

FABIANA FELIX DE OLIVEIRA

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

Recife

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

FABIANA FELIX DE OLIVEIRA

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de MESTRE em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá

Recife

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

FABIANA FELIX DE OLIVEIRA

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

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá

Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Primeiro Examinador

---

Prof. Dr. Fábio de Souza Mendonça

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Segundo Examinador

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Juliana Pinto de Medeiros

Universidade Federal de Pernambuco

Terceiro Examinador

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá, pela confiança e oportunidade.

Aos amigos do Laboratório Elton Hugo, Fernando Lira, Maína Almeida, José Alexandre, Eulina Tereza, Taciana Pontes, Mirella Baros, Jéssica Alves, pelo companheirismo no ambiente de trabalho e ajuda durante estes dois anos de trabalho.

A Bruno Oliveira que me ensinou todas as técnicas práticas e mesmo longe continuou ajudando com dicas sempre pertinentes.

A Mirella que me ensinou a cultivar e cuidar dos peixes e que me forneceu o primeiro grupo de animais.

A Fernando Lira que sempre me acalmava e dava força quando as coisas não estavam dando certo.

As amigas do Laboratório de Histologia (Edna, Keila, Ismaela, Welma, Sandra, Fernanda, Janine), pela troca de informações e momentos de distração.

As minhas grandes amigas Soraya Farias e Kelma Souza que me apoiaram quando mais precisei.

A minha família que torceram pelo meu sucesso na realização desse trabalho, especialmente meus tios Henrique, Rosa e Vina.

A minha amada vó, Josefa Francisca (*in memória*) que me ensinou tudo que sou e pelo exemplo de amor sem medidas.

A minha mãe Josefa Maria Lima de Oliveira e a minha irmã Rosa Felix de Oliveira pela força, paciência e compreensão nos meus momentos de estresse, sempre me fazendo acreditar que tudo ia dar certo.

A José Carlos pelo apoio nos momentos iniciais deste trabalho.

A secretária da Pós-Graduação Sra. Edna Chérias pela ajuda.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da UFRPE.

Ao Programa REUNI/CAPES por conceder a bolsa de estudos.

Enfim, a DEUS que é minha fortaleza, por todas as bênçãos alcançadas e presença na minha vida.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- DPF – Dias Pós Fertilização
- DPE – Dias Pós Eclosão
- EPR – Epitélio Pigmentar da Retina
- SE – Segmento Externo
- SI – Segmento Interno
- CCF – Camada de Células Fotorreceptores
- CNE – Camada Nuclear Externa
- CNI – Camada Nuclear Interna
- CPE – Camada Plexiforme Externa
- CPI – Camada Plexiforme Interna
- CCG – Camada de Células Ganglionares
- PAS – Ácido Periódico de Shiff
- HE – Hematoxilina e Eosina
- NE – Nervo óptico
- HPF – Horas Pós Fertilização

## Sumário

### Capítulo I

1.0 – Introdução.....	7
2.0 – Revisão de Literatura.....	8
2.1 – Caracterização da espécie.....	8
2.2 – Desenvolvimento ocular em Peixes.....	9
2.2.1 – Córnea.....	9
2.2.2 – Esclera, Coróide e Íris.....	10
2.2.3 – Cristalino.....	10
2.2.4 – Retina.....	11
2.3 – Visão dos Peixes.....	15
3.0 – Referências.....	18

### Capítulo II

Título - .....	21
Resumo - .....	21
1.0 – Introdução.....	22
2.0 – Material e Métodos.....	23
2.1 – Animais (Origem e Manejo).....	23
2.2 – Coleta dos Ovos.....	24
2.3 – Procedimento Histológico.....	24
2.4 – Morfologia.....	24
2.5 – Procedimento TUNEL.....	24
3.0 – Resultado e Discussão.....	25
3.1 – Morfologia da Retina.....	25
3.2 – Morfologia da Retina de Adulto.....	28
4.0 – Referências.....	30

## CAPÍTULO I

### 1.0 - INTRODUÇÃO

O processo de ontogenia é definido como o desenvolvimento do embrião, do momento da fertilização até a eclosão e fases posteriores (FERREIRA, 2007).

O peixe *Betta splendens* apresenta um desenvolvimento embriológico rápido, fora do corpo materno, permitindo um acompanhamento do desenvolvimento de todos os órgãos e sistemas. É um peixe ornamental, muito comercializado por sua beleza, variedade de cores, rusticidade e agressividade, é uma das cinco espécies mais importadas pelos Estados Unidos (DUARTE, 2009).

Esses peixes possuem a característica de suportar bem baixos índices de oxigênio dissolvido na água, pois apresentam um mecanismo de respiração especial para utilização do ar atmosférico, que é labirinto, órgão responsável pelas trocas gasosas diretamente com o ar atmosférico, este órgão está formado no peixe com aproximadamente 20 dias de vida e permite ao sobreviver em águas com baixo ou nenhum teor de oxigênio dissolvido, facilitando dessa forma seu cultivo (SCHIMDT-NIELSEN, 2002).

Os olhos dos teleósteos se assemelham ao da maioria dos vertebrados e seu desenvolvimento resulta de vários sinais indutores, assim o neuroectoderma do prosencéfalo, o ectoderma da superfície da cabeça, o mesoderma e as células da crista neural estão envolvidas em seu desenvolvimento (MOORE e PERSAUD, 2004), que ocorre de forma rápida (KIMMEL et al., 1995; DAHM, 2002), a partir da evaginação do diencéfalo entre 11 e 12 horas pós fertilização (hpf) (DAHMA, 2007).

O *B. splendens* é um importante modelo experimental para pesquisas que envolvam qualquer tipo de manipulação de órgãos ou tecidos, estudos sobre degenerações e regenerações, ontogenia e diferenciação dos sistemas. O conhecimento das principais etapas de desenvolvimento e morfologia do olho e a associação e os intervalos de tempo em que estes ocorrem, permitem a intervenção por parte de pesquisadores nas diferentes etapas, seja através do uso de drogas, elementos físicos como a luz, temperatura ou ambiente, como pH, pressão. Assim o desenvolvimento embriológico do olho e suas características morfológicas adultas servirão de subsídios para estudos futuros.

