

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

STÉPHANIE INGRAND VIEIRA DE ARAÚJO

**Análise do Eletrorretinograma de campo total e histologia da retina do peixe
Oscar (*Astronotus ocellatus* - Agassiz, 1831)**

**Recife
2021**

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

STÉPHANIE INGRAND VIEIRA DE ARAÚJO

**Análise do Eletrorretinograma de campo total e histologia da retina do peixe
Oscar (*Astronotus ocellatus* - Agassiz, 1831)**

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Área de Concentração:
Morfofisiologia, Sanidade Animal e Ambiental

Orientador: Fabrício Bezerra de Sá

**Recife
2021**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Análise do Eletrorretinograma de campo total e histologia da retina do peixe
Oscar (*Astronotus ocellatus* - Agassiz, 1831)

Defesa da Dissertação de Mestrado elaborado por
STÉPHANIE INGRAND VIEIRA DE ARAÚJO

Aprovada ____ / ____ / ____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá
Orientador – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Prof. Dr. Breno Bezerra Aragão
Departamento de Medicina Veterinária – UFPI

Dr. Robério Silveira de Siqueira Filho
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação Universidade Federal
Rural de Pernambuco Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- V658a Araújo, Stéphanie Ingrand Vieira de
 Análise do Eletrorretinograma de campo total e histologia da retina do peixe Oscar (*Astronotus ocellatus*
- Agassiz, 1831) / Stéphanie Ingrand Vieira de Araújo. - 2021.
 67 f. : il.
- Orientador: Fabricio Bezerra de Sa.
 Inclui referências e anexo(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2021.
1. Eletrofisiologia visual. 2. Histomorfometria. 3. modelo experimental. 4. eletrorretinografia. 5. histologia.
I. Sa, Fabricio Bezerra de, orient. II. Título

CDD 636.089

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste ciclo, que por muitas vezes pensei estar em um looping eterno, pessoas como meu companheiro Bruno, que me apoiaram e me deram forças para seguir em frente.

Ao meu estimado professor e orientador Fabrício de Sá, que fiz perder os nervos, mas nunca desistiu de mim e do projeto que concluímos.

A toda a equipe do LOE, em especial a Thais Andrade, minha fiel escudeira, que foi meus braços e pernas durante esse caminho. Bruno Paiva, que se mostrou um grande parceiro e orientador nessa fase final, tão longa.

A UFRPE e CNPQ pela disponibilização da estrutura e apoio.

RESUMO

Os peixes vem sendo cada vez mais usados como modelos experimentais nas mais diversas áreas, devido a similaridades estruturais e celulares, capacidade de regenerar tecidos e possuir fácil manejo. O *Astronotus ocellatus* é um ciclídeo que vive em ambientes claros de água calma e rasa, alimentando-se de crustáceos, moluscos e peixes menores. Seu ecossistema condiz com sua complexa estrutura visual. Espécime promissora para estudos clínicos e experimentais da visão. A eletrorretinografia (ERG) é um método não invasivo que, através de eletrodos, capta a atividade elétrica da retina quando estimulada por luz. Aliada a ele, a análise histológica da retina e descrição morfométrica de cada camada, confere embasamento estrutural sobre as células analisadas no exame. Foram utilizados dois grupos, o primeiro com 16 peixes, para as análises eletrofisiológicas e outro com 3 peixes para histomorfometria. O ERG foi realizado com o peixe sob anestesia geral com lidocaína 10% (5µg/ml) e propofol 1% (50 µg/ml) e registros com frequência de 2Hz e 30Hz com led de luz branca com intensidade de 3cds/m². Quatro peixes realizaram registros a respostas multifrequenciais, estímulos com frequência de 2 Hz e comprimento de onda que variaram do ultravioleta ao infravermelho. Para a histomorfometria, os peixes foram eutanasiados, seus olhos enucleados, fixados em solução de Davidson, corados com Hematoxilina e Eosina e, alguns, despigmentados com permanganato de potássio e ácido oxálico para visualização dos segmentos externos dos fotorreceptores, recobertos pela melanina presente nas vilosidades do epitélio pigmentar. Nos resultados da ERG foi possível a obtenção dos principais componentes, onda A e B. Os traçados obtidos com os estímulos multifrequenciais mostraram maior variação nas respostas ao ultravioleta e não se obteve registros ao estímulo infravermelho. Na Histomorfometria a espessura da retina total foi de 178,78 ± 21,03µm. Os presentes estudos demonstraram um protocolo simples e rápido de obtenção de respostas retinianas em *Astronotus ocellatus* anestesiados, permitindo a recuperação de todos os animais após os exames e a descrição e análise histológica da retina e estruturas associadas a ela.

Palavras chaves: Eletrofisiologia visual, Histomorfometria, modelo experimental, Oftalmologia veterinária.

ABSTRACT

Fish have been increasingly used as experimental models in the most diverse areas, due to structural and cellular similarities, ability to regenerate tissues and easy handling. *Astronotus ocellatus* is a cichlid that lives in clear environments of calm, shallow water, feeding on crustaceans, molluscs and smaller fish. Its ecosystem matches its complex visual structure. Promising specimen for clinical and experimental studies of vision. Electroretinography (ERG) is a non-invasive method that, through electrodes, captures the electrical activity of the retina when stimulated by light. Allied to it, the histological analysis of the retina and the morphometric description of each layer provides a structural basis for the cells analyzed in the exam. Two groups were used, the first with 16 fish, for the electrophysiological analysis and the other with 3 fish for histomorphometry. The ERG was performed with the fish under general anesthesia with 10% lidocaine (5µg/ml) and 1% propofol (50 µg/ml) and recordings with a frequency of 2Hz and 30Hz with a white light LED with an intensity of 3cds/m². Four fish recorded multifrequency responses, stimuli with a frequency of 2 Hz and wavelength ranging from ultraviolet to infrared. For histomorphometry, the fish were euthanized, their eyes enucleated, fixed in Davidson's solution, stained with Hematoxylin and Eosin, and some depigmented with potassium permanganate and oxalic acid to visualize the outer segments of the photoreceptors, covered by the melanin present in the villi of the pigment epithelium. In the ERG results, it was possible to obtain the main components, waves A and B. The tracings obtained with the multifrequency stimuli showed greater variation in the responses to ultraviolet and no records were obtained to the infrared stimulus. In Histomorphometry, the total retinal thickness was 187.55±21µm. The present studies demonstrated a simple and fast protocol for obtaining retinal responses in anesthetized *Astronotus ocellatus*, allowing the recovery of all animals after examinations and the description and histological analysis of the retina and its associated structures.

Key words: Visual electrophysiology, Histomorphometry, experimental model, Veterinary ophthalmology.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	11
2 – REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Peixe como Modelo Experimental.....	13
2.2 – Oscar (<i>Astronotus ocellatus</i>) Agassiz, 1831	13
2.3 Anatomia ocular do Peixe.....	15
2.3.1 Globo Ocular e Anexos	15
2.3.2 Túnica fibrosa	16
2.3.3 Túnica Vascular.....	16
2.3.4 Lente.....	17
2.3.5 Vítreo.....	18
2.3.6 Túnica Nervosa	18
2.4 Visão em Peixes.....	23
2.5 Eletrorretinografia.....	24
2.6 Anestesia em Peixes	26
3 - OBJETIVO.....	29
4 - REFERÊNCIAS.....	30
5 – ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	36
ANEXO.....	66
1 - Licença CEUA.....	66
2- Licença SISGEN	67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

bar- barra de escala
CD – central dorsal
CCV – Camada de células visuais
CNE – Camada nuclear externa
CPE – Camada plexiforme externa
CNI – Camada nuclear interna
CPI – Camada plexiforme interna
CCG- Camada de células ganglionares
CFN- Camada de Fibras nervosas
CV – Central ventral
EPR – Epitélio pigmentar retiniano
ERG-ct Eletrorretinografia de campo total
EXTD – extrema dorsal
EXTV – extrema ventral
FN – fibras nervosas
G – ganglionares
HE – Hematoxilina e eosina
MLE – Membrana limitante externa
MT – média total
NE – Nuclear externa
NI – nuclear interna
nm – nanômetro
NO – nervo óptico
obj. – objetiva
PD – Periférica dorsal
PE – Plexiforme externa
PI – Plexiforme interna
PV – Periférica ventral
RT – Retina total
SNC – Sistema Nervoso Central

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição e características dos planos anestésicos em peixes.	28
Tabela 2 - Representação da ordem dos registros de acordo com os comprimentos de onda e a descrição dos LEDs utilizados na avaliação da sensibilidade espectral.	41
Tabela 3 - Média e Desvio Padrão dos valores de tempo implícito e amplitude do exame ERG, protocolo Fotópica.	45
Tabela 4 - Média e Desvio Padrão dos valores de tempo implícito e amplitude do exame Flicker.....	46
Tabela 5 - Espessuras retina <i>Astronatus Ocellatus</i>	62

LISTA DE IMAGEM

Figura 1 - Desenho esquemático do <i>Astronotus ocellatus</i> (Agassiz, 1831).....	14
Figura 2 - Desenho esquemático do corte sagital do olho de um teleósteo.	15
Figura 3 - Diagrama de uma secção através da retina do <i>Astronotus ocellatus</i>	22
Figura 4 - Peixe oscar posicionado para realização do ERG. A: Eletrodo ativo, R: Eletrodo referência, T: Eletrodo terra, FL: Fonte luminosa, led branco.....	42
Figura 5 - Traçado demonstrando as ondas "a" e "b". Tracejado verde: tempo implícito de onda "a" e "b"; Tracejado vermelho: amplitude de onda "a" e "b".	42
Figura 6 - Traçado obtido com o protocolo Fotópico do exame de ERG-ct do peixe Oscar. Esquema de mensurações da Amplitude, azul (AM-a, amplitude da onda "a"; AM-b, amplitude da onda "b") e do Tempo implícito, vermelho (TI-a, tempo implícito da onda "a"; TI-b, tempo implícito da onda "b"). Linha tracejada verde: linha base, 0. Seta vermelha: Estímulo luminoso.	43
Figura 7 - Traçado Flicker do exame de Eletroretinografia do peixe Oscar. Vermelho: Esquema de mensuração do Tempo Implícito (TI); Azul: esquema de mensuração da amplitude (AM).	43
Figura 8 - Traçado Fotópico demonstrando os ruídos fisiológicos (setas vermelhas) do peixe mesmo quando anestesiado.....	44
Figura 9 - Gráfico demonstrando os valores de amplitude em μV da onda "a" nas respostas à estímulos luminosos em cada peixe do registro fotópico.	45
Figura 10 - Gráfico demonstrando os valores de amplitude em μV da onda "b" nas respostas à estímulos luminosos em cada peixe do registro fotópico.	45
Figura 11 - Gráfico demonstrando os valores de tempo implícito em ms da onda "a" nas respostas à estímulos luminosos em cada peixe do registro fotópico.	46
Figura 12 - Gráfico demonstrando os valores de tempo implícito em ms da onda "b" nas respostas à estímulos luminosos em cada peixe do registro fotópico.	46
Figura 13 - Fotomicrografia de um corte transversal da retina do peixe Oscar (<i>Astronotus ocellatus</i>) demonstrando disposição das camadas retinianas.	58
Figura 14 - Fotomicrografia de um corte transversal retina do <i>Astronotus ocellatus</i> , enfatizando no quadrado e na foto B, o plexo coroidal (rede admirável).	58
Figura 15 - Fotomicrografia de um corte transversal da retina do peixe Oscar.....	59
Figura 16 - Imagem histológica de um corte sagital da retina do peixe Oscar (<i>Astronotus ocellatus</i>) demonstrando a disposição do epitélio pigmentar retiniano nessa espécie.	59
Figura 17 - Fotomicrografia de secção tangencial da retina do <i>Astronotus ocellatus</i> - Mosaico quadrangular.	60
Figura 18 - Fotomicrografia da margem ciliar da retina do <i>Astronotus ocellatus</i>	61
Figura 19 - Gráfico demonstrando os valores de espessura média das regiões da retina. ...	63

1 – INTRODUÇÃO

O uso do peixe com modelo experimental ocorre desde os primórdios da ciência. O Zebrafish (*Danio rerio*), um dos precursores, apresenta fácil disseminação e semelhança em diversos aspectos com o DNA humano, sendo, portanto, amplamente usado no cenário científico (LIESCHKE e CURRIE, 2007; CHAKRABORTY, 2009). Apesar de roedores representarem cerca de 95% nas pesquisas biológicas (SILVEIRA et al., 2012).

Outro peixe teleósteo que vem sendo utilizado em pesquisas científicas é o *Astronotus ocellatus* (Oscar). A espécie pertence à família *Cichlidae* a qual apresentou expressiva sensibilidade visual (CARLETON et al., 2016). O globo ocular dessa espécie possui tamanho e conformação que facilitam a manipulação e análise das estruturas, semelhante a outros grupos de peixes (GOTO, 2016), favorecendo a sua utilização em estudos na oftalmologia (comparada) veterinária.

A utilização de peixes como modelo experimental é promissora devido à similaridade retiniana, tanto estrutural quanto celular, com os mamíferos e, também, à capacidade regenerativa da mesma, sendo esta última qualidade diferente entre as espécies (RAO et al, 2017). De forma geral, os mamíferos não conseguem responder à uma lesão retiniana de forma regenerativa, ocorrendo então uma resposta cicatricial (RAO et al, 2017) e déficit ou perda da função. Já em peixes, a capacidade de regeneração tem sido indicada, uma vez que os fotorreceptores são continuamente adicionados durante o desenvolvimento do animal a partir de células tronco que diferenciam-se em estruturas semelhantes aos cones e bastonetes dos mamíferos (GELLAT, 2014).

A Eletroretinografia é um método não invasivo e bem compreendido que, através de eletrodos, capta a atividade elétrica da retina quando estimulada por uma fonte de luz. Seus resultados podem ser variáveis, de acordo com as condições ambientais, tipo de estímulo, comprimento de onda, intensidade e frequência. O ERG de vertebrados origina principalmente 2 ondas, uma “a” negativa, sugerindo atividade fotorreceptora, e uma “b” positiva, atividade das células bipolares ON e müller (DOWLLING, 1987; EKESTEN et al., 2013). Dessa forma, as análises de Eletroretinografias trazem complemento a investigação do comportamento das alterações na retina, mostrando-se como uma ferramenta de fácil acesso e alta sensibilidade identificando e quantificando degenerações retinianas em sua totalidade

ou em células isoladas, como cones e bastonetes (BROCKERHOFF et al., 1995; NEUHAUSS et al., 1999).

Os peixes são animais que apresentam uma complexa estruturação do Sistema visual, sendo a retina muito mais povoada e diferenciada dos demais vertebrados, portanto, compreender seu funcionamento e sensibilidade estabelece expectativas quanto aos esclarecimentos sobre a visão, sendo um importante modelo experimental nessa área (SABBAH et al., 2010).

Considerando-se então as similaridades e as particularidades entre a retina dos peixes e mamíferos, bem como as características do *Astronotus ocellatus* que o tornam um interessante modelo experimental, optou-se por essa espécie para avaliação eletrofisiológica e histológica da retina a fim de descrever a estrutura retiniana para fundamentar estudos futuros que avaliem possíveis alterações nesse tecido.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Peixe como Modelo Experimental

Os peixes vêm sendo acrescentados no mundo científico como uma alternativa de modelo experimental em detrimento a roedores. Os seres aquáticos são amplamente diversificados, sendo fácil o discernimento entre peixes com parentesco distante. Entretanto a ancestralidade entre espécies e a manutenção das características de desenvolvimento embriológicas, são substratos para uma análise comparativa entre diferentes organismos afim de fornecer meios para o entendimento sobre os mecanismos fisiológicos dos mais diversos sistemas biológicos (HARRIS et al., 2014).

