da superfície estão envolvidos na formação do olho. O método TUNEL identificou processo de apoptose na retina e cristalino, comprovando que há uma redução de células durante o desenvolvimento do animal. No peixe adulto, através da histoquímica foi possível observar a morfologia e o arranjo celular dos fotorreceptores.

Palavras-chaves: desenvolvimento ocular, retina, alevino, peixe *Betta splendens*.

Abstract

The present study it aimed at to describe the ocular development, with emphasis in the retina of the *Betta splendens* fish, an ornamental fish that presents an extra-embryonic development, favoring research that involves one better agreement of its embryology and studies on degenerations and regenerations, ontogeny and differentiation occurred in the eye, this research was carried through of the embryonic period up to ten days post-eclosão. The complete development of the eye when it has the eclosion of the animal. For the study of the stages of development the animals had been anesthetized in water with Eugenol 50ppm, were fixed in a solution of 4% paraformaldehyde in phosphate buffer, dehydrated and infiltrated with Paraplast Plus. After that, confectioned sections of 1-5µm of thickness and stained with HE, PAS and staining TUNEL. As result was possible to observe that the eyes had appeared of evaginações of diencéfalo, forming the optic cup. Neuroectoderm, the mesoderm and the ectoderm of the surface are involved in the formation of the eye. The staining TUNEL identified to process of apoptotic cells in the retina and lens, proving that it has a reduction of cells during the development of the animal. In the adult fish, through the chemistry it was possible to observe the morphology and the cellular arrangement of the photoreceptors.

Key-words: ocular development, retina, alevino, fish *Betta splendens*.

Introdução

A espécie *Betta splendens* é um peixe ornamental (DUARTE, 2009), que

apresenta um desenvolvimento embriológico rápido e fora do corpo materno, permitindo um

Autor para correspondência/Corresponding author : e-mail: crleucas@yahoo.com.br

Recebido em: 27 de abril de 2012.

Aceito em: 17 de agosto de 2012.

acompanhamento do desenvolvimento de todos os órgãos e sistemas. A ontogenia é o estudo que define essa formação e organização celular e tem sido bem estudada nos peixes com essa característica de apresentar-se transparente facilitando a visualização e assim a compreensão da embriologia. Nessa espécie, o desenvolvimento do sistema visual é rápido (KIMMEL et al., 1995; DAHM, 2002), os olhos surgem de evaginações do diencéfalo entre 11 e 12 horas pós fertilização (hpf) (DAHMA, 2007). A retina é uma projeção do sistema nervoso central (SNC) que dá origem, a partir do diencéfalo à vesícula óptica (ALI e ANCTIL, 1976; DOUGLAS e DJAMGOZ, 1990). É composta pela retina neural e o epitélio pigmentar da retina (STONE, 1988; PERRON e HARRIS, 2000) e apresenta dois tipos de fotorreceptores: bastonetes e cones altamente sensíveis a detecção de luz. Os bastonetes são responsáveis pela visão noturna e os cones pela visão diurna, sendo assim mais sensível a visualização das cores.

Os fotorreceptores são neurônios altamente polarizados que convertem a informação luminosa em sinais elétricos que são enviados ao cérebro. Os cones e bastonetes apresentam três regiões distintas que são o segmento externo, preenchido por discos de membrana, segmento interno, local onde são encontradas muitas mitocôndrias por ter uma demanda energética muito grande e ser local de síntese de proteínas e a região sináptica, responsável pelas sinapses (BROCKERHOFF e FADOOL, 2011).

O epitélio pigmentar da retina (EPR) é formado por uma única camada de células que acumulam grânulos de melanina, exercendo muitas funções na retina neural entre as quais, está à fagocitose dos restos de segmentos externos e metabolização dos fotorreceptores, além da regulação, transporte (ZHAO, et al., 1997; JABLONSKI et al., 2000; STENKAMP et al., 2000; STRAUSS, 2005; DHAM, et. al, 2007). A presença de uma neurogênese contínua, associada a um

ciclo de vida rápido faz dos peixes um ótimo modelo de estudo do sistema visual por apresentar uma capacidade regenerativa das células retinianas durante toda vida do animal (OTTESON e HITCHCOCK, 2003; TSONIS e TSONIS, 2004).