## 2.0 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE

O peixe beta (Figura 1) é nativo do sudeste da Ásia e habita águas rasas, pobres em oxigênio, é conhecido popularmente como peixe de briga, por apresentar uma característica agressiva quando próximo a outros animais da mesma espécie (KIM, 2007). Esses peixes suportam baixos níveis de oxigênio na água, pois apresentam um mecanismo especial de respiração para utilização do ar atmosférico. O labirinto é o órgão responsável por essas trocas gasosas diretamente com o ar atmosférico, este órgão permite que o animal sobreviva em águas com baixo ou nenhum teor de oxigênio dissolvido, facilitando seu cultivo (SCHIMDT-NIELSEN, 2002). O beta foi classificado pelo ictiólogo Charles Tate Regan em 1909 e inserido no Brasil por volta de 1930. O clima tropical no Brasil favorece o seu cultivo e a reprodução dessa espécie, que é ovípara e o cuidado parental é feito pelo macho, com um tamanho de até 10cm de comprimento enquanto a fêmea alcança em média 8cm de comprimento. Esta espécie chega a dois anos de vida em média (DAMAZIO, 1991).



**Figura 1:** Macho adulto de *B. splendens* à esquerda e fêmea adulta a direita.

**Fonte:** Monari C.; Avila, M, 2012.

Classificação - Classe Osteichthyes

Subclasse Actinopterygii

Superordem Teleostei

Ordem Peciliformes

Subordem Anabantoidei

Família Osphronemidae

Subfamília Macropodinae

Gênero *Betta*

Espécie *Betta splendens* Regan, 1909. (Fishbase 2007)

## **2.2 – DESENVOLVIMENTO OCULAR EM PEIXES**

O olho é um órgão responsável pelo início do processo visual. A luz ultrapassa vários meios refrativos e transparentes para por ultimo ser traduzida em estímulo nervoso pela retina ou camada nervosa do bulbo ocular. Na maioria das espécies o olho possui forma esférica ou globosa, é compreendido por líquidos e suas paredes são formadas por uma organização trilaminar de consistência de fora para dentro: fibrosa, vascular e nervosa. Embriologicamente essas camadas são originárias do neuroectoderma oriundo do prosencéfalo, do ectoderma da superfície, mesoderma e células da crista neural (MOORE e PERSAUD, 2004; SLATTER, 2005).

### **2.2.1 - Córnea**

Dantas (1983) e Maciel (2006) descreveram que a córnea deriva-se do ectoderma da superfície e está localizada sobre a vesícula do cristalino. A lâmina própria, principal constituinte da córnea, tem a mesma origem que a esclera, a partir de células mesenquimatosas que se diferenciam. A córnea é constituída também por um epitélio pavimentoso não pigmentado, um estroma e o endotélio córneo. A córnea é continuada posteriormente pela esclera, enquanto a córnea é transparente, a esclera é opaca por possuir uma bainha externa de cartilagem hialina (YONKOS et al., 2000).

### **2.2.2 - Esclera, Coróide, Íris**

Externamente ao cálice óptico, as células mesenquimatosas se unem e concentram-se em uma região diferenciando-se internamente formando uma camada muito vascularizada a coróide e externamente a esclera, constituída de tecido conjuntivo denso. A partir do desenvolvimento, a esclera é reforçada com tecido cartilaginoso, estrutura que fornece um ponto fixo para inserção de músculos que promovem a movimentação do olho para dentro da órbita, alguns peixes possuem esclera ossificada, essa característica diferencia a esclera os teleósteos das outras classes de vertebrados (GEORGE, et al., 1998). A esclera é uma camada bastante resistente do globo ocular, protegendo-o e dando forma, contínua anteriormente pela córnea. A íris desenvolve-se da borda do cálice óptico, que cresce pra dentro e recobre parte do cristalino. O epitélio da íris representa as duas camadas do cálice óptico, é contínuo com as duas camadas do corpo ciliar e com o epitélio pigmentar da retina (MOORE e PERSAUD, 2004).

### **2.2.3 – Cristalino ou lente**

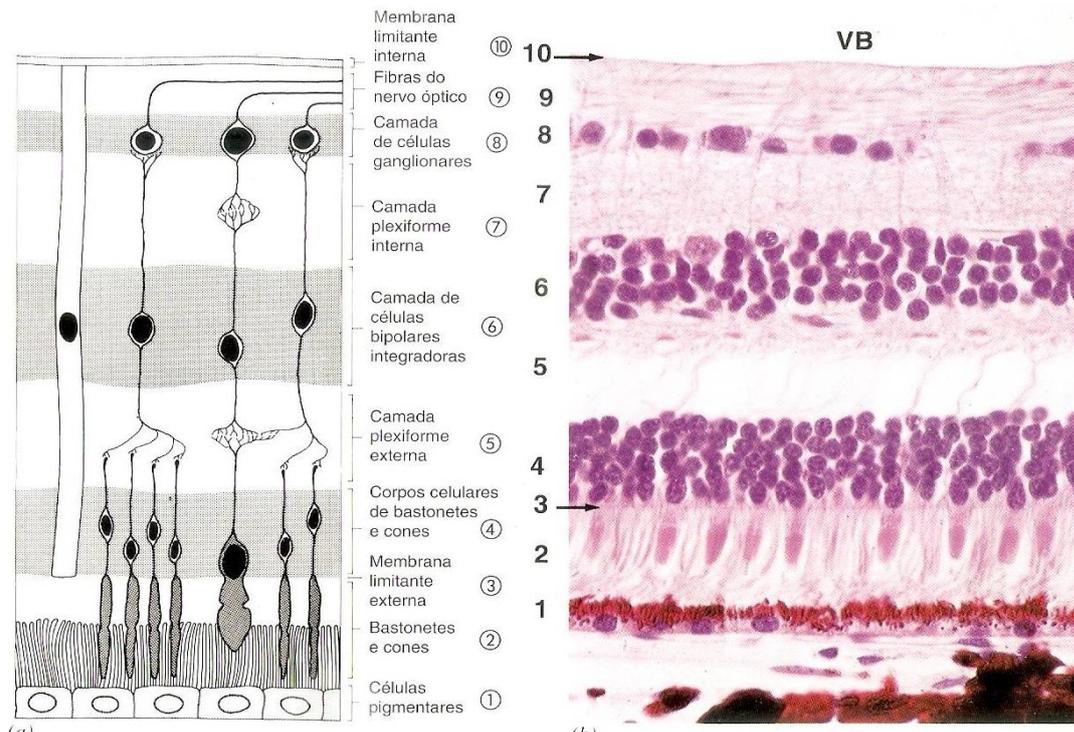
Deriva-se da vesícula do cristalino, a partir do ectoderma da superfície, formando um placóide de massa celular sólida, às 36 horas pós fertilização (hpf) em peixes paulistinhas, a lente está completamente desprendida do ectoderma da superfície. A partir deste instante o cristalino apresenta os primeiros sinais de diferenciação, enquanto a região anterior da lente é limitada por uma monocamada de células epiteliais que se estendem até a região equatorial da célula não atingindo a região posterior. A parte central consiste das fibras primárias que iniciam o alongamento das células da lente. Posteriormente há a adição de células que formarão as fibras secundárias. Nos mamíferos essas fibras se alongam de um pólo ao outro e perdem seus núcleos. A lente apresenta uma forma mais ou menos esférica. (DAHM et al., 2007, GREILING e CLARK, 2009).