Espécies como Zebrafish (*Danio rerio*) e Medaka (*Oryzias latipes*), têm sido intensamente utilizados como objeto de estudo nas últimas décadas. São espécies fáceis de serem analisadas em grupos pois compartilham estruturas semelhantes, além de apresentarem baixo custo de manutenção, elevado potencial reprodutivo e rápido ciclo de vida (Porazinski et al., 2011; Lawrence et al., 2012).

2.2 – Oscar (*Astronotus ocellatus*) Agassiz, 1831

Astronotus ocellatus (Figura 1), pertencente à classe *Osteichthyes*, táxon *Actionpterygii*, grupo Teleósteos, ordem perciformes e família Cichlidae; também conhecido como apaiari (FABREGAT et al., 2006), acará-grande (BENTES, 2014), oscar, cará-bor, acará-açu (BARBOSA; SOARES, 2009). Espécie originária da América do Sul, da bacia do rio Amazonas, englobando países como Peru, Colômbia e Brasil (PAVANELLI, 2000), tendo sua disseminação em açudes e rios do Nordeste brasileiro, desde 1938 através do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), e, portanto, vistos por cerca de todo o território brasileiro (FONTENELE, 1982). Fury (1994) relata que o apaiari pode, também, ser encontrado em grande concentração em aquários para pesca esportiva na América do Norte, sul da Flórida.

O Apaiari é um peixe de configuração corpórea média ovalada, podendo ter até 35cm de comprimento total. Há um ocelo e manchas com a forma de anéis circulares na base superior da nadadeira dorsal. Cabeça com olhos grandes e lateralizados e boca proeminente e anterior. Seu corpo cromatiza de uma variação de marrom-escuro no dorso ao amarelo-carmesim no ventre, e possui nadadeiras peitorais ligeiramente mais claras que as demais. No estágio reprodutivo, sua coloração escurece para o

vermelho vinho na base opercular e faixas laterais, e o marrom gradua para o negro (KULLANDER, 1986; BRITSKI I. 1999; KEITH et al., 2000; REIS et al., 2003; SANTOS et al., 2004; SANTOS I 2006; SOARES et al., 2011; FONTENELE, 1982).

Figura 1 - Desenho esquemático do *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831).



Fonte: Santos et al, 2006.

É uma espécie gregária, na qual em sua fase mais jovem, preferencialmente nadam em pequenos cardumes. Comumente encontrada em ambientes de várzeas e pântanos de rios com sombra e água lântica, límpida e rasa. Entretanto, quando adultos formam casais que tendem a desgarrar dos grupos. Não suporta variações de temperatura, reduzindo drasticamente sua atividade em locais abaixo de 15 °C, podendo morrer em temperaturas menor que 10°C (BRAGA, 1962; FELDBERG; PORTO; BERTOLLO, 2003). Tolerar baixas concentrações de oxigênio diluído, valores inferiores a 0,4 mg/L (MUUSZE *et al.*, 1998). Já quanto ao pH, suporta variações em torno de 6-7 (WEBB; MAUGHAN; KNOTT, 2007). É carnívoro, alimentando-se de moluscos, crustáceos, peixes pequenos e insetos aquáticos; e possui hábito diurno (SANTOS *et al.* 1984; GOULDING *et al.* 1988;; YAMAMOTO, 2004; GRANADO-LORENCIO *et al.* 2005; SOARES *et al.* 2011).

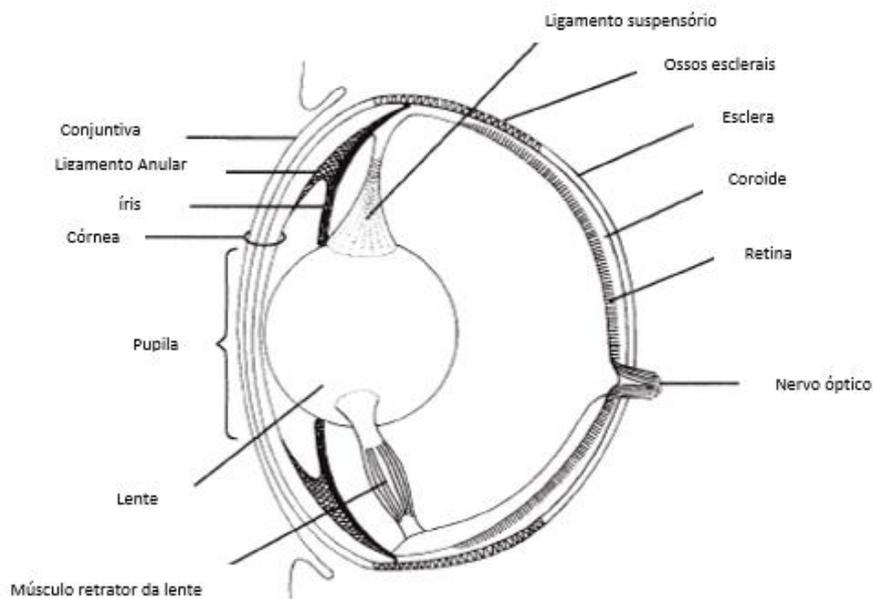
Com o emergente valor econômico, é um peixe de grande valia para aquariofilia devido suas peculiaridades morfológicas. Possui também, comportamento territorialista e, algumas vezes, agressivos e dominante dentro do seu habitat que atrai os aquariofilistas (SHACKLETON; JENNIONS; HUNT, 2005). Sua carne possui grande apreço na região Norte e Nordeste do Brasil, devido sua suculência, firmeza e espinhas intramusculares que facilitam seu consumo (GURGEL e FREITAS, 1973).

2.3 Anatomia ocular do Peixe

2.3.1 Globo Ocular e Anexos

Os peixes do grupo Teleósteo (ósseos), são os mais modernos na escala evolutiva. Como os demais peixes, não apresentam pálpebras, mas sim uma membrana firme que recobre toda a córnea. Com órbita óssea completamente fechada composta de grupos de ossos de origem cartilaginosa e dérmicas. Comumente os peixes apresentam olhos com forma elíptica, ligeiramente achatados rostralmente, devido sua córnea plana, tendo variações como conformação tubular ou olhos cegos vestigiais, em espécies de águas profundas (HELFMAN et al, 2009; KERN e COLITIZ, 2014)

Figura 2 - Desenho esquemático do corte sagital do olho de um teleósteo.



Fonte: HILDERBRAND, 1982; HELFMAN, 2009.

A espécies mais desenvolvidas apresentam uma cadeia de ossículos que substituem um único anel ósseo primitivo que recobre todo o globo, circunorbital. Possuem 3 pares de músculos extraoculares, semelhante aos encontrados em mamíferos, que permitem o movimento do globo dentro da órbita; oblíquo dorsal e ventral, reto dorsal e ventral e reto medial e lateral. São inervados por 3 nervos cranianos: o oblíquo superior pelo nervo troclear (IV), o reto lateral pelo abducente

(VI) e os demais pelo oculomotor (III). Estão presos na órbita nos miódomos que são hemicírculos côncavos na mesma. Possui também o ligamento suspensório da lente rostralmente e o músculo retrator abaixo, permitindo a focalização de objetos (HELFMAN et al, 2009).

2.3.2 Túnica fibrosa

A córnea em animais terrestre apresenta função refrativa, porém por ter o mesmo nível de refração da água, não dispõe tal papel para seres aquáticos. Quanto a sua estrutura apresenta disposição semelhante a encontrada em mamíferos: epitélio, estroma, membrana descemet e endotélio. Entretanto é relativamente mais espessa, onde alguns espécimes apresentam epitélio com dupla camada com espaço entre si, sendo responsável pela hidratação e controle osmótico (Lynch et al., 2007a). É mais grossa em peixes de água doce em relação aos marinhos. A presença de pigmentos e da iridescência corneana, tem sido descrita como uma forma de diminuir o brilho e fazer sombra sobre o olho, podendo assim permitir a visão em ambientes muito iluminados. Em sua periferia o endotélio se torna mais denso formando o ligamento anular que sobrepõe o ângulo iridocorneano. A esclera em sua fração anterior apresenta um anel circular de tecido cartilaginoso nutrido pelos ossículos esclerais que dá sustentação ao globo às variações de pressão gravitacional sob a água (KERN e COLITIZ, 2014).

2.3.3 Túnica Vascular

O tecido uveal apresenta, externamente, uma camada de tecido reflexivo prateado, argentea, que contém cristais de guanina e se estende até a porção anterior da íris, contribuindo para sua coloração e iridescência. Este tecido ocorre mais comumente em formas larvais do que em adultos. Fica sobre a porção pigmentada da coróide e do epitélio pigmentar, e sobre os vasos da mesma, e é coberto mais externamente pela córnea e esclera (HOLDEN, 1979 e KERN e COLITIZ, 2014). A íris em elasmobrânquios apresenta musculatura que permite a alternância no diâmetro pupilar, enquanto em teleósteos em lampreias a pupila apresenta tamanho fixo. O formato pupilar em peixes de águas profundas é circular, enquanto tubarões apresentam pupila em fenda e raias formato de lua crescente (HUETER et al, 2004, HELFMAN et al, 2009). Também o processo falciforme, que consiste na dobra da

coróide sobre a retina, inserida próxima ao disco óptico através da fissura fetal para o vítreo (BELLHORN, 1997). Não apresenta corpo ciliar, e em poucas espécies de elasmobrânquios é presente, porém é primitiva (KERN e COLITIZ, 2014).

O tecido uveal apresenta em sua porção posterior um plexo vascular, a glândula coroidal, uma rede de vasos que circunda o nervo óptico com origem de uma pseudobranquia, responsável pela nutrição e regulação da temperatura local (GROVER e ZIGMAN, 1984; MCLAUGHLIN *et al.*, 1996; HELFMAN, 2009). Desta emerge a artéria oftálmica, que por sua vez transpassa a esclera posteriormente e dorsalmente ao nervo óptico, ramificando-se em dois, de um modo que cada ramo adentre um lado da glândula ou mais usual, plexo coroidal, que possui forma de ferradura. Dentro desta, emite uma nova rede de vasos que se direcionam a retina, formando uma anastomose de grandes capilares entre ambas sobre o nervo óptico. No processo de drenagem, capilares venosos entremeados nos arteriosos, separados apenas pelo endotélio capilar, esvai o sangue venoso que desemboca no seio venoso (COPELAND E FITZJARRELL, 1975). Alguns teleósteos apresentam uma membrana oriunda da coróide que adentra o olho por uma fissura embrionária próxima ao nervo óptico e se dobra sobre a retina, chamada de processo falciforme ou túnica vasculosa da retina. Seus vasos são derivados da artéria oftálmica (BELLHORN, 1997).

2.3.4 Lente

O cristalino é semelhante ao encontrado em vertebrados terrestres, porém proporcionalmente maior e mais arredondado. Estruturalmente apresenta epitélio, cortéx e núcleo, assim como encontrado em outros animais, como aves, primatas, canino e felino, entre outros. Envolvido por uma cápsula de hialina sustentada pela zonula e ligamento suspensório dorsal. Apresenta também o músculo retrator da lente, apenas em teleósteos, que auxilia no processo de focalização, posicionando a lente mais anterior ou mais posterior, ajustando dessa forma a distância dela para a retina. A superfície rostral da lente é próxima ao endotélio corneano, configurando uma câmara anterior rasa. Possui o maior índice refrativo de todos os vertebrados (~1.69) que proporciona a supressão da aberração cromática e esférica sobre a retina. (SCHWAB, 2011; Diversity of the Fish; KERN e COLITIZ, 2014). Posterior a pupila, há um espaço denominado crescente afácico, ou seja, sem lente, que auxilia na visão

binocular, onde o peixe direciona os olhos frontalmente permitindo que a luz transpasse obliquamente por este espaço estimulando a retina (SWABB, 2011).

2.3.5 Vítreo

O vítreo é um hidrogel transparente que está localizado entre o cristalino e a retina, compondo cerca de dois terços do volume do globo ocular. Responsável pela sustentação anterior do cristalino e posterior da retina, mantendo o alinhamento e a transparência para a manutenção do formato do olho e a transmissão da luz para efetivação da visão propriamente dita (JAFFE, 1969; GELATT, 2014)

2.3.6 Túnica Nervosa

A retina é uma proeminência do prosencéfalo que em grande parte dos vertebrados, apresenta fotorreceptores, cones e bastonetes, células responsáveis pela visão em ambientes iluminados (visão fotópica) e pouco ou não iluminados (visão escotópica), respectivamente (BOWMAKER, 2008). Estes possuem um fotopigmento que reage quando em contato com a luz gerando um impulso elétrico, que é conduzido verticalmente através das células bipolares e ganglionares ao córtex visual. Células acessórias como amácrinas e horizontais realizam o processamento on-off, regulando a resposta dos fotorreceptores, das bipolares e ganglionares (HERRON *et al.*, 1974). Histologicamente é organizada em 8 camadas e 2 membranas, elencado da coróide ao vítreo: a camada de epitélio pigmentar, células fotossensíveis, membrana limitante externa, nuclear externa, plexiforme externa, nuclear interna, plexiforme interna, ganglionar, fibras nervosas e membrana limitante interna.

O epitélio pigmentar da retina é composto por células hexagonais, preenchidas de melanina, exceto em elasmobrânquios (ALI e ANCTIL, 1976). O núcleo é centralizado e ovalado, apresenta citoplasma rico em retículo endoplasmático liso e mitocôndrias. Em animais diurnos, como pássaros e alguns répteis, pode apresentar melanossoma elíptico, que confere proteção a luminosidade intensa, pois conseguem se posicionar em maior número dentro das microvilosidades do EPR. Em primatas, esquilos e animais noturnos como roedores e morcegos o melanossoma possui formato mais arredonda e é encontrado em menor proporção (SAMUELSON, 2013)

Diferente de mamíferos e outros vertebrados o peixe apresenta o tapete lúcido no EPR, que em alguns teleósteos, é composto por lipídeos e/ou aminoácidos (guanina, ácido úrico ou pteridina), a função destes pode estar relacionado ao aumento da visão em ambientes mais escuros. (FRANCKE, et al. 2013). Em muitos peixes o pigmento do EPR pode responder a luz, tal como os fotorreceptores, fenômeno conhecido como oclusão do tapetum. Quando claro a células lançam vilosidades que entremeiam os cones e bastonetes, fornecendo suporte e consumindo seus metabólitos e no escuro eles se retraem (OLLIVIER et al. 2004a; ALI e ANCTIL, 1976).

A camada fotossensível, contém os segmentos externos dos fotorreceptores, cones ou bastonetes, estes possuem lamelas com discos contendo fotopigmento específico, que participa do fenômeno da fototransdução (EBREY e KOUTALOS, 2001). Os cones são morfologicamente e fisiologicamente distintos dos bastonetes. Estruturalmente o cone tem o formato cônico e suas lamelas são recobertas por duas membranas contínuas, diferente dos bastonetes que é aberto sendo recoberto por apenas uma camada. Além de possuir, individualmente, até 5 tipos de fotopigmento, dependendo da espécie, variando dessa forma o espectro de onda visível, ou seja, a cor, em detrimento do bastonete que apresenta apenas um, a rodopsina (BOWMAKER, 2008). Refletindo diretamente no funcionamento de ambos, em que o cone tem uma boa ação em ambientes iluminados, e reflete uma visão mais detalhada e o bastonete apresenta melhor atividade em locais com baixa intensidade e frequência luminosa, podendo serem inativados quando impostos ao contrário (SAMUELSON, 2013).