Objetivou-se descrever o desenvolvimento ontogênico e a diferenciação morfológica da retina em peixes *Betta splendens* por meio de técnica histológica e histoquímica.

Material e Métodos

O estudo da embriogênese do *B. splendens*, foi realizado no Laboratório de Oftalmologia Experimental, no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, onde um casal de peixes adultos, procedentes de lojas comerciais, foi submetido ao acasalamento. Os ovos oriundos da desova foram coletados, sendo os embriões, larvas, alevinos e adultos, mantidos em aquários diferentes, de acordo com o estágio de vida. Todos os animais foram submetidos a uma temperatura entre 28 e 30°C, mantidos em ciclo circadiano, com 12/12 horas (claro/escuro), alimentados com ração comercial apropriada para cada fase do desenvolvimento.

Para obtenção dos ovos, alevinos e adultos, em cada desova de aproximadamente 500 ovos eram coletados seis ovos, que eram acompanhados durante 12 dias. Para a análise histoquímica, após a coleta dos ovos, os animais foram eutanaseados por aprofundamento do anestésico mediante imersão em Eugenol na proporção de 50 ppm dissolvidos em água (HIKASA et al., 1985). Nos animais adultos, foram realizadas perfusões com solução de soro fisiológico e fixados em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4, seguido de enucleação dos globos oculares com posterior fixação por 48h na mesma solução. Os embriões e alevinos foram fixados por completo, sem a perfusão. Em seguida, os animais foram desidratados em solução crescente de etanol e butanol,

impregnados e inclusos em Paraplast® 5µm, em micrótomo (Leica®). Posteriormente, os cortes foram corados em Hematoxilina e Eosina (H.E), Ácido Periódico de Schiff (PAS) e cobertos com meio de montagem (Entellan®).

Após serem desparafinados e rehidratados, os cortes foram submetidos a imunomarcção com anticorpos anti-tunel, usando o Kit Apoptag® Plus Peroxidase *in situ* (Chemicon, Temecula, CA), segundo protocolo do fabricante. Assim, os cortes foram imersos em uma solução de 800U/mL de Proteinase K em Tampão Fosfato Salino (PBS 0.1M, pH 7,4) por 15 minutos e incubados em uma solução contendo deoxinucleotidil transferase (TdT), e nucleotídeos, por 60 minutos a 37°C. Posteriormente, os cortes foram incubados com o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à peroxidase de rábano. O sinal foi desenvolvido utilizando o substrato de peroxidase 3-3´Diamonibenzidina (DAB). Em seguida, os cortes foram desidratados em bateria crescente de etanol e montados em meio Entellan®.

A análise da fase embrionária e alevino caracteriza uma análise morfológica fenotípica, enquanto a análise da fase adulta consiste em análise de parâmetros morfométricos como espessura e comprimento.

As lâminas foram observadas em microscópio de luz e fotomicrografadas. Os cortes do globo ocular foram observados em microscópio de luz (Olympus BX-41®) e a imagem capturada com câmera fotográfica (Canon Powershot A470) acoplada à lente ocular do microscópio. Foram realizados ajustes de cor, brilho e contrastes nas imagens obtidas e posterior análise morfológica com o auxílio do programa computacional ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

O método de análise morfométrico, consiste na caracterização de parâmetros morfométricos, obtendo-se dados quantitativos, tais como: comprimento, largura, espessura, distância. Os dados de espessura total da retina e da camada de

Plus. Os blocos foram seccionados a 1 e fotorreceptores coletados foram avaliados por análise descritiva.

Resultados e Discussão

Na observação macroscópica, como resposta a estímulo externo observou-se movimentos primitivos do animal, ainda na fase de ovo próximo ao momento da eclosão, comportamento este também observado por Duarte (2009).