#### **2.2.4 - Retina**

A retina é considerada uma extensão do sistema nervoso central e juntamente com o nervo óptico é derivada do prosencéfalo (SLATTER, 2005). Desenvolve-se a partir de uma evaginação do diencéfalo, originando o cálice óptico, uma estrutura composta por duas paredes. A parede externa formará uma camada de células cubóides preenchidas por grânulos de pigmentos, o epitélio pigmentar da retina (EPR), enquanto que a parede interna dará origem às demais estruturas da retina neural (MACHADO, 2002). O neuroepitélio retinal, consiste de células precursoras multipotentes que se diferenciam em tipos celulares específicos da retina, baseados em sinais moleculares que estão presentes nas células (STONE, 1988). A retina é constituída por duas partes uma neural e a outra formada por uma monocamada, o EPR (STONE, 1988; PERRON e HARRIS, 2000; MACHADO, 2002; SLATTER, 2005).

Histologicamente, o tecido retiniano é composto e organizado didaticamente em dez camadas (Figura 2), são elas, de fora para dentro: epitélio pigmentar da retina (EPR), camada fotorreceptora (cones e bastonetes), membrana limitante externa, camada nuclear externa (CNE), camada plexiforme externa (CPE), camada nuclear interna (CNI), camada plexiforme interna (CPI), camada de células ganglionares (CCG), camada de fibras nervosas ópticas, membrana limitante interna (SLATTER, 2005).

Na retina de todos os vertebrados há a presença de uma lâmina de células neuroepiteliais multipotentes, porém em mamíferos, as células estão presentes apenas na fase embrionária. Em peixes e anfíbios há a formação contínua de novas células na retina durante toda a vida desses animais. Essa capacidade é devida a região denominada zona marginal circunferencial (ZMC), (HOLLYFIELD, 1968; STRAZNICKY e GASE, 1971; JOHNS, 1977; BEACH e JACOBSON, 1979; REH e NAGY, 1989; WETTS, SERBEDZIJA e FRASER, 1989). A persistência dessa neurogênese contínua na retina de peixes tem sido apresentada por décadas e foi primeiramente estabelecida por quantificação de células da retina e de células em mitose nesta camada, a partir da descoberta da neurogênese muitos estudos foram realizados para entender como ocorre a substituição de uma célula da retina lesionada (MULLER, 1952; LYALL, 1957).



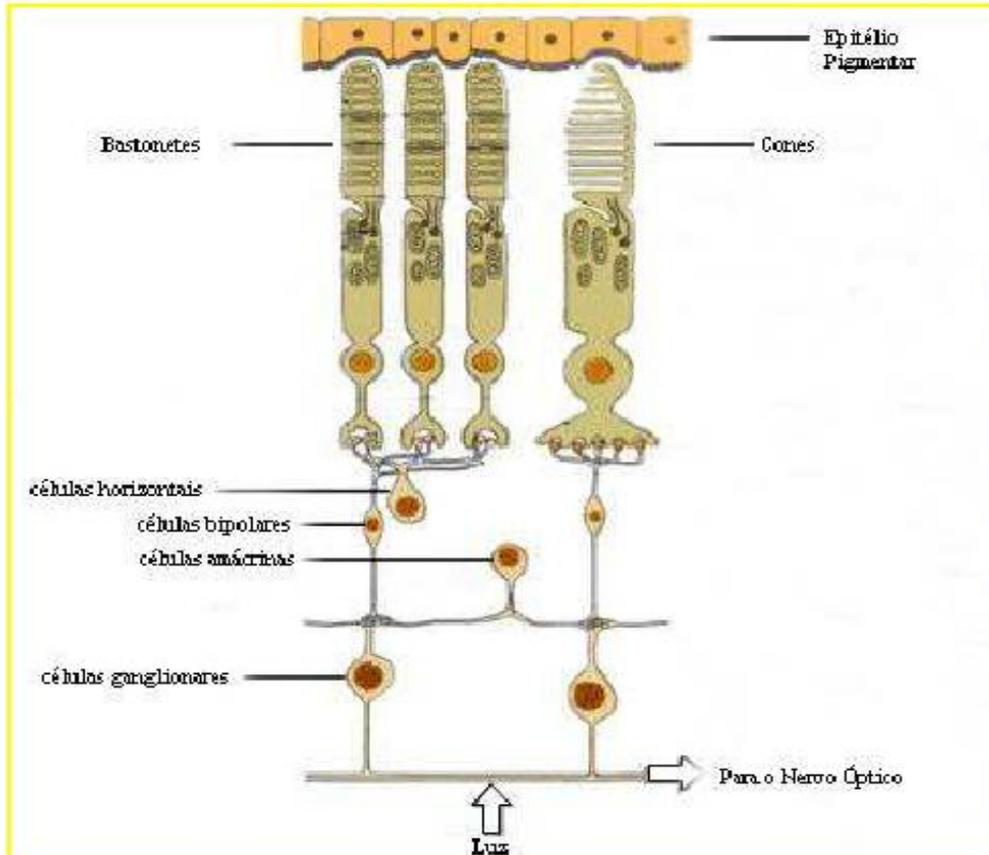
**Figura 2:** Camadas da Retina. À esquerda esquema e a direita fotomicrografia de corte transversal da retina em mamífero. Corado com H.E.

**Fonte:** Dantas (1983).

O EPR é formado por uma monocamada de células, localiza-se abaixo da retina neural, com a qual está intimamente relacionado (STRAUSS, 2005). Este desempenha funções importantes na manutenção, desenvolvimento normal dos fotorreceptores, regulação do transporte de vários íons, nutrientes e metabólitos entre o espaço subretiniano e coróide (JABLONSKI et al., 2000; STENKAMP et al., 2000; STRAUSS, 2005). Em mamíferos a disfunção do EPR implica numa série de doenças no olho, tais como a retinite pigmentosa e a degeneração macular associada à idade (GREEN, 1999; PHELAN e BOK, 2000). O EPR também atua diretamente no ciclo visual, fagocitando os restos dos segmentos externos dos fotorreceptores, ajudando desta forma a manter a homeostase da retina (SUNG e CHUANG, 2010).