Os cones se diversificam em único, duplo ou gêmeo, que são estruturalmente distintos, sendo, portanto, individualizado, de tamanho distinto entre o par e idênticos, respectivamente (EBREY e KOUTALOS, 2001). Sugere-se que os cones duplos apresentam ação elétrica conjunta, e podem detectar intensidade luminosa (MARCHIAFAVA, 1985; MARSHAL e VOROBVEY, 2003; MARSHAL *et al.*, 2003b). Em alguns vertebrados, como répteis, aves e peixes pode existir uma gotícula de óleo, que são estruturas esféricas, que reside dentro do segmento interno do cone, discute-se sua função de reduzir a aberração cromática, melhorando dessa forma o alcance da acuidade visual, assim como reduzir o brilho e proteção da célula fotossensível (TOOMEY e CORBO, 2017; MUNTZ, 1972).

A membrana limitante externa (MLE) é uma fina camada composta de fibras oriundas de ramos celulares das células de Müller. Está entre a camada de células visuais e a nuclear externa, dividindo os mióides dos segmentos externos e os corpos celulares dos fotorreceptores, estando os dos cones mais próximos à MLE. Configura como um dos apoios para a retina e podem ser nomeadas de fibras radiais (CUENCA et al., 2020).

A porção externa das primeiras células visuais, estão interligadas a sua parte interna por meio de uma estrutura ciliar. O segmento interno está localizado na camada nuclear externa, onde está o núcleo da mesma e diversas organelas, como: ribossomos, mitocôndria, retículo endoplasmático liso, corpos de golgi e microtúbulos, que dão suporte para a sinapse. Sua extremidade terminal se afunila formando um pedículo (cones) ou esférulas (bastonetes) onde se comunicam com os dendritos das células bipolares ou horizontais, onde ocorre as sinapses, configurando a camada plexiforme externa. Funcionalmente a organização da camada plexiforme externa (CPE), isto é, a ligação neuronal entre os fotorreceptores e bipolares, e paralelamente com as horizontais, realçam os aspectos estáticos ou espaciais, acentuando o contraste na imagem da retina (DOWLING & WERBLIN, 1971; ALI e ANCTIL, 1976; BOWMAKER, 2008; SAMUELSON, 2013).

Na camada nuclear interna se encontra os corpos celulares (CC) e núcleos das células horizontais, bipolares, amácrinas e müller, estratificando em subcamadas no sentido esclera-vítreo (ALI e ANCTIL, 1976; OFRI, 2018; ABARCA, 2019). Este estrato se localiza entre os fotorreceptores (neurônios de primeira ordem) e as células ganglionares (neurônio de terceira ordem), em que as células bipolares e horizontais (neurônios de segunda ordem) conectam os estímulos entre eles. As células amácrinas interagem inibindo as bipolares e ganglionares. E as células de müller são as células glias principais, de defesa, da retina (JIANG et al., 2014).

As células horizontais são cubóides, podendo ter um leve achatamento horizontal, seus dendritos fazem sinapse com fotorreceptores e bipolares lateralmente, integralizando o estímulo por toda a retina (WEILER *et al.*, 2000). As bipolares são neurônios de segunda ordem, também encontrados no sistema nervoso central (SNC) com CC alongados núcleo circular, podendo conter mais ou menos ramificações especializadas (ALI e ANCTIL, 1976). Os maiores corpos celulares dessa camada pertencem às amácrinas, que possuem núcleo menos denso, que é tingido em menor tom pela Hematoxilina que as bipolares, e permeia e integraliza o

sinal a nível de células bipolares e ganglionares. E por fim está nesse estrato o CC das células de Müller, com a maior extensão perpassando toda a retina exceto o RPE, que tem função estrutural, mas além disso funciona como uma barreira protetora e suporte nutricional, outras ações vêm sendo estudadas em várias espécies, para maior entendimento desse tipo celular (ALI e ANCTIL, 1976; DOWLING, 2002).

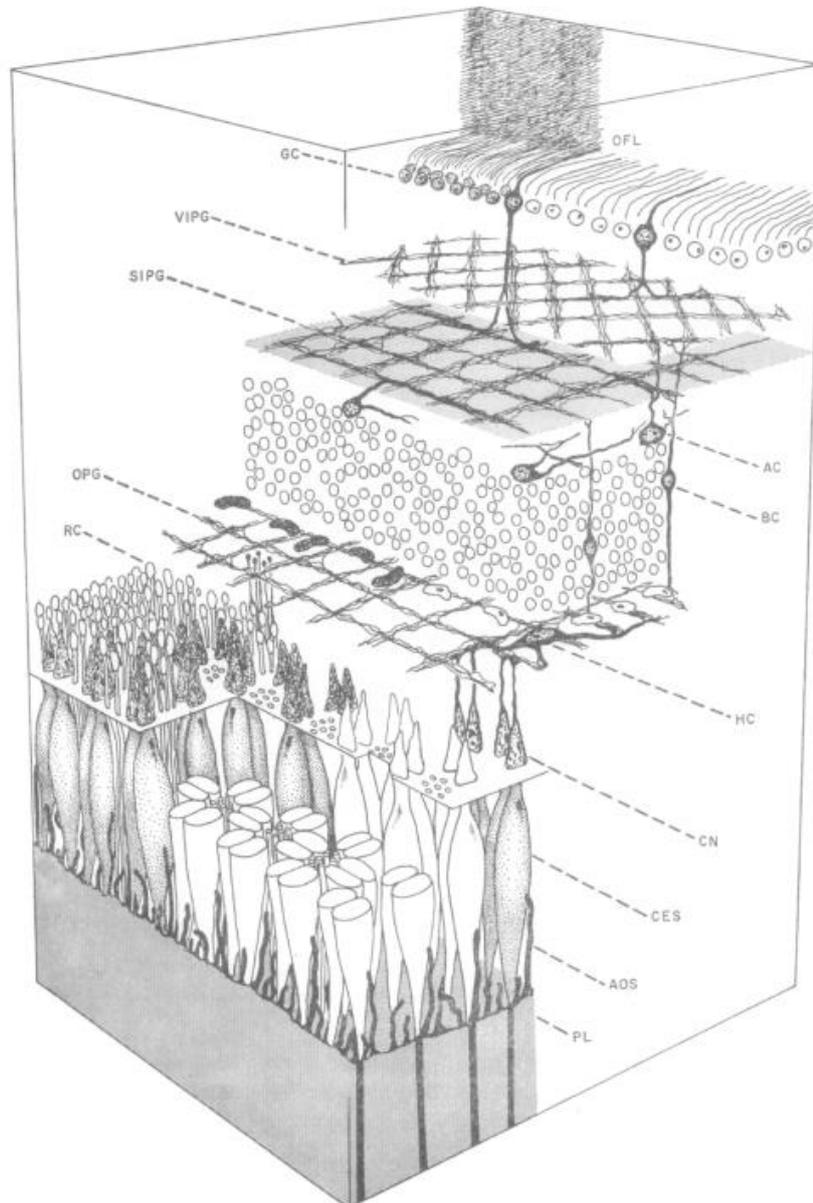
A camada plexiforme interna compreende nos axônios das células bipolares, amácrinas e ramificações dendríticas das células ganglionares que fazem sinapse entre si. Dando origem à uma densa rede de fibras que correm tanto horizontalmente, quanto verticalmente. Em alguns agnatas e elasmobrânquios os corpos celulares das células ganglionares estão presentes nesta camada (ALI e ANCTIL, 1976). Além das sinapses convencionais, entre as células bipolares, ganglionares e amácrinas, pode ocorrer sinapses recíprocas de retorno para uma célula bipolar. Portanto as células amácrinas fazem conexão pré e pós-sinápticas a diferentes bipolares (KOLB, 1997; MASLAND, 2012). A CPI, pode estar envolvida em eventos temporais e móveis, realçando as respostas a movimento e direção (DOWLING & WERBLIN, 1971).

A camada de células ganglionares, consiste numa fileira única de corpos celulares, exceto em peixes sem mandíbula e cartilagosos, assim como nos primatas pode haver de 6 a 9 camadas destas células em espessura. Foi descrito três tipos de células ganglionares em gato, relacionando a sua função neurofisiológica, α -, β - e γ - (BOYCOTT & WASSLE, 1974; HENDERSON, 1985) Ambas estão por toda a retina em proporção variável. As células alpha ou Y possuem dendritos com ramificação arbustiva e um pericárdio robusto, sendo localizada em maior concentração na retina periférica (PEICHL, 1992). As betas ou X são mais abundantes, porém menores e com mais ramos, estando dentro da área central e estria visual, as gama ou W, possuem pericárdio pequeno e poucos dendritos, pouco ramificados, são bem numerosos e também concentrados na região central da retina (STONE & KEENS, 1980). Estudos anatômicos sistemáticos têm descrito muitos outros tipos de células ganglionares da retina, distinguidos por seus níveis de ramificação, largura da árvore dendrítica, onde antes o conhecimento desses tipos celulares estava associado a eletrofisiologia que ajudava na determinação a partir dos campos receptivos (MASLAND, 2001)

Os axônios das células ganglionares se unem formando a camada de fibra nervosa que converge na região do disco óptico para compor o nervo ou trato óptico. A última camada, membrana limitante interna, separa a camada de fibras do vítreo, é

semelhante a MLE, sendo oriunda da expansão das porções vítreas das fibras de Müller (GELATT, 2014)

Figura 3 - Diagrama de uma secção através da retina do *Astronotus ocellatus*.



OFL (Optic fiber layer/Camada de Fibra nervosa), AC (amacrine cell/células amácrinas), BC (bipolar cell/células bipolares), HC (Horizontal cell/células horizontais), CN (cone nucleus/ núcleo do cone, CES (cone ellipsoid/elipsóide cone), AOS (accessory segment/segmento acessório), PL (pigment layer and cone outer segments/ camada pigmentada e segmento externo do cone), RC (rod cell/bastonetes), OPG (outer plexiforme grid/ rede plexiforme externa), SIPG (sclerad inner plexiforme grid/ rede plexiforme interna esclerad), VIPG (vitread inner plexiforme grid/rede plexiforme interna vitreal), GC (ganglion cell).

Obs: AOS, representa o processo das células pigmentares, mas estão rotulados como segmento acessório devido parecer que suportam um a um para os cones e frequentemente separa da camda pigmentar com os cones.

Fonte: HIBBARD, 1976.

2.4 Visão em Peixes

A visão é um sentido de grande relevância para prevalência dos animais. Alimentação, orientação espacial, detecção de presas, são características visuais que o auxiliam evitar morte por predadores e perpetuação da espécie. A percepção visual se inicia com absorção de fótons de luz por pigmentos presentes nos fotorreceptores, que provocam uma cascata fotoquímica que culmina num sinal elétrico que percorre toda a retina, nervo óptico, para enfim assimilação no córtex visual e então composição da imagem (LISNEY et al., 2010; PARKYN e HAWRYSHYN.4, 2000).

Um dos métodos para estudo da visão é a mensuração da sensibilidade espectral, que configura a eficiência relativa de detecção de luz em resposta a um comprimento de onda específico. Dessa forma é utilizada para retratar os mecanismos de visão de cores, descrevendo os pigmentos visuais encontrados nos cones. Alguns estudos descrevem a presença de quatro tipos espectralmente distintos de pigmentos, oriundos de vários genes de opsina: SWS1, classe ultravioleta, sensível ao mesmo espectro (355-440 nm); SWS2, sensível a comprimentos de onda curto (410-490 nm); RH2, comprimento de onda médio (470-530 nm) e LWS, comprimento de onda longo (495-570 nm) (YOKOYAMA e YOKOYAMA, 1996; BOWMAKER, 2008).

A identificação dos genes de opsina ocorreu na primeira classe de vertebrados, os agnatas (lampreia), ou peixe sem mandíbula, surgiram da duplicação de um único gene da opsina primitiva (COLLIN et al, 2003). Nos teleósteos, a duplicação dos genes produz uma gama de genes de opsina (CHRISTOFFELS, 2004) na qual a expressão de diferentes subconjuntos destes pode gerar uma grande variedade dentro da escala espectral, influenciando diretamente nos mecanismos da visão em cor em peixes. (CARLETON e KOCHER, 2001; SHAND et al, 2008)

Os ciclídeos são um modelo emergente de estudo para compreensão da ecologia visual, pois, como a maioria dos teleósteos, possuem 7 cones de opsinas responsáveis pela visão em cores em comparação com os humanos que só possuem 3 (HÄRER, et al., 2019). Os ciclídeos utilizam a visão de cores para detectar, identificar e discriminar diferentes alimentos e parceiros sexuais (ESCOBAR-CAMACHO e CARLETON, 2015).

Os peixes possuem visão binocular que é favorecida pela presença de uma região afácica permitindo que a luz atravesse obliquamente a lente e estimule a fóvea.

A lente dos peixes possui um poder de refração maior que a dos vertebrados em geral, função evolutiva decorrente do índice de refração de uma córnea aplanada ser semelhante ao da água (FERNALD R.D,1990). A acomodação visual se dá pela movimentação antero-posterior de toda a lente, por meio do retrator da lente, diferente de outros vertebrados que realizam a acomodação através de alterações no formato dela. Quando projetada através da pupila, proporciona um campo de visão periscópico superior a 180° em cada olho, auxiliando na visão de objetos frontais, devido dificuldade anatômica, por possuírem os olhos afastados lateralmente (GUSTAVSEN et al, 2018). Como consequência, a lente é, unicamente, responsável no processo de convergência da luz sobre a retina. (TURNER et al., 2001; SALZBURGER, 2009)

A íris contém pouco ou nenhum músculo, não regulando, portanto, a entrada de luz e a exposição da retina a esta (FRYER e ILES, 1972). A regulação da incidência de luz sob os fotorreceptores é obtida por meio do movimento retinomotor, onde cones e bastonete estão circundados por vilosidades do epitélio pigmentar, que em resposta a intensidade luminosa há a migração de melanossomas (DJAMGOZ e YAMADA, 1990; KOCHER, 2004).

2.5 Eletrorretinografia

O Eletrorretinograma (ERG) consiste na representação gráfica do potencial de ação gerado nas células retinianas após sofrerem estímulos luminosos (MARMOR et al, 2009; FREEMAN et al., 2013). Tal estímulo produz transformações iônicas intra e extracelulares que originam as diferenças de potenciais elétricos que são representados em forma de ondas ao serem captados através de eletrodos específicos colocados juntos ao olho examinado (MARMOR et al, 2009; HOLDER et al, 2010; FREEMAN et al., 2013).

Este exame pode ter diferentes classificações de acordo com o estímulo usado, sendo os principais tipos: ERG de Campo Total (ERG-ct) quando se analisa a resposta da retina de forma geral após estímulos de flashes; ERG multifocal, quando estimula e analisa a resposta de uma região retiniana isolada e ERG por padrão reverso que representa de forma mais explícita a função macular (HOLDER, 2006). Sendo o ERG

– ct o mais utilizado na medicina veterinária devido a sua praticidade e independência da cooperação do paciente (EKESTEN et al., 2013).

No traçado do ERG registra-se inicialmente uma deflexão de orientação negativa denominada onda “a” que demonstra a atividade dos fotorreceptores que se hiperpolarizam ao serem estimulados transformando o sinal luminoso em potenciais nervosos que são conduzidos às células seguintes. Em seguida, observa-se a presença de um grande componente positivo chamado de onda “b” que representa a continuidade do sinal nervoso pela atividade das células bipolares e de Müller, sendo essas duas ondas as respostas mais comuns em ERG de campo total. Por fim, pode-se observar em alguns registros a presença da onda “c”, produzidas pela ação do epitélio pigmentar da retina (FREEMAN et al., 2013; MCCULLOCH et al., 2015).