De acordo com a Tabela 1, o primórdio óptico foi visualizado a partir das 16 hpf. Às 28 horas foi possível observar movimentos oculares e às 40 horas observou-se pigmentação nos olhos. A eclosão ocorreu entre 41 e 48 hpf, achados semelhantes foram encontrados por Maciel (2006). No momento da eclosão foi possível observar leve movimentação dos olhos.

Romagosa et al. (2001) observaram em larvas recém eclodidas de matrinxã (*Brycon cephalus*) olhos bem evidentes. Segundo, Nakatami et al. (2001) a eclosão em larvas de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) ocorreu 14 hpf com a presença de olhos grandes porém poucos pigmentados. O *B. splendens* assim como as larvas de matrinxã apresentaram-se após a eclosão com olhos bem evidentes e pigmentados e na histologia o EPR, formado por uma única camada de células que acumulam grânulos de melanina, foi observado nos primeiros momentos após a eclosão conforme figura 1-D. Em larvas de zebrafish, após três dias da fertilização (dpf) já foi possível observar uma resposta visual (ZHANG e LEUNG, 2010). Maciel (2006) observou que às 16 hpe, já foi possível observar pigmento nos olhos da larva de piracanjuba. O desenvolvimento precoce dos olhos que foi observado no *B. splendens* também foi observado na perca (*Perca fluviatilis*), no ser bass (*Dicentrarchus labrax*) e em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), confirmando a importância desse órgão para o animal alimentar-se e fugir do predador. De acordo com o observado na Figura 1-A as 30 hpf não é possível observar uma diferenciação

de camadas celulares da retina e que o cristalino ainda em formação esta se desprendendo do ectoderma da superfície, já na Figura 1-C de uma lâmina submetida ao método TUNEL, evidencia a presença de alguns pontos de células em processo de apoptose, na região da retina e no cristalino concordando com os achados por Bejarano-Escobar et al. (2010). A Figura 1-F mostra o animal *in vivo*, no dia da eclosão, evidenciando a pigmentação do olho, também observada por Duarte (2009). No momento da eclosão foi possível observar a presença de três tipos de células diferenciadas na retina, a camada nuclear externa (CNE), camada nuclear interna (CNI) e a camada de células ganglionares (CCG), esta última aparece como uma camada espessa em relação ao número de células que ficam no adulto desenvolvido, porém não observado um número expressivo de células em apoptose pelo procedimento TUNEL.

O EPR apresenta-se totalmente pigmentado desde o momento da eclosão em *B. splendens* conforme figura 2-A. A figura 2-B mostra o nervo óptico já característico nessa fase de eclosão saindo lateralmente diferindo dos achados em mamíferos que tem esse arranjo na região central da retina.

A análise da espessura da retina total e dos fotorreceptores em relação à retina foi realizada por análise descritiva e as medidas feitas em micrômetros (μm), presentes na tabela 2. Na retina adulta se encontram as camadas de dentro pra fora – Camada de células ganglionares (CCG), Camada plexiforme interna (CPI), Camada nuclear interna (CNI), Camada plexiforme externa (CPE), Segmento interno (SI) e Segmento externo (SE) dos fotorreceptores e Epitélio pigmentar da retina (EPR), observado na Figura 3, a A figura 4 mostra em corte transversal dos fotorreceptores o arranjo entre si dos cones simples e duplos, os mesmos achados foram encontrados por Fanta e Donatti (1999). O arranjo das células retinianas, como os fotorreceptores, neurônios de condução e associação, e

células da glia se apresentaram com espessuras diferentes para cada região do olho conforme Tabela 2. Assim a retina superior apresenta-se menor em relação à retina inferior e esta menor em relação a retina central. Quando se trata do comprimento dos fotorreceptores, medidos do EPR ao SI, a região da retina superior também aparece com espessura menor em relação à região central e inferior, sendo essas últimas com espessura semelhantes entre si, não apresentando diferença significativa entre essas regiões, esses resultados concordam com os encontrados por Fanta e Donatti (1999).

Conclusão

Conclui-se que o rápido desenvolvimento do peixe da espécie *Betta splendens* é fundamental para sua sobrevivência, tornando-o um ótimo animal para estudo embriológico e de manipulação.