Existem dois tipos básicos de células fotorreceptoras na retina, que são os cones e bastonetes, (Figura 3). Estes são células nervosas altamente especializadas na captação de luz. Apresentam, duas regiões distintas, o segmento interno que contém o núcleo, as principais organelas envolvidas no metabolismo celular, principalmente mitocôndrias e os processos sinápticos e o segmento externo que contém discos de membranas, preenchidos por pigmentos visuais. Esta região está intimamente relacionada com o

EPR (FANTA e DONATTI, 1999; SLATTER, 2005). Segundo, Yau e Hardie (2009), os pigmentos visuais presentes no segmento externo dos fotorreceptores são constituídos de um cromóforo derivado da vitamina A e por uma apoproteína denominada Opsina.



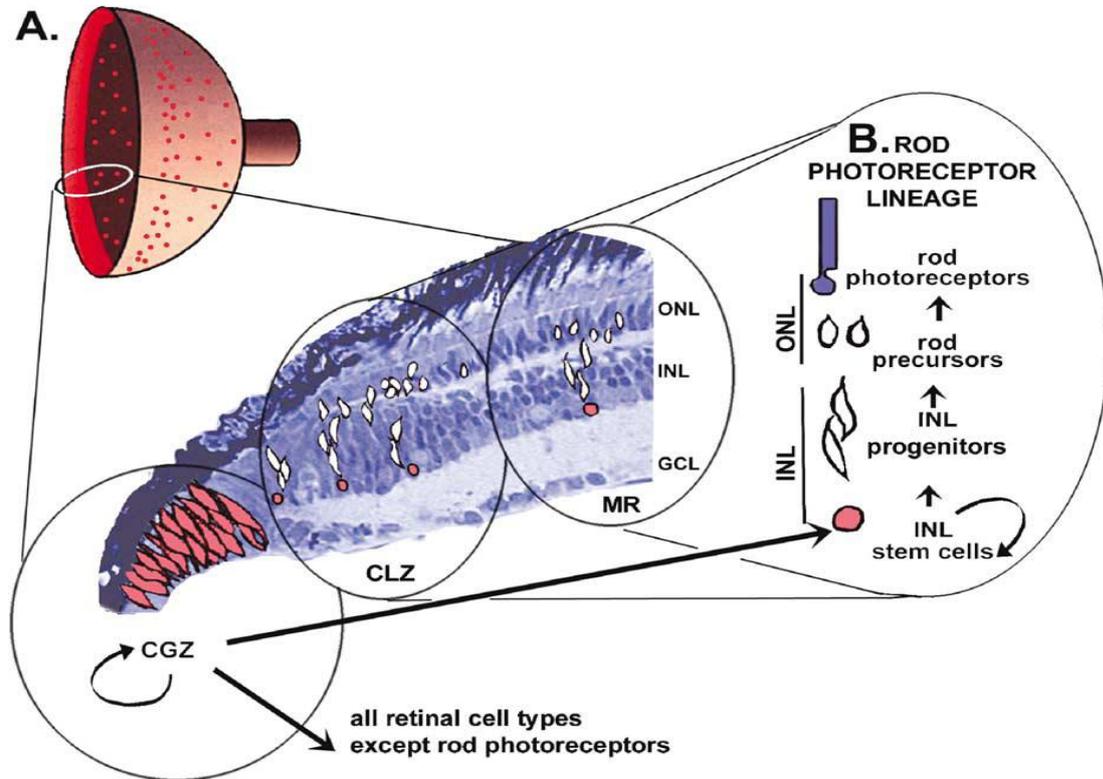
**Figura 3.** Diagrama da retina de vertebrado evidenciando as células envolvidas no processamento visual.

**Fonte:** SENSE organs-eyes (2011).

Os cones, assim chamados por sua morfologia ser cônica, são responsáveis pela visão sob iluminação intensa e pela percepção das cores, são responsáveis também pela visão detalhada observada em primatas e algumas aves. Os cones dos teleósteos são similares ao de outros vertebrados, apresentando vários subtipos, variando pela sensibilidade espectral (OTTESON e HITCHCOCK, 2003; SLATTER, 2005).

Os bastonetes estão presentes em maior proporção na retina e faz parte da visão em ocasiões de baixa luminosidade, estando dessa forma associado à percepção de movimento. Segundo Otteson e Hitchcock (2003), durante o desenvolvimento larval, na CNE contém apenas cones, não contém bastonetes, nem precursores destes. Assim,

como os mesmos autores informam, os bastonetes surgem de uma segunda neurogênese de células mitoticamente ativas localizadas na região da CNI, migrando em seguida para a CNE, onde se diferenciam em bastonetes (Figura 4).



**Figura 4:** Diagrama mostrando região da retina, zona marginal circunferencial (CGZ), local onde são encontradas as células tronco da retina.

Fonte: Otteson e Hitchcock (2003).

Já as células de Müller são responsáveis pela organização estrutural e algumas funções metabólicas da retina. A CNE é composta pelos núcleos celulares dos fotorreceptores, as células bipolares, amácrinas, horizontais e as células de Müller compõem a CNI. Na CCG são encontrados os corpos celulares destas últimas (SLATTER, 2005). As camadas plexiformes externa e interna servem de local para as sinapses. Essas duas últimas camadas diferenciam em espessura, sendo a CPI mais espessa que a CPE, característica bem evidente em peixes e presente também em outros vertebrados (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Outra estrutura é o nervo óptico que é formado a partir da camada de fibras aferentes das células ganglionares, este, localiza-se mais lateralmente em peixes em

relação à posição em mamíferos que é mais centralizado (DANTAS, 1983; SLATTER, 2005).

A membrana de Brush's foi descrita primeiramente em 1884, como uma estrutura de membrana que separa o epitélio pigmentar da retina RPE dos coriocapilares, ela tem a função de suporte e acessório como filtro entre a retina e os capilares da coróide. O transporte de nutrientes da retina é facilitado pelas fenestras da lâmina basal da membrana de Bruch's e do endotélio adjacente (DANTAS, 1983).