Para avaliar a resposta de células e camadas específicas da retina e permitir a comparação de dados entre laboratórios, foi proposto pela International Society for Clinical Electrophysiology (ISCEV) protocolos padronizados onde se varia a condição de luminosidade ambiente e o estímulo usado para o seu registro. Assim, a adaptação prévia ao escuro (protocolos escotópicos) permite a descrição da atividade isolada dos bastonetes ou mista com os cones. Quando o paciente é submetido a um ambiente iluminado, obtém-se o registro da ação isolada dos cones (registros fotópicos) (MARMOR et al, 2009; HOLDER et al, 2010; MCCULLOCH et al., 2015).

Como parâmetros quantitativos do ERG adota-se a mensuração do tempo implícito (tempo de aparecimento do pico da deflexão após o estímulo luminoso: medido em milissegundos) e amplitude (tamanho da onda medida da linha de base ao ápice do vale da onda a e considerado de pico-a-pico para se obter o valor da onda b: resultado em microvolts). Tais valores variam de acordo com estado da retina (afecções), protocolos de registro (fotópico ou escotópico), emprego de sedativos ou anestésicos, idade, espécie, estado da pupila e outros fatores (FREEMAN et al., 2013). Outro critério a ser observado é a relação “b / a” (divide-se o valor da amplitude da onda b pelo valor da amplitude da onda a), pois este pode indicar disfunções retinianas em casos de opacidades dos meios oculares que não permitem a chegada do estímulo com sua intensidade normal ao fundo ocular (MAEHARA et al., 2007).

Em peixes, o eletrorretinograma vem sendo registrado na maioria das vezes após a eutanásia ou em olhos enucleados, em que o eletrodo ativo é colocado

transpassando a córnea, ou no vítreo próximo a retina (GAČIĆ *et al.*, 2015). Vale destacar poucos estudos realizados *in vivo* em carpas e larvas de zebra-fish, nos quais traz análises dos efeitos de algumas substâncias, como por exemplo a cocaína, no traçado do eletrorretinograma, sugerindo dessa forma alterações na percepção visual (NIKLAUS *et al.*, 2017). Dessa forma, portanto, são animais ideais para pesquisas oftálmicas relacionadas a registro eletrofisiológico, pelo animal ser de fácil acesso e de fácil manejo, além de globo ocular de manipulação fácil, com alta taxa de neurogênese (EASTER JUNIOR *et al.*, 1977). Dessa forma funcionando como modelo de estudo para diversas alterações tóxico-químicas e patológicas da retina (NIKLAUS *et al.*, 2017).

2.6 Anestesia em Peixes

O termo anestesia é derivado do grego *anaisthaesia*, que quer dizer insensibilidade, este termo se enquadra para descrever a perda de sensação de partes ou todo o corpo (TOPIC POPOVIC *et al.*, 2012). Um bom procedimento anestésico deve preservar os parâmetros fisiológicos, mantendo-os em taxas seguras. Evitando alterações bruscas no sistema cardiovascular e no sistema respiratório, na manutenção e na recuperação do plano anestésico, evitando que o paciente venha ao óbito ou tenha graves sequelas (HUANG *et al.*, 2010).

Em espécimes aquáticas, o uso de anestésicos é realizado, principalmente, para manejo ou transporte, visando a redução do estresse do animal e acidentes com manipulador ou com o peixe (TOPIC POPOVIC *et al.*, 2012). A escolha da substância anestésica está atrelada a viabilidade econômica, acesso, praticidade no uso e, principalmente, eficácia dentro do objetivo empregado, visando uma ação rápida sobre o sistema nervoso e sem complicações posteriores para o peixe (CHO e HEATH, 2000)

Os mais diversos fármacos podem ser usados em peixes sob a forma de imersão, ou seja, diluído na água (INOUE *et al.*, 2004; BECKER *et al.*, 2012). O mais utilizado nas pesquisas é a tricaina metano sulfonato (MS-222), com custo elevado e complicações tóxicas para os manipuladores e peixes (ROUBACH e GOMES, 2001; BAILEY *et al.*, 2013). Há também a benzocaína e o óleo de cravo ou eugenol, muito utilizado, que é de origem natural, possui baixo custo, seguro e de fácil acesso

(ROUBACH e GOMES, 2001). O óleo tem como princípio ativo o composto fenólico eugenol (4-alil-2-metoxifenol-C₁₀H₁₂O₂), derivado do caule, flores e folhas das árvores *Eugenia caryophyllata* e *E. aromática* (GRIFFITHS, 2000).

Outros fármacos vêm sendo testados, com intuito de trazer alternativas viáveis financeiramente, e ofereçam qualidade e eficiência na anestesia de seres aquáticos, como o propofol de forma única ou associado a anestésicos locais como a lidocaína (VALENTIM et al., 2016). O propofol é um agente hipnótico de curta-ação, que possibilita uma indução anestésica leve e rápida recuperação, com poucos efeitos cumulativos, muito utilizada em mamíferos (ROSS e ROSS, 2008; GHOLIPOURKANANI e AHADIZADEH, 2013). Enquanto a lidocaína é um bloqueador do canal de sódio, tendo sido utilizado no peixe medaka, e possuindo uma ampla margem de segurança (PARK et al., 2011).

O propofol vem sendo considerado como um anestésico de ampla utilidade em peixes, devido sua rápida e fácil dissolução em água, sem a necessidade de controle do pH da água, e o conhecimento prévio do peso do peixe (ODA et al., 2014). Tendo sido avaliado sua dose-efeito em peixe esturjão (*Acipenser oxyrinchus*), tubarões de bambu manchado (*Chiloscyllium plágioso*), peixe Binni (*Barbus sharpeyi*) e Dourado (*Carassius auratus*), apresentando uma boa opção de anestésico para peixes (FLEMING et al., 2003; MILLER et al., 2005; MORTAZEVI et al., 2012; GHOLIPOURKANANI e AHADIZADEH, 2013).

A lidocaína, amplamente usada na anestesia local de diversos vertebrados, foi relatada em peixes por Carrasco (1984), que a utilizou em espécies de carpas, tilápias e bagres. Quando dissolvida em água, a droga é absorvida pelas brânquias, corre pela corrente sanguínea, e age diretamente no sistema nervoso central, discute-se sua ação nos canais de Cálcio e Potássio, causando analgesia a nível central (LI et al., 1995; ZAHL, 2012; MADER, 2014). Este fármaco pode ser empregado na anestesia de peixes de forma isolada ou em associação, entretanto, por provocar uma recuperação mais longa, recomenda-se seu uso de forma associada (ROSS e ROSS, 2008; PARK et al., 2017). Tal como foi empregado por Valentim et al. (2016), em que a combinação do propofol com a lidocaína foi o suficiente para uma boa anestesia e analgesia.

Os planos anestésicos, segundo Ross e Ross (2008), são divididos em: sedação leve, sedação profunda, anestesia, overdose e eutanásia. Sendo, entretanto,

a descrição dos planos anestésicos em peixes primeiramente descrito por McFarland (1954), como descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Descrição e características dos planos anestésicos em peixes.

Estágios	Planos	Descrição	Características
1	1	Sedação leve	Resposta a estímulo, redução de movimento, diminuição de movimento opercular.
	2	Sedação profunda	Analgesia leve, reação à estímulo reduzida
2	1	Anestesia Leve	Perda parcial de equilíbrio, analgesia considerável
	2	Anestesia Profunda	Perda total de equilíbrio, perda total de tônus muscular, ventilação reduzida
3		Anestesia Cirúrgica	Assim como o estágio 2, plano 1, perda total a estímulo nociceptivo
4		Colapso Medular	Parada de movimento opercular, parada cardíaca, morte

Fonte: McFarland (1954).

3 - OBJETIVO

Geral

- Criar um modelo anestésico para a realização da Eletroretinografia em *Astronotus ocellatus*
- Definir os padrões de normalidade das respostas ERGs de campo total fotópico em peixes Oscar (*Astronotus ocellatus*) sob anestesia geral;
- Descrição histológica da retina da espécie *Astronotus ocellatus*.

Específicos

- Quantificar os tempos implícitos e amplitudes das ondas “a” e “b” do protocolo de Eletroretinografia fotópico;
- Quantificar os tempos implícitos e amplitudes do protocolo Eletroretinografia Flicker;
- Definir a aplicabilidade do protocolo curto ERG para espécie através da padronização dos valores;
- Análise histológica e morfométrica da retina e suas camadas da espécie *Astronotus ocellatus*;

4 - REFERÊNCIAS

- ABARCA, E. Vitreous and ocular fundus. In: MARTIN, C.; PICKETT, J. P.; SPIESS, B. M. **Ophthalmic disease in Veterinary Medicine**. CRC Press, 2019.
- ALI, M. A.; ANCTIL, M. **Retinas of Fishes: An Atlas**. 1. ed. New York:Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1976. p.2-10. DOI: 10.1007/978-3-642-66435-9.
- BAILEY, K. M., HEMPSTEAD, J. E., TOBIAS, J. R., BORST, L. B., CLODE, A. B., & POSNER, L. P. Evaluation of the effects of tricaine methanesulfonate on retinal structure and function in koi carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 242(11), 1578–1582, 2013. <https://doi.org/10.2460/javma.242.11.1578>
- BELLHORN, R.W. (ed.) *Retinal Nutritive Systems in Vertebrates*. Philadelphia: W.B. Saunders. 1997
- BECKER, A. et al. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.38, p.789–796. 2012.
- BOWMAKER, J. K. Evolution of vertebrate visual pigments. **Vision Research**, London, v.48, p.2022-2041, 2008. doi: 10.1016 / j.visres.2008.03.0
- BOYCOTT, B.B. & WÄSSLE, H. The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *Journal of Physiology*, **240**, 397–419. 1974.
- BRAGA, R.A. Apaiari ou acará-açu, *Astronotus ocellatus ocellatus* Spix. Fortaleza: DNOCS, p.2, 1962.
- BRITSKI, H.A.; SILIMON, K. Z. S. ; LOPES, B. S. Peixes do Pantanal : manual de identificação. 2. ed. rev. ampl. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Corumbá: Embrapa Pantanal, p.184, 2007.
- CARLETON K.L., KOCHER T.D. Cone opsin genes of African cichlid fishes: Tuning spectral sensitivity by differential gene expression. *Mol Biol Evol* 2001, 18:1540-1550.
- CARRASCO, S. et al. The use of lidocaine-sodium bicarbonate as anaesthetic in fish. **Aquaculture**. V.41, p.395-398, 1984.
- CHRISTOFFELS A., KOH EG.L., CHIA J.M., BRENNER S., APARICIO S., VENKATESH B. Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes. *Mol Biol Evol* 2004, 21:1146-1151.
- COPELAND, D. E; FITZJARRELL, A. T. The anatomy and fine structure of the eye in teleost. III. The structure of the lentiform body in *Fundulus grandis*. **Experimental Eye Research**, s.l, V.21, 6.ed. p.512-521, 1975. ISSN: 0014-4835.
- CHAKRABORTY, C.; HSU, C. H; WEN Z. H.; LIN, C. S.; AGORAMOORTHY, G. Zebrafish: A Complete Animal Model for In Vivo Drug Discovery and Development. **Current Drug Metabolism**, v. 10, n. 2, p.116-124, 2009. ISSN 1389-2002
- CHO G.; HEATH D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquac Res* 31(6):537–546, 2000.
- DJAMGOZ MBA, YAMADA M: Electrophysiological characteristics of retinal neurons; interactions and functional output. In *The Visual System of Fish*. Edited by: Douglas R, Djamgoz MBA. London: Chapman and Hall; 1990:161-210.
- DOWLING J.E. Retina. In: **Encyclopedia of the Human Brain**. Elsevier Science; 2002, p. 217-235.
- DOWLING, J.E. & WERBLIN, F.S. Synaptic organization of the vertebrate retina. *Vision Research*, **3**(Suppl. 3), 1–15. 1971
- EKESTEN, B., KOMÁROMY, A. M., OFRI, R., PETERSEN-JONES, S. M., e NARFSTRÖM, K. Guidelines for clinical electroretinography in the dog: 2012 update. *Documenta Ophthalmologica*, 127(2), 79–87. 2013. <https://doi.org/10.1007/s10633-013-9388-8>

- EBREY, T.; KOUTALOS, Y. Vertebrate Photoreceptors. **Progress in Retinal and Eye Research**, v.20, 1.ed. p.49-94, 2001. Disponível em:[https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(00\)00014-8](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(00)00014-8).
- ESCOBAR-CAMACHO, D.; CARLETON, K. L. Sensory modalities in cichlid fish behavior. **Curr. Opin. Behav. Sci.**v. 6, p.115-124. doi:10.1016/j.cobeha.2015.11.002.
- FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. **Fish adaptations**. New York: Science Publishers,p. 285-308, 2003.
- FERNALD R.D. The optical system of fishes. In: Douglas, R.H, Djamgoz, M.B.(e.d)**The Visual System of Fish**. London:Springer, 1990, P.45–61.
- FLEMING G.J. et al. Evaluation of propofol and medetomidine-ketamine for short-term immobilization of Gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser oxyrinchus desotii*). **Journal Of Zoo And Wildlife Medicine**. v.34, p.153–158. 2003.
- FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia do apaiari, *Astronotus ocellatus* (Spix) (Pisces, Cichlidae), em cativeiro. Aparelho de reprodução. Hábitos de desova e prolificidade. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 467-484, 1982.
- FRANCKE, M *et al.* Grouped retinæ and tapetal cups in some Teleostian fish: Occurrence, structure, and function.**Progress in Retinal and Eye Research**, Germany, v.38,p.3-69,2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.10.001>
- FREEMAN, K.S.; GOOD, K.L.; KASS, P.H.; PARK, S.A.; NESTOROWICZ, N.; OFRI, R. Effects of chemical restraint on electroretinograms recorded sequentially in awake, sedated, and anesthetized dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 74. n. 7. p. 1036-1042. 2013.
- FRYER G, ILES TD: The Cichlid Fishes of the Great Lakes of Africa: Their Biology and Evolution Neptune City, NJ: T. F. H. Publications; 1972.
- GAČIĆ, Z., MILOŠEVIĆ, M., MIĆKOVIĆ, B., NIKČEVIĆ, M., & DAMJANOVIĆ, I. Effects of acute cooling on fish electroretinogram: A comparative study. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology**. 184, 150–155, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.03.002>
- GELATT, K. N. Ophthalmic Structures. In: **Essentials of Veterinary Ophthalmology**. USA: WILEY-BLACKWELL, 2014, 3th ed., p. 12-39.
- GHOLOUPOURKANANI H.; AHADIZADEH S. Use of propofol as an anesthetic and its efficacy on some hematological values of ornamental fish *Carassius auratus*. Springer Plus 2: 1–5, 2013.
- GOTO, A. Y. Estudo da produção, composição e drenagem dos meios oculares de *Carassius auratus* (Cyprinidae) variedades padrão de *demekin*. Tese (Mestrado em Ciências)-Psicologia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2016, p.17.
- GRIFFITHS, S. P. The use of clove oil as an anesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 57, n. 6, p. 1453-1464, 2000.
- GROVER, D.A. & ZIGMAN, S. Funduscopy morphology of selected marine animals as photographed *in vivo*. **Canadian Journal of Zoology**, 62, 563–566, 1984.
- GURGEL, J. J. S.; FREITAS, J. V. F. Aproveitamento final do pescado dos açudes do Nordeste brasileiro após beneficiado. Boletim do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas, Fortaleza, v. 21, n. 1, p. 37-42, 1973.
- GUSTAVSEN, K. A. *et al.*Ocular anatomy of the black pacu (*Colossoma macropomum*): gross, histologic, and diagnostic imaging.**Veterinary Ophthalmology**, London,v.21, n.5, p.507-515, 2018.DOI:10.1111/vop.12539.
- HÄRER, A.;KARAGIC, N.;MEYER, A.;DOWDALL J. T. Reverting ontogeny: rapid phenotypic plasticity of colour vision in cichlid fish. **R. Soc. open sci.** Germany,V.6, p.1-7.Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.190841>.
- HARRIS, M. P., HENKE, K., HAWKINS, M. B; WITTEN, P. E. Fish is Fish: The use of experimental model species to reveal causes of skeletal diversity in evolution and disease. **Journal of Applied Ichthyology**,v. 30,4.ed,p. 616–629, 2014.Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jai.12533>.