Referências

- ALI, M.A., ANCTIL, M., 1976. **Retinas of Fishes: An Atlas**. Springer-Verlag, Berlin.
- BEJARANO-ESCOBAR, R. et. Al., Eye Development and Retinal Differentiation in an Altricial Fish Species, the Senegalese Sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). **Research Article Journal of Experimental Zoology (Mol. Dev. Evol.)** 314-B 580-605, 2010.
- BROKOVICH, E., BEN-ARI, T., KARK, S., KIFLAWI, M., DISHON, G., ILUZ, D., SHASHAR, N. Functional changes of the visual system of the damselfish *Dascyllus marginatus* along its bathymetric range. **Physiology & Behavior** Volume 101, Issue 4, 2 November 2010, Pages 413-421.
- DAHM AND PRESCOTT, 2002 R. DAHM AND A.R. PRESCOTT, Morphological changes and nuclear pore clustering during nuclear degradation in differentiating bovine lens fibre cells. **Ophthalmic Research** 34 (2002), pp. 288–294.
- DAHM, R., SCHNTHALERB, H. B., SOEHNC, A. S., MARLAND, J. V., VRENSENE, G. F. J. M., 2007. Development and adult morphology of the eye lens in the zebrafish. **Experimental Eye Research**. Volume 85, Issue 1, July 2007, pp. 74–89.

- DOUGLAS, R.H., DJAMGOZ, M.B.A. **Visual system of fish**. Chapman, Hall. 1990.
- DUARTE, C. S. (2009). Ontogenia inicial e consumo de vitelo em embriões de *Betta splendens*. Dissertação da Universidade Católica de Goiás 2009.
- FANTA, E. e DONATTI L. Morphology of the retina in the freshwater fish *Metynnis roosevelti* Eigenmann (Characidae, Serrasalminae) and the effects of monochromatic red light. **Revista Brasileira de Zoologia**. 16 (1): 151-173, 1999.
- JABLONSKI M. M, TOMBRAN-TINK J, MRAZEK D. A, e IANNACCONE A. Pigment epithelium-derived factor supports normal development of photoreceptor neurons and opsin expression after retinal pigment epithelium removal. **J Neurosci** 20: 7149–7157, 2000.
- KIMMEL, C. B. et. al. Stages of Embryonic Development of the zebrafish. 1995. **Developmental Dynamics** 203:253-310.
- MACIEL, C. M. R. R.,(2006) Ontogenia de Larvas de Piranjuba, *Brycon orbignyanus valenciennes* (1849) (CHARACIFORMES, CHARACIDAE, BRYCONINAE). Tese da Universidade Federal de Viçosa 2006.
- NAKATANI, K. et. al., 2001. Ovos e larvas de peixes de água doce: Desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: EDUEM, 318p.
- OTTESON, D. C. e HITCHCOCK, P. F. (2003). **Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration**. *Vision Research* 43 927–936.
- PERRON., M., E HARRIS, W. A. **Retinal stem cells in vertebrates**. *BioEssays* 22:685±688, 2000. John Wiley & Sons, Inc.
- ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y.; FENERICH-VERANI, N. 2001. Stages of embryonic development of the matrinxã, *Brycon cephalus* (Pisces characidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, 27 (1): 29-32.
- STENKAMP D. L, FREY R. A, PRABHUDESAI S. N, RAYMOND P. A. Function for Hedgehog genes in zebrafish retinal development. **Dev Biol**. 2000; 220:238–252.
- STONE, J. The origins of the cells of vertebrate retina. *Prog. Retina Res.* 7, 1–19. 1988.
- STRAUSS O. The retinal pigment epithelium in visual function. **Physiol Rev.** 2005; 85:845–881.
- TSONIS, P. A. E TSONIS D. R. 2004. Lens and retina regeneration: transdifferentiation, stem cells and clinical applications. **Experimental Eye Research** 78 161–172.
- ZHAO Q, EBERSPAECHER H, LEFEBVRE V, DE CROMBRUGGHE B. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. **Dev Dyn.** 1997; 209.377-386.