### **2.3 - VISÃO DOS PEIXES**

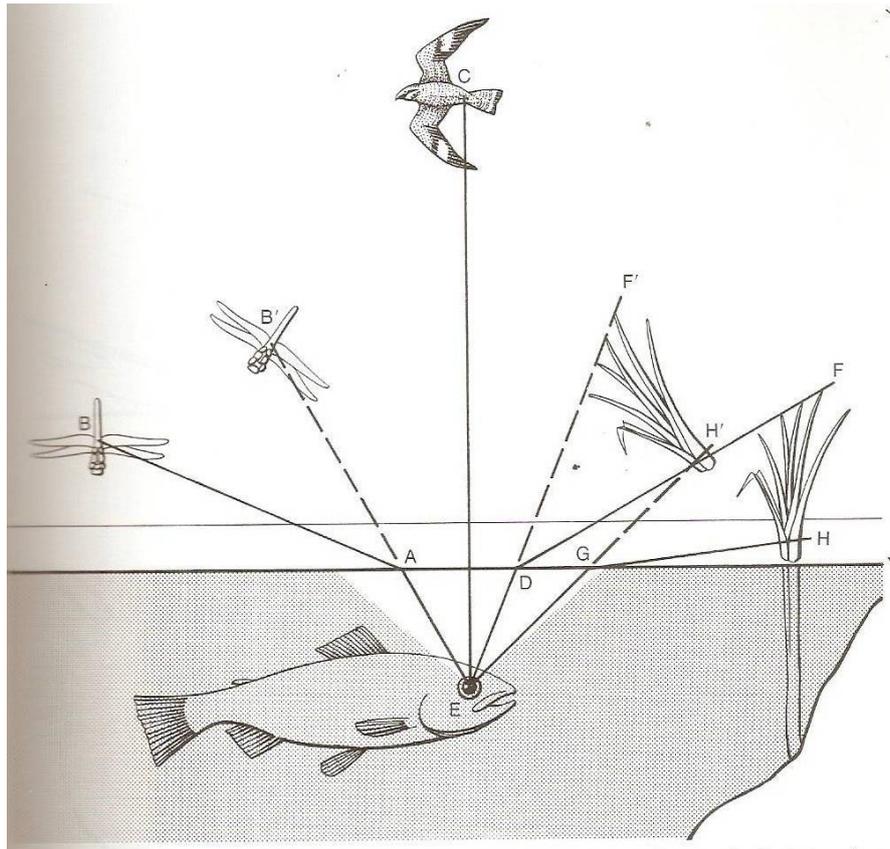
Os olhos dos peixes apresentam algumas variações se comparado aos mamíferos, uma delas é o crescimento contínuo durante toda a vida do animal, podendo ser observada a ontogenia da retina através de técnicas histológicas. Enquanto, a maioria dos teleósteos apresenta globo ocular aproximadamente esférico, alguns peixes de mares profundos submetidos a condições de luminosidade fraca apresentam olhos em forma de tubo com retina reduzida, o mesmo acontece com peixes de caverna que apresentam uma degeneração óptica. O peixe de quatro olhos enxerga com auxílio de duas córneas diferentes e áreas da retina capazes de ver simultaneamente acima e abaixo do nível do mar (AVERY e BOWMAKER, 1982).

O fenômeno da visão nos vertebrados constitui um processo de alta complexidade, sendo os olhos órgãos fotossensíveis complexos que atingiram alto nível de evolução, permitindo uma análise minuciosa quanto à forma dos objetos, sua cor e intensidade de luz refletida (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Os olhos são adaptados para funcionar no ar ou na água, durante o dia ou à noite, a curta, ou longas distâncias e em habitats que variados (HILDEBRAND e GOSLOW, 2006). A sensação visual completa ocorre devido à síntese de fatores como a sensibilidade ao movimento e a luz, campo visual, percepção visual e percepção de profundidade (SLATTER, 2005). A maioria das espécies adultas possui olhos bem desenvolvidos para detecção do predador e da presa (BROWMAN et al., 1990; HAWRYSHYN, 1997; VERA e MIGAUD, 2009).

Assim como outras espécies, os peixes apresentam olhos adaptados morfológica, funcional e evolutivamente aos diferentes tipos de comprimentos de onda da luz que

ocorrem em seus habitats naturais (FANTA e DONATTI, 1999). Uma vez que a luz proveniente da superfície da água é substancialmente mais brilhante, os peixes que vivem em profundidades rasas desenvolveram uma adaptação na córnea (Figura 4) que a faz capaz de filtrar seletivamente os raios luminosos. Um arranjo lamelar especial permite que parte da luz irradiada que chega aos olhos seja refletida e a outra parte seja absorvida para o interior do globo, sem que haja prejuízo da capacidade visual (LYTHGOE, 1976). No caso dos peixes, além de participar de maneira fundamental no processo visual, a luz é um dos fatores ambientais que influenciam direta e indiretamente seus processos vitais tais como, reprodução, desenvolvimento, migração, busca de comida, defesa territorial e detecção do predador (FANTA e DONATTI, 1999).

Além disso, animais que vivem em diferentes profundidades possuem adaptações diferentes para a detecção da luz. A eficiência alimentar de peixes que vivem em águas rasas é diretamente proporcional a quantidade de luz disponível, chegando a diminuir nas horas crepusculares. Apesar de não apresentarem diferenças anatômicas notáveis no globo ocular e retina, as espécies que vivem em profundidades maiores apresentam melhor desempenho em testes comportamentais realizados em condições de pouca luminosidade, indicando que estes animais são mais adaptados a ambientes que possuem níveis mais baixos de luminosidade (BROKOVICH et al., 2010). Todas as características descritas nesta revisão fazem do peixe um ótimo animal para estudos experimentais a respeito do conhecimento embriológico e das vantagens de usá-lo para outros estudos.



**Figura 5:** Animal em ambiente natural, evidenciando o modo de visão em relação a luz, alimentação e predador.

**Fonte:** Bond (1979).

### 3.0 – REFERÊNCIAS

A ERA DOS AQUÁRIOS. Brasil. Disponível em: [http://www.aquahobby.com/gallery/b\\_beta.php](http://www.aquahobby.com/gallery/b_beta.php). Acesso em: 09 de Março 2012.

AVERY J. A, BOWMAKER J. K. Visual pigments in the four-eyed fish, *Anableps anableps*. **Nature** 298: 62–63 (1982).

BEACH, D. H, JACOBSON, M. Patterns of cell proliferation in the retina of the clawed frog during development. **J Comp Neurol**. 183:603±613, 1979.

BOND, C. E. **Biology of fishes**.. Editora p. 321, 1979.

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.

BROWMAN, H. I., GORDON, W. C., EVANS, B. I., O'BRIEN, W. J. Correlation between histological and behavioral measures of visual acuity in zooplanktonivorous fish, the white crappie (*Pomoxis annularis*). **Brain Behav. Evol.** 35, 85–97, 1990.

DAHM AND PRESCOTT, R. DAHM AND A. R. PRESCOTT. Morphological changes and nuclear pore clustering during nuclear degradation in differentiating bovine lens fibre cells. **Ophthalmic Research** 34, pp. 288–294, 2002.

DAHM, R., SCHNTHALERB, H. B., SOEHNC, A. S., MARLAND, J. V., VRENSENE, G. F. J. M. Development and adult morphology of the eye lens in the zebrafish. **Experimental Eye Research**. Volume 85, Issue 1, July 2007, pp. 74–89.

DANTAS, A. M.. **Anatomia Funcional do Olho e Seus Anexos**. Editora Colina. Rio de Janeiro, 1983.