- HELFMAN, G.S., *et al.* Sensory Systems. In: HELFMAN, G.S., *et al.* (Ed.). **The Diversity of Fishes Biology, Evolution, and Ecology**. 2.ed. Hong Kong: Wiley-Blackwell, 2009, cap. 6, p. 84-87.
- HENDERSON, Z. Distribution of ganglion cells in the retina of adult pigmented ferret. **Brain Research**, **358**, 221–228, 1985.
- HERRON, W.L., *ET AL.* Vitamin A deficiency induced “rod thinning” to permanently decrease the production of rod outer segment material. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, **13**, 54–59, 1974.
- HIBBARD, E. Grid patterns in the retinal organization of the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. **Experimental Eye Research**, v. 12, n. 2, p. 175 - 180, 1971. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(71\)90087-X](https://doi.org/10.1016/0014-4835(71)90087-X)
- HILDEBRAND, M. **Analysis of vertebrate structure**, 2.ed. New York: Wiley & Sons, 1982.
- HOLDEN, A. L. Handbook of Sensory Physiology. **British Journal of Ophthalmology**. V. 63, n. 7, 1979. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bjo.63.7.528>
- HOLDER, G. E. Localizing lesions in the Visual System. In: HECKENLIVELY, J. R.; ARDEN, G. B. **Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision**. 2 ed. Massachusetts: MIT Press, 2006. p. 505-518.
- HUETER, R.E., MANN D.A, MARUSKA K.P., SISNEROS J.A., DEMSKI L.S. Sensory biology of elasmobranchs. In: Carrier JC, Musick JA, Heithaus MR. (Ed.). **Biology of sharks and their relatives**. FL: CRC Press, Boca Raton, 2004, p. 325-368.
- INOUE, L.A.K.A., *et al.* Avaliação dos anestésicos 2-fenoxietanol e benzocaína no manejo do matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Biodivers Pampeana**, v. 2, p. 10-15, 2004.
- JAFFE, N.S. **The Vitreous in Clinical Ophthalmology**, 1st ed. St. Louis, MO: CV Mosby, 1969.
- JIANG, Z., YANG, J., PURPURA, L.A., *et al.* Glycinergic feedback enhances synaptic gain in the distal retina. **Journal of Physiology**, **592**, 1479–1492. 2014.
- KERN, T.J.; COLITZ, C.M.H. Exotic Animal Ophthalmology. In: GELATT, K. N. (ed.) **Veterinary Ophthalmology**. 3.ed. USA: WILEY-BLACKWELL, 1999, p. 1750-1819.
- KOCHER TD: Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nature Reviews Genetics* 2004, 5:288-298.
- KOLB, H. Amacrine cells of the mammalian retina: neurocircuitry and functional roles. **Eye**, **11**, 904–923, 1997.
- KOHN, A.; FERNANDES, B. M. M.; MACEDO, B.; ABRAMSON, B. Helminths parasites of freshwater fishes from Pirassununga. **Memórias do 68 Instituto Oswaldo Cruz**, São Paulo v. 80, 3.ed. 3, p. 327-336, 1985.
- KULLANDER S.O. **Cichlid fish of the Amazon River drainage of Peru**. Swedish Museum of Natural History. Stockholm: Sweden, 1986, p. 431.
- LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P.D. “Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. **Nat. Rev. Genet.**, v. 8, n. 5, p. 353-367, 2007. Doi: 10.1038/NGR2091
- LAWRENCE C, ADATTO I, BEST J, JAMES A, MALONEY K. Generation time of zebrafish (*Danio rerio*) and medakas (*Oryzias latipes*) housed in the same aquaculture facility. **Lab. Anim.** New York: 2012; cap. 41, p. 158–165. DOI: 10.1038 / laban0612-158.
- LE BAIL P.-Y., KEITH P. & PLANQUETTE P. 2000. — *Atlas des poissons d'eau douce de Guyane: Tome 2, fascicules 1 & 2*. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 307 + 286p, 2000 (Patrimoines naturels; 43).
- LI, Y. M. *et al.* Local Anesthetics Inhibit Substance P Binding and Evoked Increases in Intracellular Calcium Ca^{2+} . **Anesthesiology**, v. 82, p. 166–173. 1995.
- LISNEY T.J., STUDD E., HAWRYSHYN C.W. Electrophysiological assessment of spectral sensitivity in adult Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: evidence for violet sensitivity. *J Exp Biol* 2010, 213:1453-1463.
- LYNCH, G.L., HOFFMAN, A.; BLOCKER, T. Central corneal thickness in koi fish: effects of age, sex, body length, and corneal diameter. **Veterinary Ophthalmology**, v. 10, n. 4., p. 211–215, 2007.

- MADER, D.R; Divers, S.J., Current therapy in reptile medicine and surgery. St Louis (MO):Elsevier. 2014
- MAEHARA, S.; ITOH, N.; WAKAIKI, S.; YAMASAKI, A.; TSUZUKI, K.; IZUMISAWA, Y. The effects of cataract stage, lens-induced uveitis and cataract removal on ERG in dogs with cataract. **Veterinary Ophthalmology**, v. 10. n. 5. p. 308–312. 2007.
- MASLAND, R.H. The tasks of amacrine cells. **Vision Neuroscience**, **29**, 3–9, 2012.
- MARCHIAFAVA, P. Cell coupling in double cones of the fish retina. Proc. R. Soc. Biol.v. 226, n.1243,p.211-215, 1985. ISSN:0080-4649.
- MARMOR, M. F. et. al. ISCEV standard for full-field clinical electroretinography; 37 **Doc ophthalmol**, 2009, 118: p. 69-77.
- MARSHALL, N. J. and Vorobyev, M. (2003). The design of color signals and color vision in fishes. In: COLLIN, S. P. ;MARSHALL, N. J. **Sensory Processing in Aquatic Environments**. New York: Springer,2003, p.194-222.
- MARSHALL, N. J. K. JENNINGS, W. N. MCFARLAND, E. R.; LOEW, G. S. Losey "Visual Biology of Hawaiian Coral Reef Fishes. II. Colors of Hawaiian Coral Reef Fish," *Copeia*, 2003, p.455-466, Disponível em:<https://doi.org/10.1643/01-055>.
- MCCULLOCH DL, MARMOR MF, BRIGELL MG, HAMILTON R, HOLDER GE, TZEKOV R, BACH M. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update). **Doc Ophthalmol**. 2015 Feb;130(1):1-12. doi: 10.1007/s10633-014-9473-7. Epub 2014 Dec 14. Erratum in: Doc Ophthalmol. 2015 Aug;131(1):81-3. PMID: 25502644.
- MCFARLAND, W.N., A study of the effects of anaesthetics on the behaviour and physiology of fishes, Publ. Inst. Mar. Sci., v.6, p.22–55. 1959
- MCLAUGHLIN, S.A., GRIZZLE, J.M. & WHITELEY, H. Ophthalmic examination of normal light-adapted and dark-adapted channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Veterinary and Comparative Ophthalmology**, **6**(4), 248–251, 1996.
- MEYER A., SCHARTL M. Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr Opin Cell Biol* 1999, 11:699-704.
- MILLER, S.M. et al. Clinical and cardiorespiratory effects of propofol in the spotted bamboo shark (*Chylloscyllium plagiosum*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v.36(4), p.673-676, 2005.
- MORTAZEVI, Z. et al. Determine of appropriate concentration of propofol anesthetic drug in Benni (*Barbus sharpeyi*). **Iranian Scientific Fisheries Journal**, v.21(2), p.133-142. 2012.
- MUNTZ, W. 'Inert absorbing and reflecting pigments.In:DARTNALL H. J. A(ed.) **Handbook of Sensory Physiology**. Berlin: Springer-Verlag, 1972.p.529–565.
- MUUSZE, B. *et al.* Hypoxia tolerance of Amazon fish. Respiratory and energy metabolism of the cichlid *Astronotus ocellatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: molecular and integrative physiology**, Oxford, v. 120, n. 1, p. 151-156, May 1998.
- NIKLAUS, S., KIRLA, K. T., KRAEMER, T., GROH, K., SCHIRMER, K., & NEUHAUSS, S. Cocaine Accumulation in Zebrafish Eyes Leads to Augmented Amplitudes in the Electroretinogram. **Matters**, 1–4, 2017. <https://doi.org/10.19185/matters.201703000003>
- ODA, A. et al. Physiologic and biochemical assessments of koi (*Cyprinus carpio*) following immersion in propofol. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.245(11) p.1286–1291, 2014.
- OFFRI, R. Diseases of the Retina. In: MAGGS, D. J; MILLER, P. E; OFRI, R. **Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology**.6.ed. Missouri: Elsevier, 2018, p. 347- 389.
- OLLIVIER, F. J., SAMUELSON, D. A., BROOKS, D. E., LEWIS, P. A., KALLBERG, M. E., & KOMÁROMY, A. M. comparative morphology of the tapetum lucidum (among selected species). **Veterinary Ophthalmology**,v. 7.,n.1, p.11 - 22,2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2004.00318.x>
- PAVANELLI, G. C. Sanidade de peixes, rãs, crustáceos e moluscos. In: VALENTI, W. C. *et al.* **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPQ, 2000. p. 208-209.

- PARK, I.S. et al. Effects of Clove Oil and Lidocaine-HCl Anesthesia on Water Parameter during Simulated Transportation in the Marine Medaka, *Oryzias dancena*. **Development & Reproduction**. v.21. p.19-33, 2017.
- PARK I.S.; PARK S.J.; GIL H.W.; NAM Y.K.; KIM D.S. Anesthetic effects of clove oil and lidocaine-HCl on marine medaka (*Oryzias dancena*). *Lab Anim (NY)* 40: 45–51, 2011.
- PARKYN D.C., HAWRYSHYN C.W. Spectral and ultraviolet-polarisation sensitivity in juvenile salmonids: A comparative analysis using electrophysiology. *J Exp Biol* 2000, 203:1173-1191.
- PEICHL, L. Topography of ganglion cells in the dog and wolf retina. **Journal of Comparative Neurology**, 324, 603–620, 1992.
- PORAZINSKI SR, WANG H, FURUTANI-SEIKI M. Essential techniques for introducing medaka to a zebrafish laboratory—towards the combined use of medaka and zebrafish for further genetic dissection of the function of the vertebrate genome. **Methods Mol. Biol.** 2011; 770:211–241.
- RAO, M.B.; DOMINIC, D.; PATTON, J.G. Neurotransmitter-Regulated Regeneration in the Zebrafish Retina. **Stem Cell Reports**, vol. 8, n.4, 2017, p.831–842. doi: 10.1016 / j.stemcr.2017.02.007.
- REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, JR. C. **Check list of the freshwater fishes of south and Central America**. Porto Alegre:EDIPUCRS,2003, p.742.
- ROUBACH R.; CARVALHO GOMES L.; LEˆAO FONSECA F.A.; LUIZ VAL A. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquac Res* 36(11):1056–1061, 2005.
- ROSS, L.G.; ROSS, B. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 3ed. Oxford: Blackwell Science, 2008
- SABBAH S., LARIA R.L., GRAY S.M., HAWRYSHYN C.W. Functional diversity in the color vision of cichlid fishes. *BMC Biol.* 2010 Oct 28;8:133. doi: 10.1186/1741-7007-8-133. PMID: 21029409; PMCID: PMC2988715.
- SALZBURGER W. The interaction of sexually and naturally selected traits in the adaptive radiations of cichlid fishes. *Mol Ecol* 2009, 18:169-185
- SAMUELSON, D.A. Ophthalmic Anatomy. In: GELLAT, K. N.; GILGER, B. C.; KERN, T. J. **Veterinary Ophthalmology**, 5.ed. USA:WILEY-BLACKWELL,2013, cap.2, p.130-154.
- SANTOS, G.M.; MERONA, B.; JURAS, A. A.; JÉGU, M. **Peixes do Baixo Rio Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidrelétrica Tucuruí**. Brasília: Eletronorte,2004, p.216.
- SANTOS, G.M.; FERREIRA, E.J.G., ZUANON, J.A.S. **Peixes Comerciais de Manaus**. Manaus: INPA, 2006, p.144. ISBN: 978-85-211-0049-2
- SIEBECK, U. E., WALLIS, G. M., LITHERLAND, L., GANESHINA, O; Vorobyev, M. Spectral and spatial selectivity of luminance vision in reef fish. **Front.Neural Circuits**.v 8, n.118, 2014.doi: 10.3389 / fncir.2014.00118.
- SILVEIRA, T. R.; SCHINEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudo de doenças humanas. **Cien. Cult.**, v. 64, n.2, 2012, p.4-5. ISSN 009-6725.
- SHAND J., DAVIES W.L., THOMAS N., BALMER L., COWING J.A., POINTER M., CARVALHO L.S., TREZISE A.E.O., COLLIN S.P., BEAZLEY L.D., HUNT D.M. The influence of ontogeny and light environment on the expression of visual pigment opsins in the retina of the black bream, *Acanthopagrus butcheri*. *J Exp Biol* 2008, 211:1495-1503.
- SOARES, M.G.M.; COSTA, E.L.; SIQUEIRA-SOUZA, F.K.; ANJOS, H.D.B.; YAMAMOTO, K.C.; FREITAS, C.E.C. **Peixes de lagos do médio Rio Solimões**. 2.ed. Manaus: Instituto Piatam, 2008 p.160.ISBN: 8574012643
- STONE, J. & KEENS, J. Distribution of small and medium sized ganglion cells in the cat's retina. *Journal of Comparative Neurology*, 192, 235–246, 1980.
- TOOMEY, M. B., & CORBO, J. C. Evolution, development and function of vertebrate cone oil droplets. **Frontiers in Neural Circuits**. 2017, p.1–17. Doi: 10.3389.
- TOPIC POPOVIC, N. et al. Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. **Journal of Applied Ichthyology**. v.28, p,553–564. 2012.

TURNER GF, SEEHAUSEN O, KNIGHT ME, ALLENDER CJ, ROBINSON RL: How many species of cichlid fishes are there in African lakes? *Mol Ecol* 2001, 10:793-806.

VALENTIM A.M.; FÉLIX L.M.; CARVALHO L.; DINIZ E.; ANTUNES L.M. A New Anaesthetic Protocol for Adult Zebrafish (*Danio rerio*): Propofol Combined with Lidocaine. *PLoS One*. 2016 Jan 25;11(1):e0147747. doi: 10.1371/journal.pone.0147747. PMID: 26808508; PMCID: PMC4725851.

WEBB, A.; MAUGHAN, M.; KNOTT, M. **Pest fish profiles. *Astronotus ocellatus* – Oscar.** James Cook: ACTFR, 2007, p.3.

WEILER R, POTTEK M, HE S, VANEY DI. Modulation of coupling between retinal horizontal cells by retinoic acid and endogenous dopamine. ***Brain Res Brain Res Rev***. 2000; 32:121-9.

YOKOYAMA S., YOKOYAMA R. Adaptive evolution of photoreceptors and visual pigments in vertebrates. *Annu Rev Ecol Syst* 1996, 27:543-567.