DUARTE, C. S. 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 *Metynniss roosevelti* Eigenmann (Characidae, Serrasalminae) and the effects of monochromatic red light. **Revista Brasileira de Zoologia**. 16 (1): 151-173, 1999.

FERREIRA, A. V. Ontogenia inicial e consumo de vitelo em malanotênia maça (*Glossolepis incisus*, weber, 1907). **Dissertação Produção Animal**, UENF. Campos do Goyatacazes, RJ. 2007.

GEORGE, L. L.; ALVES, C. E. R.; CASTRO, R. R. L. **Histologia Comparada**. 2ª Edição. São Paulo: Roca, 286p. 1998.

- GREEN W. R. Histopathology of age-related macular degeneration. **Mol Vis.** 5:27, 1999.
- GREILING, T. M. S e CLARK, J. I. Early Lens Development in the Zebrafish: A Three-Dimensional Time-Lapse Analysis. **Developmental Dynamics** 238:2254-2265, 2009.
- HAWRYSHYN, C.W. Vision, In: Evans, D. (Ed.), **The Physiology of Fishes**, second ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 345–374, 1997.
- HILDEBRAND, M., GOSLOW. **Análise da estrutura dos vertebrados**. São Paulo. Atheneu. 700 p. 2006.
- HOLLYFIELD J. G. Differential addition of cells to the retina in *Rana pipiens* tadpoles. **Dev Biol** 1968;18:163±179.
- JOHNS P. R. Growth of the adult goldfish eye. III. Source of the new retinal cells. **J Comp Neurol**,176:343±357, 1977.
- JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. Pag. 453-467. ISBN 85-277-0906-6, 2004.
- KIM, P. J. F., Efeitos do hormônio 17  $\alpha$ -metiltestosterona na masculinização do peixe *Betta splendens* Regan, 1909. **Dissertação**, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2007.
- KIMMEL, C. B. et. al. Stages of Embryonic Development of the zebrafish. **Developmental Dynamics** 203:253-310, 1995.
- LYALL, A. H.,. **The growth of the trout retina**. Q. J. Microscop. Sci. 98, 101-110, 1957a.
- LYTHGOE, J. N. **Underwater Vision**. Proc. roy. Soc. Med. Volume 69 January 1976 University of Sussex, Brighton, BNI 9QG, 1976.
- MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia Funcional**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu. p.302. ISBN 85-737-906-95, 2002.
- 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.
- MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Básica**. 6ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 375-384, 2004.
- MULLER, H. The structure and function of the guppy retina (*Libistes reticulates*). **Zoll Jahrb.abt. allg.** Zoll63, 275-324 (translated by Roswitha Lugauer) 1952.

OTTESON, D. C. e HITCHCOCK, P. F. Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration. **Vision Research** 43 927–936, 2003.

PERRON., M., E HARRIS, W. A. Retinal stem cells in vertebrates. **BioEssays** 22:685±688, 2000. John Wiley & Sons, Inc.

PHELAN JK, BOK D. A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes. **Mol Vis.** 6:116–124, 2000.

REH TA, NAGY T. Characterization of Rana germinal neuroepithelial cells in normal and regenerating retina. **Neurosci Res Suppl** 1989;10: S151±161.

SENSE organs-eyes. EUA. Disponível em: <http://www.tutorvista.com/content/biology/biology-iv/nervous-coordination/sense-organs-eyes.php>>. Acesso em: 10 jan. 2011. Figura modificada por Bruno Oliveira.

SCHMIDT-NIELSEN, K. Fisiologia Animal Adaptação e Meio Ambiente. 5 ed. Editora Santos. P. 16-27, 2002.

SUNG, C. H.; CHUANG, J. Z. The cell biology of vision. **The Journal of cell Biology**, EUA, v. 190, n. 6, p. 953-963, 2010.

SLATTER, D. **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 3. ed. São Paulo: ROCA, p. 283-338, 2005. .

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.** 85:845–881, 2005.

STRAZNICKY K, GAZE R.M. The growth of the retina in *Xenopus laevis*: an autoradiographic study. **J Embryol Exp Morphol.** 26:67±79, 1971.

VERA, L. M., MIGAUD, H. Continuous high light intensity can induce retinal degeneration in Atlantic salmon, Atlantic cod and European sea bass. **Aquaculture**, 296 150–158, 2009.

WETTS R, SERBEDZIJA GN, FRASER SE. Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina. **Dev Biol.** 136:254±263,1989.

YAU, K. W.; HARDIE, R. C. Phototransduction Motifs and Variations. **Cell**, EUA, v. 139, n. 2, p. 246-264, 2009.

## Capítulo II

Artigo Científico enviado a revista “Medicina Veterinária”

### Título

#### **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)

Fabiana F. Oliveira<sup>1</sup>, Fabrício B. Sá<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco(DMFA), Recife-PE, Brasil.

Autor para correspondência: Fabrício Bezerra de Sá, e-mail: crleucas@yahoo.com

### Resumo

O presente estudo visou descrever o desenvolvimento ocular, com ênfase na retina do *Betta splendens*, um peixe ornamental que apresenta um desenvolvimento extra-embrionário, o que favorece pesquisas que envolvam um melhor entendimento da sua embriologia e estudos relacionados ao conhecimento de degenerações e regenerações ocorridas no olho, à pesquisa foi realizada do período embrionário até dez dias pós eclosão. O desenvolvimento do olho já esta completo quando o animal eclode por ser um órgão de extrema importância para locomoção, reprodução, alimentação e defesa deste em relação ao predador. Para o estudo das etapas de desenvolvimento os animais foram anestesiados com Eugenol, sendo utilizado 50ppm em água, perfundidos com Paraformaldeido a 4% em Tampão Fosfato, desidratados e embebidos em Paraplast Plus. Foram confeccionados cortes histológicos com 5 e 1µm de espessura e corados com HE, PAS e submetidos ao 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*

## **1 – INTRODUÇÃO**

O *Betta splendens* é um peixe ornamental (DUARTE, 2009), que apresenta um desenvolvimento embriológico rápido e fora do corpo materno, permitindo um 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 a 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. Estes são altamente sensíveis a detecção de luz. Os bastonetes são os 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).

O objetivo deste trabalho foi descrever o desenvolvimento ontogênico e a diferenciação morfológica da retina em peixes *Betta splendens* por meio de técnica histológica e histoquímica.

## **2.0 – MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 – ANIMAIS – (ORIGEM E MANEJO)**

O presente estudo da embriogênese do *B. splendens*, foi realizado no Laboratório de Oftalmologia Experimental, no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal -UFRPE, onde um casal de peixes adultos, procedentes de lojas comerciais, foi submetido ao acasalamento. Os ovos oriundos da desova foram coletados para o estudo, 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 dos mesmos.

## **2.2 - COLETA DOS OVOS, ALEVINOS E ADULTOS**

Para cada desova foram obtidos aproximadamente 500 ovos dos quais foram coletados diariamente seis ovos para cada etapa do desenvolvimento durante 12(doze) dias até a fase de alevino. Foi realizada também a histologia de machos e fêmeas adultos desta espécie de peixe.

## **2.3 – PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO**

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). Para o procedimento histológico 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 48hs na mesma solução. Os embriões e alevinos foram fixados por completo, sem a perfusão. Em seguida, os animais foram desidratados em soluções crescentes de etanol e butanol, impregnados e inclusos em Paraplast® Plus. Os blocos foram seccionados a 1 e 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®). As lâminas foram observadas em microscópio de luz e fotomicrografadas.

## **2.4 – MORFOLOGIA**

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).

## **2.5 - PROCEDIMENTO TUNEL (TDT-MEDIATED DUTP NICK-END LABELING)**

Após serem desparafinados e rehidratados, os cortes foram submetidos ao procedimento 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®. Os dados de espessura total da retina e da camada de fotorreceptores coletados foram avaliados por análise descritiva.

### 3.0 – 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). Com relação à análise morfológica dos olhos foram evidenciados os achados abaixo relacionados na tabela 1.

Tabela 1. Estágios Embrionários do Desenvolvimento da Retina em *B. splendens* observado do acasalamento até a 10 dias pós eclosão.

Estágio	HPF	Características morfológicas
	0-40	Os ovos são postos pelo macho em bolhas após a fertilização e nelas ficam até eclodirem por volta de 40 a 48 hpf
	16	Ocorre o início do primórdio óptico
	17	Evidência do primórdio óptico
	28	Movimento dos olhos e cristalino
	40	Os olhos já se apresentam pigmentados e retina pré-formada
Ovo	41-48	Eclosão dos ovos
Alevino	DPE	Características morfológicas
	0	Olho pigmentado. Há presença de cromatóforos na cabeça e corpo, os olhos já se movimentam.
	1	Camadas da retina em formação, ocorrendo o processo de apoptose celular em pequena quantidade.
	6	Olho completamente formado, íris, cristalino e retina terminando sua diferenciação.

### 3.1 – MORFOLOGIA DA RETINA DO EMBRIÃO E ALEVINO

Como exposto na tabela 1, o primórdio óptico foi visualizado a partir das 16 hpf, às 28 horas já foi possível observar movimentos oculares e às 40 horas é possível observar pigmentação nos olhos. A eclosão ocorreu entre 41 e 48 HPF, achados

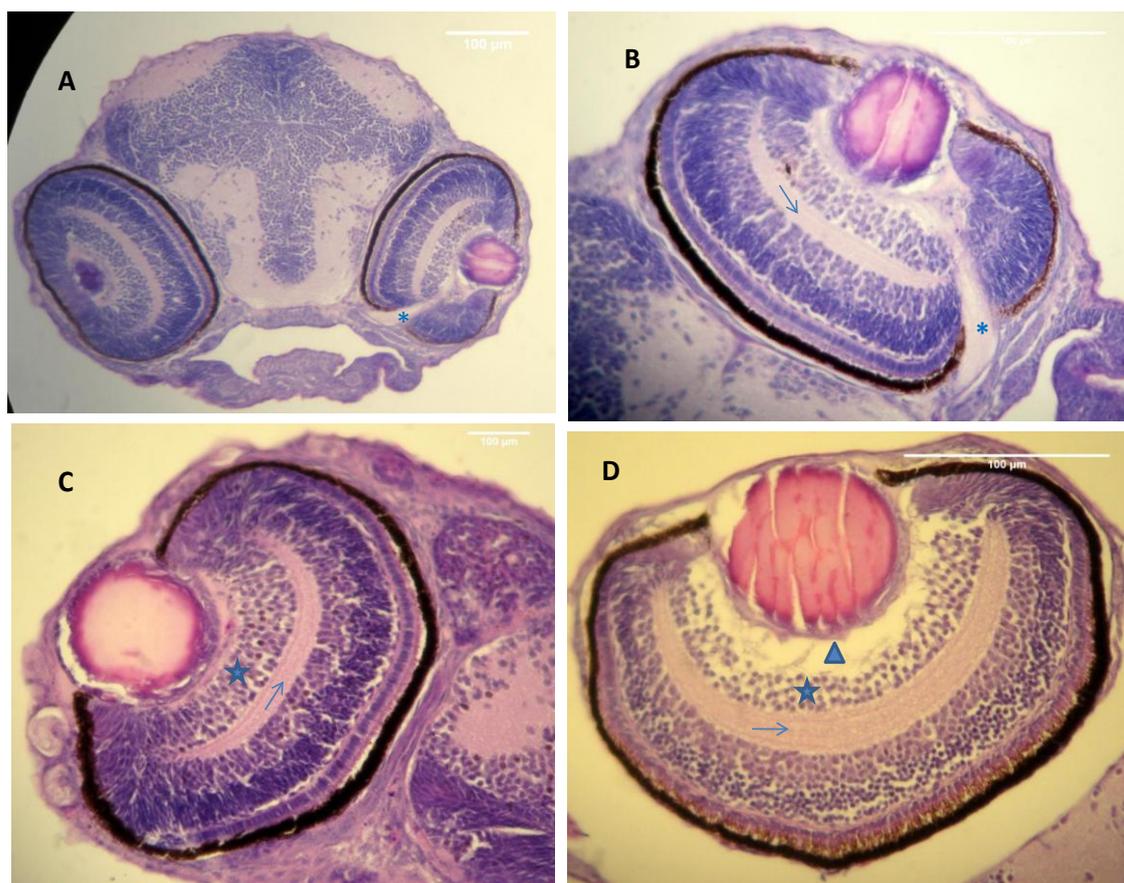
semelhantes foram encontrados por Maciel (2006). No momento da eclosão foi possível observar leve movimentação dos olhos. Enquanto Romagosa et al. (2001) observaram em larvas recém eclodidas de matrinxã (*Brycon cephalus*) olhos bem evidentes. Segundo, Nakatami et al. (2001) a eclosão em larvas de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) ocorreu 14 hpf e que estes apresentaram 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 as 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.



**Figura 1:** Fotomicrografia de embrião e alevino. Em A, corado com PAS, seta azul evidencia a ligação do cristalino com o ectoderma superficial; estrela evidencia a não diferenciação das camadas da retina. Em B, corado com HE, observa-se a formação da córnea. Em C animal de 30 hs submetido ao método TUNEL, sem contra coloração mostrando em marrom a presença de células em apoptose, na região da retina e no cristalino, cabeça de seta. As fig. D e E são de alevinos no momento da eclosão, apresentando a retina com certa diferenciação celular e em F alevino com olhos bem evidentes e pigmentados. A-C = animais com 30 hs e D-F= animais no dia da eclosão.