ZAHL, I. H. et al. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. ***Fish Physiology and Biochemistry***, v.38(1), p.201–218. 2011

5 – ARTIGOS CIENTÍFICOS

ARTIGO 1: Peixe Oscar (*Astronotus ocellatus*): modelo experimental para análises eletrorretinográficas

Stéphanie Ingrand Vieira de **Araújo**^{1*}, Bruno Daby Figuerêdo de **Souza**², Fabrício Bezerra de **Sá**³.

1: Mestrando do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil. **S.i.v.araujovet@gmail.com**;

2: Mestranda do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

3: Professor Associado IV do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

Os peixes vem sendo cada vez mais empregados como modelos experimentais na oftalmologia devido similaridades estruturais e celulares da retina com outros vertebrados, como os mamíferos, e elevada capacidade de regenerar tecidos. O peixe Oscar, *Astronotus ocellatus*, é um ciclídeo que vive em ambientes claros de água calma e rasa, alimentando-se de crustáceos, moluscos e peixes menores, apresenta grande diversidade de cores, que condiz com a sua estrutura visual. A eletrorretinografia é um método não invasivo e bem compreendido que, através de eletrodos, capta a atividade elétrica da retina quando estimulada por uma fonte de luz, com frequência, intensidade e comprimento de onda conhecidos, que confere um meio promissor para compreensão da visão e componentes da retina (cones e bastonetes) de forma prática. Foram utilizados 16 peixes, sob anestesia geral obtida com um meio contendo lidocaína 10% (5µg/ml) e propofol 1% (50 µg/ml) e mantidos sob um fluxo contínuo com evasão de 780ml/min (mililitro por minuto) com os anestésicos na mesma proporção. Os registros fotópicos a 2Hz e Flickers a 30Hz foram feitos nos 16 animais e quatro deles foram selecionados para avaliação de respostas multifrequenciais utilizando estímulos de comprimentos de onda que variaram do ultravioleta ao infravermelho. Foi possível gravar as respostas em todos os animais, observando os principais componentes da ERG em seus traçados (onda a e onda b) e houve resposta satisfatória ao estímulo Flicker. As respostas obtidas com os estímulos de comprimentos de onda diferentes mostraram maior variação nas respostas ao ultravioleta e não se obteve registros ao se usar o estímulo infravermelho. Pôde-se observar também que todos os valores de tempo implícitos e amplitudes das ondas mostraram distribuição estatística normal. Vale ressaltar que todos os peixes se recuperaram da anestesia e não se observou nenhuma morte após o procedimento. O presente estudo demonstrou um protocolo simples e rápido de

obtenção de respostas retinianas em *Astronotus ocellatus* anestesiados, permitindo a recuperação de todos os animais após os exames. Tal fato favorece o emprego da espécie e do protocolo estudado em pesquisas de longo prazo, investigações a campo e a avaliação de doenças progressivas.

Palavras chaves: aquarismo, eletrofisiologia visual, oftalmologia veterinária, peixe ornamental.

ABSTRACT

Fish have been increasingly used as experimental models in ophthalmology due to the structural and cellular similarities of the retina with other vertebrates, such as mammals, and their high capacity to regenerate tissues. The Oscar fish, *Astronotus ocellatus*, a cichlid that lives in clear environments of calm, shallow water, feeding on mollusc crustaceans and smaller fish, has a great diversity of colors, which matches its visual structure. Electroretinography is a non-invasive and well-understood method that, through electrodes, captures the electrical activity of the retina when stimulated by a light source, with known frequency, intensity and wavelength, which provides a promising means for vision compression and retinal components (cones and rods) in a practical way. Sixteen fish were used, under general anesthesia obtained with a medium containing 10% lidocaine (5µg/ml) and 1% propofol (50 µg/ml) and maintained under a continuous flow with evasion of 780ml/min (milliliter per minute) with the anesthetics in the same proportion. Photopic recordings at 2Hz and Flickers at 30Hz were made in 16 animals and four of them were selected to evaluate multifrequency responses using stimuli with wavelengths ranging from ultraviolet to infrared. It was possible to record the responses in all animals, observing the main components of the ERG in their tracings (wave a and wave b) and there was a satisfactory response to the Flicker stimulus. The responses obtained with stimuli of different wavelengths showed greater variation in the responses to ultraviolet and no records were obtained when using the infrared stimulus. It could also be observed that all implicit time values and wave amplitudes showed normal statistical distribution. It is noteworthy that all fish recovered from anesthesia and no deaths were observed after the procedure. The present study demonstrates a simple and fast protocol for obtaining retinal responses in anesthetized *Astronotus ocellatus*, allowing the recovery of all animals after the exams. This fact favors the use of the studied species and protocol in long-term research, field investigations and also the evaluation of progressive diseases.

Key words: aquarium fish, ornamental fish, veterinary ophthalmology, visual electrophysiology.

INTRODUÇÃO

Os peixes vem sendo cada vez mais empregados como modelos experimental nas últimas décadas devido as grandes similaridades estruturais e celulares da sua retina com outros vertebrados, como os mamíferos, e elevada capacidade de regenerar tecidos (RAO et al., 2017); como no caso do *Zebrafish* (*Danio rerio*), que já se dispõe de várias ferramentas genéticas para compreensão do desenvolvimento da espécie além de inúmeras semelhanças entre o seu sistema visual e o humano (NADOLSKI et al., 2021).

O peixe Oscar, *Astronotus ocellatus*, pertencente à família dos ciclídeos, é uma espécie originária da bacia Amazônica, na América do Sul. Apresenta corpo elíptico, cabeça com olhos grandes lateralizados, tendo comprimento total de até 35 cm (FONTENELE, 1982; SOARES et al., 2011). Habita ambientes claros de água calma e rasa, tal como várzeas e pântanos, alimentando-se de crustáceos moluscos e peixes menores. Apresenta boa adaptabilidade a ambientes diversos podendo suportar grandes variações de temperatura e com baixa concentração de oxigênio (MUUSZE et al., 1998; FELDBERG; PORTO; BERTOLLO, 2003; SOARES et al. 2011).

Os ciclídeos apresentam grande variedade de espécies é uma das famílias que mais evoluiu a sensibilidade visual (CARLETON et al., 2016; ESCOBAR-CAMACHO et al., 2017). O habitat colorido e iluminado, a alimentação variada, e até mesmo a coloração sexualmente dimórfica de seus corpos, retratam a grande importância da visão para a vida destes espécimes (PRICE et al., 2008; SEEHAUSEN et al., 2008; SELZ et al., 2014).

A análise eletrofisiológica da retina por meio do exame de Eletrorretinografia é um método não invasivo e bem compreendido que, através de eletrodos, capta a atividade elétrica da retina quando estimulada por uma fonte de luz. Seus resultados podem ser variáveis, de acordo com as condições ambientais, tipo de estímulo, comprimento de onda, intensidade e frequência. O ERG de vertebrados origina principalmente 2 ondas, uma “a” negativa, sugerindo atividade fotorreceptora, e uma “b” positiva, atividade das células bipolares ON e müller (DOWLLING, 1987, EKESTEN et al., 2013). Dessa forma, as análises de Eletrorretinografias trazem complemento a investigação do comportamento das alterações na retina, mostrando-se como uma ferramenta de fácil acesso e alta sensibilidade identificando e quantificando degenerações retinianas em sua totalidade ou em células isoladas, como cones e bastonetes. (BROCKERHOFF et al., 1995; NEUHAUSS et al., 1999).

Assim, estudos que favoreçam a compreensão do funcionamento da retina através de métodos eletrofisiológicos não invasivos tem um potencial promissor para compreensão da visão de forma prática e continua (MAKHANKOV et al., 2004). Portanto, o presente estudo traz um modelo experimental de realização do ERG em peixe vivo sob anestesia geral. Contribuindo para o fomento de estudos sobre a visão

por meio do ERG nesta espécie e em outros seres aquáticos, criando assim um modelo investigativo que pode ser empregado para análises toxicológicas, fisiológicas e estudos sobre visão.

MATERIAL E MÉTODOS

Licença CEUA/SISGEN

Vale salientar que os experimentos do presente estudo foram realizados após a obtenção da licença da Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco nº118/2019; o estudo também conta com registro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN nº A7AAAEC).

Animais

Foram utilizados 16 animais da espécie *Astronotus ocellatus* criados e mantidos na Estação de Aquicultura Prof. Johei Koike, situada na Universidade Federal Rural de Pernambuco, em Recife- PE. Os peixes tinham em média 3 a 4 meses de vida e comprimento total médio de 24 cm. Após a captura, os animais foram avaliados clinicamente e foi considerado como critério de exclusão qualquer alteração anatômica ou fisiológica que tenham comprometido o sistema visual.

Anestesia

Aclimatização

Os animais foram postos em tanques comunitários com aeração constante sobre as mesmas condições de temperatura ($27^{\circ}\text{C}\pm 4$) e pH ($6,2\pm 0,4$), para serem adaptados ao ambiente do laboratório. Não houve adaptação ao escuro. Após o período de 2 horas de aclimatização deu-se início ao processo anestésico. A água utilizada em todo o experimento, desde a indução a recuperação foi proveniente de seu habitat na Estação.

Procedimento

Indução

Um peixe por vez foi colocado no tanque de indução (TI) transparente de 10 litros, contendo $5\mu\text{g/ml}$ (microgramas por mililitro) de lidocaína 10% e $50\mu\text{g/ml}$ (microgramas por mililitro) de propofol 1% (VALENTIM et al., 2016). Observado a evolução dos estágios anestésicos, seguindo com as atividades após se observar a perda do equilíbrio e a ausência de respostas a estímulo nociceptivo realizado por pressão com bastão na nadadeira caudal.

Manutenção

Após ser gentilmente removido do TI, o peixe foi colocado sobre uma canaleta com espuma absorvente, seguindo com a intubação por via orobranquial com um tubo de silicone de 7mm diâmetro, ligado à uma bomba submersa em um tanque contendo propofol e lidocaína diluídos na mesma proporção da indução. O fluxo de água foi contínuo com evasão de 780ml/min (mililitro por minuto) para realização do ERG.

Recuperação

Ao término do exame, o peixe foi colocado em tanque de recuperação (TR) contendo apenas água limpa contando com aeração, temperatura ($27^{\circ}\text{C}\pm 4$) e pH ($6,2\pm 0,4$) constantes. Após recuperação, os animais foram acondicionados em tanques de observação na Estação de Aquicultura por 1 mês para avaliação de possíveis afecções ou morte tardia.

Eletrorretinografia

A Eletrorretinografia, foi realizada nos 16 peixes sob a anestesia geral em um sistema que os permitiu mantê-los emersos da água durante todo o procedimento. Não foi empregado o uso de midriáticos. Quanto ao protocolo seguiu-se as diretrizes prescritas pela International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (MCCULLOCH et al., 2015).

Equipamento

No registro e estimulação foi utilizado o equipamento Nihon Kohdem, Neuropack 2 MEB-7102 A/k, com o seu sinal digitalizado pelo DATAQ DI-158U, por meio de um cabo RS232 com dois canais acoplado a um notebook Acer Aspire 4732Z-4620 e um foto-estimulador contando com um diodo emissor de luz (LED) de cor branca 7000k com angulação de 20° para a maioria dos exames. Vale ressaltar que quatro animais distintos foram submetidos a estímulos com diferentes comprimentos de onda.

Registro

Eletrodos

Utilizou-se, para o exame dois eletrodos monopares subdérmicos da Ambu® modelo Neuroline subdermal 12x0,4mm e eletrodo monopolar de córnea da Universo AS, modelo ERG-jet™, conectados ao Electrode Junction Box JB-711B do Neuropack 2 MEB-7102^a/k e com filtro de 300Hz do tipo passa banda. Os subdérmicos foram posicionados cranialmente a altura da nadadeira dorsal (eletrodo referência) e na altura da nadadeira caudal (eletrodo terra) e o de córnea (eletrodo ativo) em contato com a córnea do olho examinado (Figura 4).

Preparação do Animal

Após estabilização e manutenção do paciente sobre anestesia, foi realizado a dessensibilização corneana com uma gota de cloridrato de proximetacaína 5mg/ml (Anestalcon®) e lubrificação com metilcelulose 2% (Ophthalmos®) para a colocação do eletrodo ativo. Em seguida, foram inseridos os eletrodos subdérmicos nas regiões indicadas. Vale ressaltar que todos os testes foram feitos apenas no olho direito de cada animal.

Estímulo

O estímulo de LED utilizado foi o de cor branca 7000k com angulação de 20° para realização do ERG-ct fotópica, em dois protocolos distintos cadenciados: resposta fotópica com estímulo de intensidade de 3cd.s/m² e frequência de 2 Hz e a resposta Flicker sob 3cd.s/m² a 30Hz.

Quatro animais diferentes foram selecionados para avaliação de respostas multifrequenciais utilizando a frequência de 2Hz para cada comprimento de onda do ultravioleta ao infravermelho (Tabela 2).

Tabela 2 - Representação da ordem dos registros de acordo com os comprimentos de onda e a descrição dos LEDs utilizados na avaliação da sensibilidade espectral.

Cor de iluminação	Comprimento de onda (nm)
Ultravioleta	405
Azul	470
Verde	527
Amarelo	591
Vermelho	626
Infravermelho	940

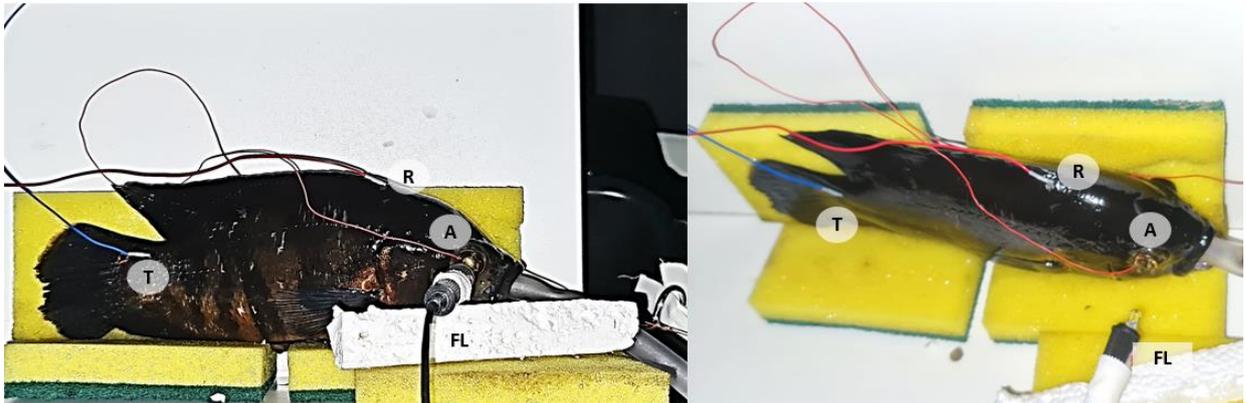
nm: nanômetros

Coleta de dados

A avaliação dos dados foi feita considerando as amplitudes em microvolts (μ V) e os tempos implícitos (latência) em milissegundos (ms) para as ondas 'a' e 'b'. Para a formulação dos resultados foi analisado 300 ms do tempo do exame e considerado: amplitude de onda "a", que configura o intervalo entre a linha base e a deflexão da onda "a"; o tempo implícito da onda "a", que configura o intervalo entre o estímulo e o aparecimento da primeira onda (onda "a"); amplitude de onda "b", que consiste no intervalo entre a onda "a" e o pico da onda "b"; tempo implícito de onda "b" que consiste intervalo entre o estímulo e o aparecimento da onda "b" (Figura 5).