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.



**Figura 2:** Fotomicrografia de alevino em A e B, observa-se o percurso do nervo óptico representado pelo asterisco no momento da eclosão. Em B, C e D evidenciou-se o aumento na espessura da camada plexiforme interna (CPI) conforme seta azul, ainda em C e D que são animais com um e dois dias pós eclosão (DPE) respectivamente, pode ser observado uma diminuição na população de células na camada de células ganglionares (CCG) em relação a Fig. C, ainda em D pode ser observado o início do corpo vítreo. Coloração em HE.

### 3.2 – MORFOLOGIA DA RETINA DO ADULTO

A análise da espessura da retina total e dos fotorreceptores em relação à retina foi realizada por análise descritiva e as medida feitas em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ).

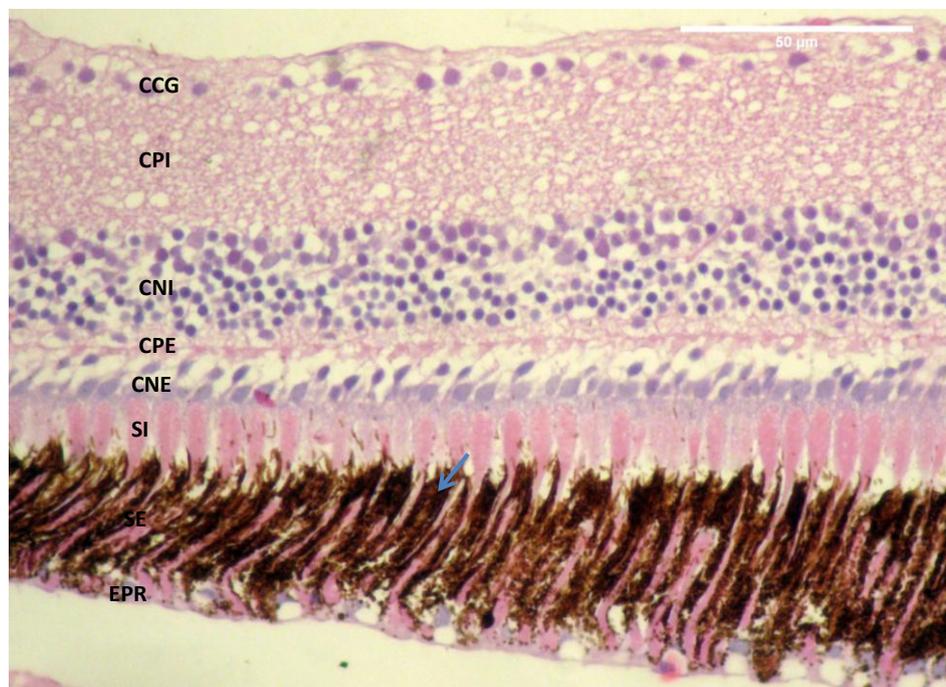
Tabela 2: Comprimento Médio da Retina Total e Comprimento dos Fotorreceptores em relação à Retina Total em *B. splendens* adulto.

COMPRIMENTO MÉDIO DOS FOTORRECEPTORES ( $\mu\text{m}$ )			COMPRIMENTO MÉDIO DA RETINA TOTAL ( $\mu\text{m}$ )		
SUPERIOR	CENTRAL	INFERIOR	SUPERIOR	CENTRAL	INFERIOR
53,082	57,45	57,12	143,76	162,99	149,45

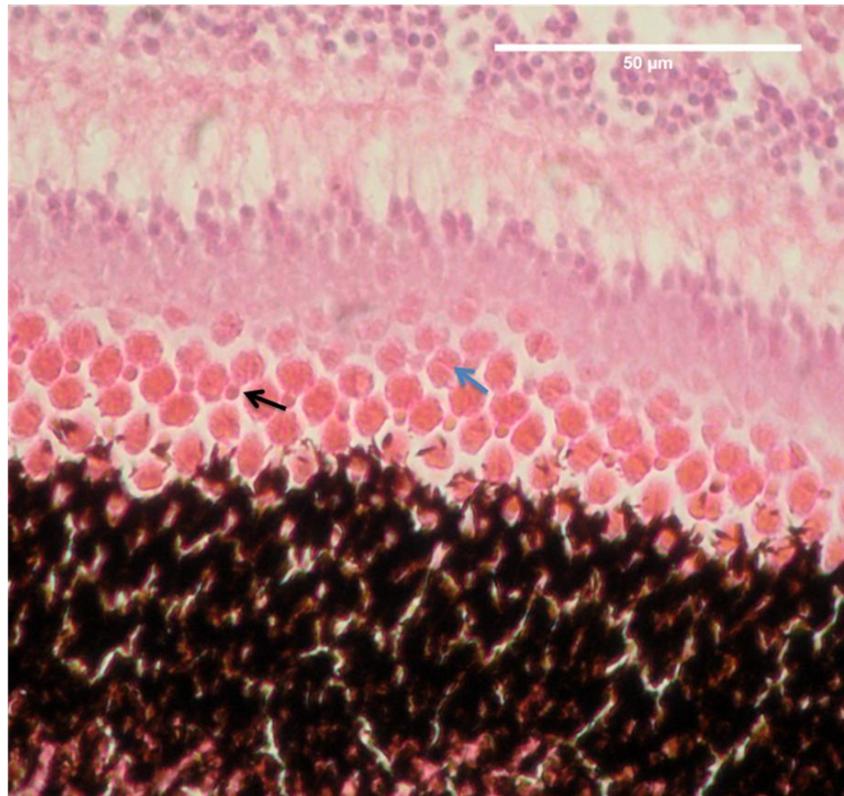
Os valores foram expressos em média ( $n=10$ ), sendo avaliadas dez áreas de  $100\mu\text{m}$  distintas e distribuídas da seguinte forma: 3 da retina superior, 3 da retina inferior e 4 da retina central.

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, apresentam-se 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).

Assim pode-se concluir que o rápido desenvolvimento da espécie é fundamental para sua sobrevivência e que é um ótimo animal para estudo embriológico e de manipulação.



**Figura 3:** Fotomicrografia da retina em corte transversal evidenciando suas camadas. Seta azul mostra a íntima relação entre o EPR e SE dos fotorreceptores. HE.



**Figura 4:** Fotomicrografia de corte transversal dos fotorreceptores evidenciando cones simples (seta preta) e cones duplos (seta azul).HE

#### 4.0 – 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 Pirançajuba, *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.