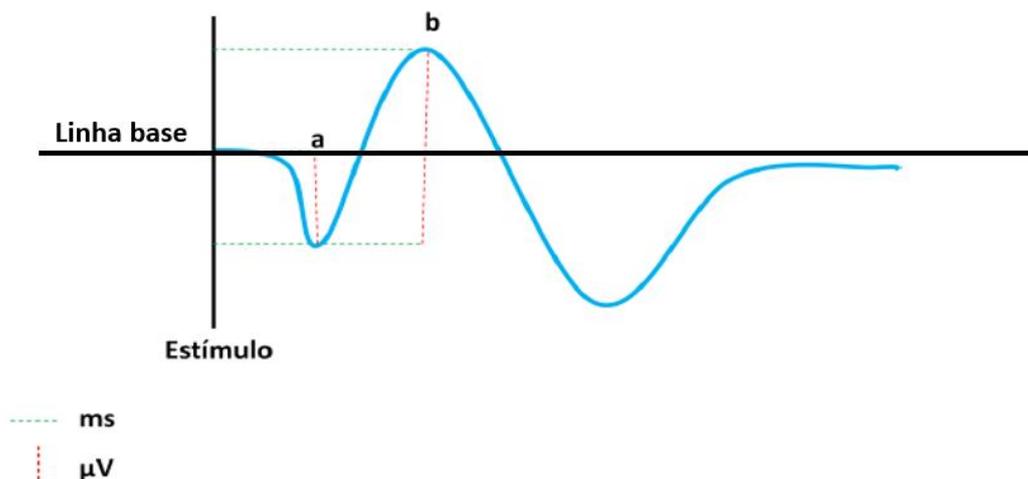
Os valores de Tempo entre Picos e amplitudes das respostas Flickers foram mensuradas de forma independente (pico a pico), obtendo-se três valores de cada parâmetro em cada traçado e considerando como valor final para o indivíduo a média destas mensurações.

Figura 4 - Peixe oscar posicionado para realização do ERG. A: Eletrodo ativo, R: Eletrodo referência, T: Eletrodo terra, FL: Fonte luminosa, led branco.



Fonte: ARAÚJO, 2020.

Figura 5 - Traçado demonstrando as ondas "a" e "b". Tracejado verde: tempo implícito de onda "a" e "b"; Tracejado vermelho: amplitude de onda "a" e "b".



Fonte: ARAÚJO, 2020.

Avaliação estatística

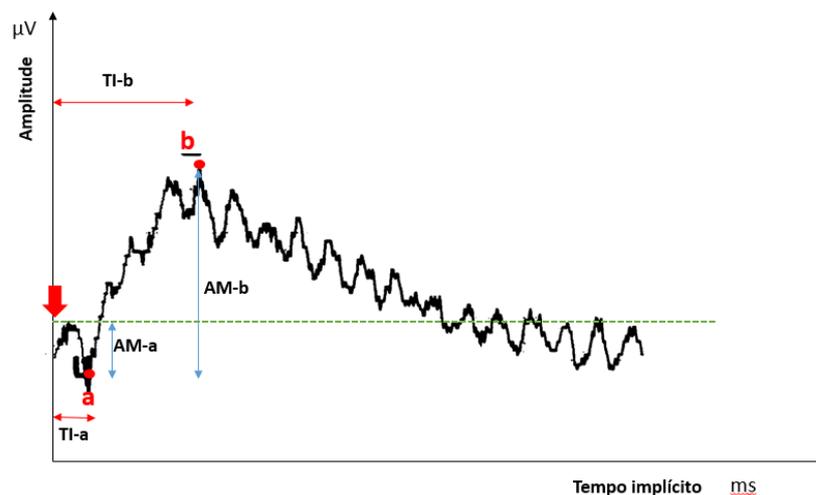
Os dados coletados foram analisados no programa Statistica versão 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Inicialmente foi realizada avaliação descritiva agrupando os dados em tabelas e calculando os valores de média e desvio padrão. Para teste de normalidade, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk com nível de significância de 5% para cada parâmetro.

Resultados

O protocolo anestésico e o sistema de manutenção do peixe sob anestesia geral foram satisfatórios para realização dos exames, que duraram em média de 20 minutos. O tempo médio para indução anestésica foi 3 minutos e o tempo de recuperação foi 60 minutos.

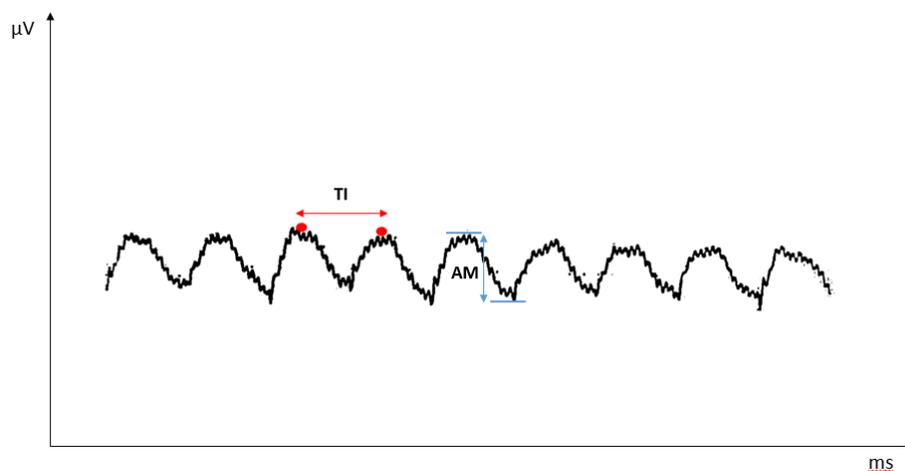
Foi possível a realização da Eletroretinografia, registros fotópicos (Figura 6) e Flicker (Figura 7) apesar da interferência fisiológica nos traçados (ruído elétrico) possivelmente oriundo dos batimentos cardíacos e movimentação opercular (Figura 8). Todos os animais tiveram boa recuperação após a anestesia, e retornaram à Estação de Aquicultura Prof. Johei Koike, não havendo mortes ou problemas de qualquer natureza durante o período observado.

Figura 6 - Traçado obtido com o protocolo Fotópico do exame de ERG-ct do peixe Oscar. Esquema de mensurações da Amplitude, azul (AM-a, amplitude da onda "a"; AM-b, amplitude da onda "b") e do Tempo implícito, vermelho (TI-a, tempo implícito da onda "a"; TI-b, tempo implícito da onda "b"). Linha tracejada verde: linha base, 0. Seta vermelha: Estímulo luminoso.



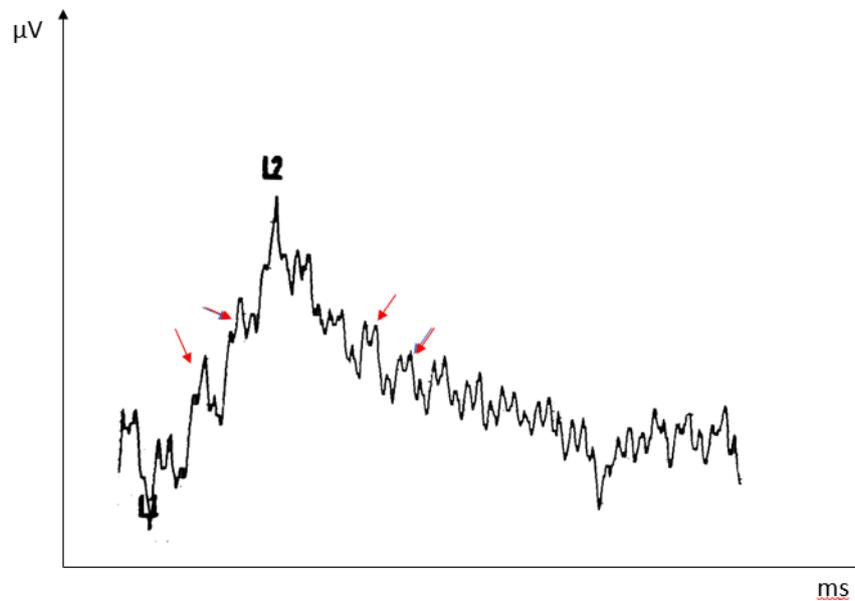
Fonte: ARAÚJO, 2020.

Figura 7 - Traçado Flicker do exame de Eletroretinografia do peixe Oscar. Vermelho: Esquema de mensuração do Tempo Implícito (TI); Azul: esquema de mensuração da amplitude (AM).



Fonte: ARAÚJO, 2020.

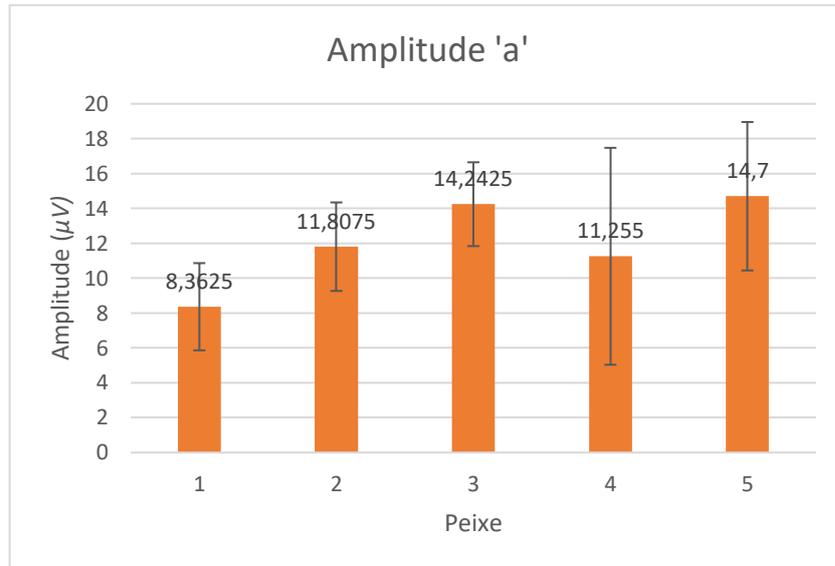
Figura 8 - Traçado Fotópico demonstrando os ruídos fisiológicos (setas vermelhas) do peixe mesmo quando anestesiado.



Fonte: ARAÚJO, 2020.

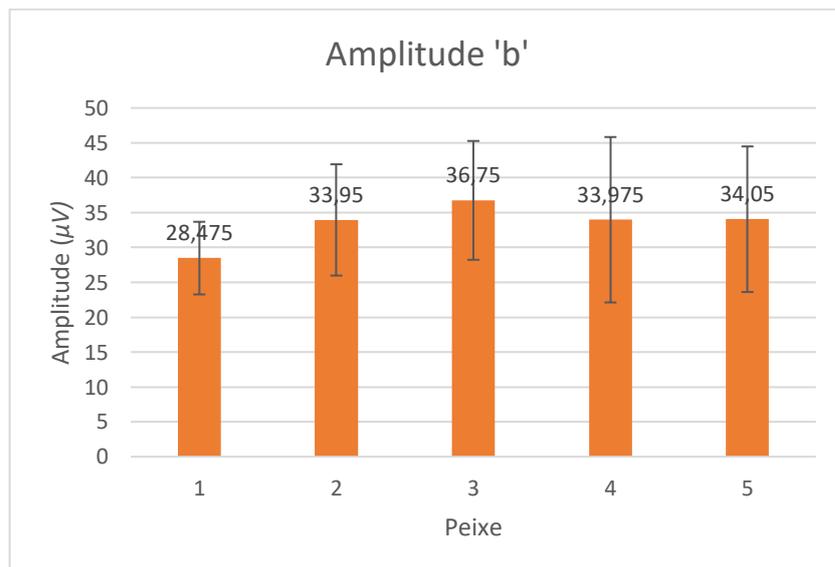
Os dados demonstrados em gráfico da amplitude (Figura 9 e 10) e do tempo implícito (Figura 11 e 12) das ondas “a” e “b” das respostas fotópicas (Tabela 3) e os valores de amplitudes e tempo entre picos da resposta *Flicker* (Tabela 4) foram avaliados quanto sua distribuição através do teste de Shapiro-Wilk, sendo observado comportamento normal dos valores no nível de significância de 5%. Os dados obtidos com os estímulos com variação do comprimento de onda também mostraram distribuição normal, havendo maior variação para o estímulo ultravioleta, mas sem diferença estatística significativa entre eles. Não se observou resposta eletrorretinográfica para o estímulo de 940nm (infravermelho).

Figura 9 - Gráfico demonstrando os valores de amplitude em μV da onda "a" nas respostas à estímulos luminosos em cada peixe do registro fotópico.



Fonte: ARAÚJO, 2020.

Figura 10 - Gráfico demonstrando os valores de amplitude em μV da onda "b" nas respostas à estímulos luminosos em cada peixe do registro fotópico.



Fonte: ARAÚJO, 2020.

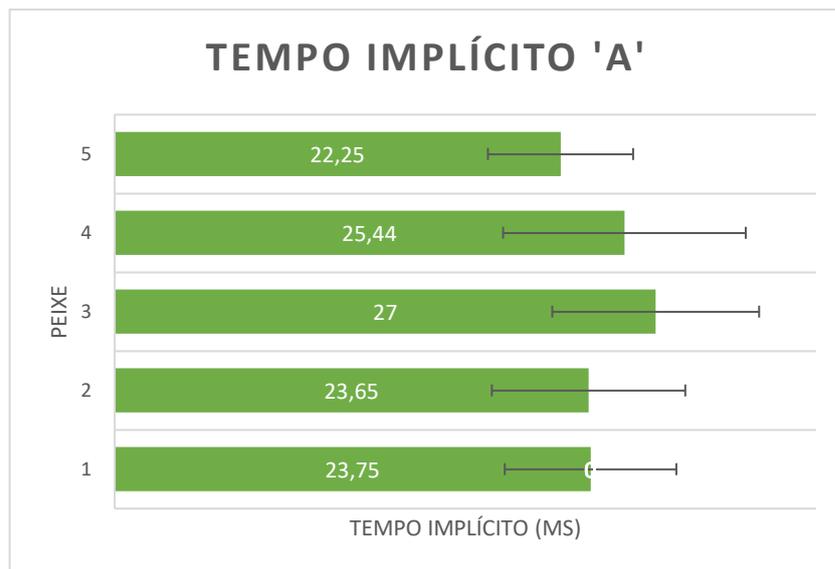
Tabela 3 - Média e Desvio Padrão dos valores de tempo implícito e amplitude do exame ERG, protocolo Fotópica.

		FOTÓPICA (2HZ)
TEMPO IMPLÍCITO	Onda 'a'	18,60 \pm 5,75
	Onda 'b'	71,75 \pm 13,06
AMPLITUDE	Onda 'a'	8,54 \pm 3,89
	Onda 'b'	31,75 \pm 12,67

Tabela 4 - Média e Desvio Padrão dos valores de tempo implícito e amplitude do exame Flicker.

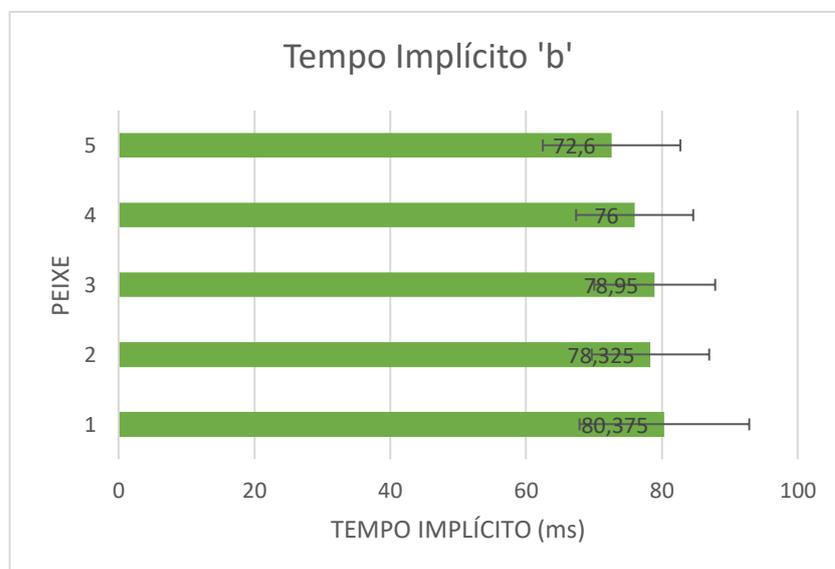
FLICKER (30HZ)	
TEMPO IMPLÍCITO	33,69 ± 0,74
AMPLITUDE	11,70 ± 4,90

Figura 11 - Gráfico demonstrando os valores de tempo implícito em ms da onda "a" nas respostas à estímulos luminosos em cada peixe do registro fotópico.



Fonte: ARAÚJO, 2020.

Figura 12 - Gráfico demonstrando os valores de tempo implícito em ms da onda "b" nas respostas à estímulos luminosos em cada peixe do registro fotópico.



Fonte: ARAÚJO, 2020.

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra um protocolo simples e rápido de obtenção de respostas ERG-ct em *Astronotus ocellatus* anestesiados, permitindo a recuperação de todos os animais após os exames. Tal fato favorece o emprego da espécie e do protocolo estudado em pesquisas de longo prazo, investigações a campo e também a avaliação de oftalmopatias progressivas por exemplo.

Diversas situações no manejo de animais aquáticos requerem o uso de sedativos ou anestésico para evitarem ou minimizarem os efeitos do estresse e permitirem intervenções mais invasivas, como no caso de cirurgias e coletas de materiais biológicos (BAYLEY et al., 2013). O agente anestésico mais empregado em peixes é o tricaina metano sulfonato (MS-222) que pode atuar mais como um bloqueador muscular do que anestésico, induzindo efeitos adversos como redução da frequência cardíaca e, conseqüentemente, alta mortalidade, principalmente em longas exposições (VALENTIM et al., 2016). Além disso, há relatos de que o MS-222 pode apresentar retinotoxicidade em humanos, anfíbios e peixes (RAPP e BASINGER, 1982; SLADKY, 2001; BAYLEY et al., 2013), apesar de estudos recentes demonstrarem que os efeitos tóxicos não foram observados a curto prazo em carpas (*Cyprinus carpio*) (BAYLEY et al., 2013).

O propofol é um agente hipnótico de curta ação que permite uma indução anestésica suave e uma rápida recuperação com poucos efeitos cumulativos. Seu uso já foi feito com sucesso e notável segurança desde peixes pequenos como o *Danio rerio* (VALENTIM et al., 2016) até tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (OBIRIKORANG et al., 2020). Já a lidocaína é um agente analgésico bloqueador dos canais de sódio que já foi empregado com grande margem de segurança em peixes ornamentais como o *Oryzias dancena* (PARK et al., 2017) A combinação desses dois fármacos já foi empregada em estudos de anestesia em *Danio rerio* fornecendo uma anestesia geral completa (hipnose e analgesia) e de rápida indução (VALENTIM et al., 2016).

Sabe-se que um dos principais fatores a influenciar os valores da ERG-ct em mamíferos são os sedativos, como por exemplo os barbitúricos que são conhecidos por atenuar as amplitudes das ondas. Ao se comparar a influência do tiopental e do propofol sob as respostas eletrorretinográficas de suínos, observou-se que o último se sobressaiu em preservar as respostas advindas dos fotorreceptores (TANSKANEN

et al., 1996). Ademais, ao se avaliar os efeitos do sevoflurano e do propofol em ERG-ct e potenciais visuais evocados em humanos, viu-se que os resultados sofreram menos influências quando o propofol foi utilizado (TANAKA et al., 2020). Por isso, este agente foi eleito para o uso no presente estudo e, em combinação com a lidocaína, se mostrou eficaz para a anestesia dos animais e permitiu bons registros dos componentes da ERG.

A Eletrorretinografia de campo total (ERG-ct), como empregada atualmente, é a maneira mais eficaz de eliciar uma resposta eletrofisiológica representativa de toda a população de fotorreceptores na retina em mamíferos; sendo os registros fotópicos e flickers empregados principalmente para avaliação das vias dependente dos cones (BOUSKILA et al., 2014). Há poucos registros de ERGs em peixes anestesiados, tais como *Cyprinus carpio*, *Astatotilapia burtoni* e *Danio rerio* (BAILEY et al., 2013; BUTLER et al., 2019; NADOLSKI, et al., 2020), mas nenhum deles emprega técnicas menos invasivas ou segue as recomendações da ISCEV. Usualmente os registros de ERG nos peixes são realizados em olhos enucleados, e ou com a perfuração do olho com o eletrodo ativo, ocasionando a morte do animal (LISNEY, et al., 2010). Portanto, ao que se sabe, o presente estudo é único até o momento em demonstrar o uso de um protocolo anestésico e de estímulos ERGs fotópicos sugeridos pela ISCEV na espécie *Astronotus ocellatus*. Possibilitando portanto, a permanência do animal e acompanhamento a longo prazo, assim como sua retomada a natureza.

A visão de cores desempenha um papel singular no comportamento visual; dependendo a sua capacidade de visão colorida da presença de cones diferencialmente sensíveis. A sensibilidade espectral é uma medida da capacidade de resposta visual desses cones em diferentes comprimentos de onda de luz e estudos genéticos e eletrofisiológicos sugeriram que os ciclídeos possuem visão pentacromática, respondendo a estímulos de ondas curtas (ultravioleta - 340nm) a ondas de comprimento longo (vermelho - 630nm); foi demonstrado também que tal característica varia com o sexo e estado reprodutivo do indivíduo, no qual em épocas reprodutivas a sensibilidade espectral visual é aguçada, ou seja maior expressão gênica de cones, em maior parte nas fêmeas, porém este padrão se relaciona com os hábitos e papéis do macho e da fêmea de cada espécie (SABBAH et al., 2010). Os resultados desta pesquisa corroboram com o estudo anterior, apesar do número pequeno de espécimes avaliados, demonstrando que a visão do peixe Oscar se

comporta de forma semelhante aos demais ciclídeos. O aumento da amostra analisada e a consideração de fatores como idade e distinção sexual em grupos pode contribuir para melhor elucidar a avaliação da sensibilidade espectral da espécie.

Por fim, apesar das variações nos protocolos empregados nos experimentos de eletrofisiologia visual em peixe, tendo como consequência resultados inconsistentes e de difícil análise comparativa entre os trabalhos. O uso de um protocolo padrão sugerido por um órgão internacional e o emprego de uma contenção química segura e eficaz contribui para a popularização do método e da espécie como modelo experimental, permitindo que a ERG seja empregada como uma ferramenta comum e eficiente nos estudos de afecções oftálmicas.

CONCLUSÃO

O presente trabalho apresenta um protocolo simples e rápido para obtenção de respostas ERG-ct em *Astronotus ocellatus* anestesiados, permitindo a recuperação de todos os animais após os exames. Vale ressaltar que os experimentos seguiram as diretrizes da ISCEV o que contribui para a sua padronização e reprodutibilidade. Dessa forma, o emprego da espécie e do protocolo estudado favorece o desenvolvimento de pesquisas de longo prazo, investigações a campo e a averiguação de doenças progressivas retinianas.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- BAILEY, K. M., HEMPSTEAD, J. E., TOBIAS, J. R., BORST, L. B., CLODE, A. B., & POSNER, L. P. Evaluation of the effects of tricaine methanesulfonate on retinal structure and function in koi carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 242(11), 1578–1582, 2013. <https://doi.org/10.2460/javma.242.11.1578>
- BOUSKILA, J.; JAVADI, P.; PALMOUR, R.M.; BOUCHARD, J.F.; PTITO, M. Standardized Full-Field Electroretinography in the Green Monkey (*Chlorocebus sabaeus*). *PLoS One*. 2014; 9(10): e111569.
- BROCKERHOFF S.E.; HURLEY J.B.; JANSSEN-BIENHOLD U.; NEUHAUSS S.C.; DRIEVER W.; DOWLING J.E. A behavioral screen for isolating zebrafish mutants with visual system defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Nov 7;92(23):10545-9. doi: 10.1073/pnas.92.23.10545. PMID: 7479837; PMCID: PMC40648.

- BUTLER, J.M.; WHITLOW, S.M.; ROGERS, L.S.; PUTLAND, R.L.; MENSINGER, A.F.; MARUSKA, K.P.; Reproductive state-dependent plasticity in the visual system of an African cichlid fish. *Hormones and behavior*. 2019 Aug;114:104539.
- CARLETON K. L.; DALTON, B. E.; ESCOBAR-CAMACHO D.; NANDAMURI, S. P. Proximate and ultimate causes of variable visual sensitivities: insights from cichlid fish radiations. **Genesis** v.54, p.299–325, 2016. PMID: 27061347.
- DOWLING, J. *The Retina—An Approachable Part of the Brain*. Harvard University Press, Cambridge, 1987.
- ESCOBAR-CAMACHO, D., MARSHALL, J., & CARLETON, K. L.. Behavioral color vision in a cichlid fish: *Metriaclima benetos*. **Journal of Experimental Biology**, v.220,n16, p.2887–2899, 2017.
- EKESTEN, B., KOMÁROMY, A. M., OFRI, R., PETERSEN-JONES, S. M., e NARFSTRÖM, K. Guidelines for clinical electroretinography in the dog: 2012 update. *Documenta Ophthalmologica*, 127(2), 79–87.2013. <https://doi.org/10.1007/s10633-013-9388-8>
- FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. **Fish adaptations**. New York: Science Publishers, 2003. p. 285-308.
- FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia do apaiari, *Astronotus cellatus* (Spix) (Pisces, Cichlidae), em cativeiro. Aparelho de reprodução. Hábitos de desova e prolificidade. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 467-484, 1982.
- LISNEY T.J.; STUDD E.; HAWRYSHYN C.W. Electrophysiological assessment of spectral sensitivity in adult Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: evidence for violet sensitivity. *J Exp Biol*. 2010 May;213(Pt 9):1453-63.
- MAKHANKOV, Y. V., RINNER, O., & NEUHAUSS, S. C. F.. An inexpensive device for non-invasive electroretinography in small aquatic vertebrates. **Journal of Neuroscience Methods**, v.135, n.1 -- 2, p.205 - 210, 2004.Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2003.12.015>
- MARSHALL, N. J. and Vorobyev, M. (2003). The design of color signals and color vision in fishes. In: COLLIN, S. P. ;MARSHALL, N. J. **Sensory Processing in Aquatic Environments**. New York: Springer,2003, p.194-222
- MUUSZE, B., MARCON, J., VAN DEN THILLART, G; ALMEIDA-VAL, V. Hypoxia tolerance of Amazon fish Respirometry and energy metabolism of the cichlid *Astronotus Ocellatus*.**Comparative Biochemistry and Physiology Part A** v.120, n1,p.151–156, 1998.
- NADOLSKI N.J.; WONG C.X.L.; HOCKING J.C. Electroretinogram analysis of zebrafish retinal function across development. *Doc Ophthalmol*. 2021 Feb;142(1):99-109. doi: 10.1007/s10633-020-09783-y. Epub 2020 Jul 20. PMID: 32691203.
- NEUHAUSS S.C.; BIEHLMAIER O.; SEELIGER M.W.; DAS T.; KOHLER K.; HARRIS W.A.; BAIER H. Genetic disorders of vision revealed by a behavioral screen of 400 essential loci in zebrafish. *J Neurosci*. 1999 Oct 1;19(19):8603-15. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-19-08603.1999. PMID: 10493760; PMCID: PMC6783047.
- OBIRIKORANGA, K.A.; TUOHA, D.A.T.; AGBOA, N.W.; AMPONSAHA, A.K.; SKO, P.V. Anaesthetic potential of propofol for nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Effect of anaesthetic concentration and body weight. *Scientific African*. Volume 10, November 2020, e00595, p. 1 -
- PARK, I.S. et al. Effects of Clove Oil and Lidocaine-HCl Anesthesia on Water Parameter during Simulated Transportation in the Marine Medaka, *Oryzias dancena*. **Development & Reproduction**. v.21. p.19-33, 2017.
- PRICE, A. C., WEADICK, C. J., SHIM, J.;RODD, F. H. Pigments, patterns,and fish behavior. **Zebrafish**, v.5, n.4, p.297-307, 2008.
- RAO, M.B.; DOMINIC, D.; PATTON, J.G. Neurotransmitter-Regulated Regeneration in the Zebrafish Retina. **Stem Cell Reports**, vol. 8, n.4, 2017, p.831–842. doi: 10.1016 / j.stemcr.2017.02.007.
- RAPP L.M.; BASINGER S.F. The effects of local anesthetics on retinal function. *Vision Res* 1982;22:1097–1103.

- SABBAH S.; LARIA, R.L.; GRAY, S.M.; HAWEYSHYN, C.W. Functional diversity in the color vision of cichlid fishes. *BMC biology*. 2010 Oct 28;8:133.
- SEEHAUSEN, O., TERAJ, Y., MAGALHAES, I. S., CARLETON, K. L., MROSSO, H. D. J., MIYAGI, R., VAN DER SLUIJS, I., SCHNEIDER, M. V., MAAN, M. E., TACHIDA, H. ET AL. . Speciation through sensory drive in cichlid fish. *Nature*, v.455,n.7213, p.620-626, 2008.doi: 10.1038 / nature07285
- SELZ, O. M., PIEROTTI, M. E. R., MAAN, M. E., SCHMID, C.,SEEHAUSEN, O. Female preference for male color is necessary and sufficient for assortative mating in 2 cichlid sister species. *Behav. Ecol.* v.25,p. 612-626, 2014.
- SLADKY K.K.; SWANSON C.R.; STOSKOPF M.K.; et al. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). *Am J Vet Res* 2001;62:337–342.
- SOARES, M.G.M.; COSTA, E.L.; SIQUEIRA-SOUZA, F.K.; ANJOS, H.D.B.; YAMAMOTO, K.C.; FREITAS, C.E.C. **Peixes de lagos do médio Rio Solimões**. 2.ed. Manaus: Instituto Piatam, 2008 p.160.ISBN: 8574012643
- TANAKA, R.; TANAKA, S.; ICHINO, T.; ISHIDA, T.; FUSEYA, S.; KAWAMATA, M. Differential effects of sevoflurane and propofol on an electroretinogram and visual evoked potentials. *Journal of anesthesia* . 2020 Apr;34(2):298-302.
- TANSKANEN, P.; KYLMÄ, T.; KOMMONEN, B.; KARHUNEN, U. Propofol influences the electroretinogram to a lesser degree than thiopentone. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1996 Apr;40(4):480-5.
- VALENTIM AM, FÉLIX LM, CARVALHO L, DINIZ E, ANTUNES LM. A New Anaesthetic Protocol for Adult Zebrafish (*Danio rerio*): Propofol Combined with Lidocaine. **PLOS ONE**. 11(1): e0147747, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147747>

ARTIGO 2: Histomorfometria da retina do peixe Oscar (*Astronotus ocellatus*)

Stéphanie Ingrand Vieira de **Araújo**^{1*}, Bruno Daby Figuerêdo de **Souza**², Fabrício Bezerra de **Sá**³.

1: Mestrando do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil. **S.i.v.araujovet@gmail.com;**

2: Mestranda do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

3: Professor Associado IV do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

Diferentes estudos demonstram uma grande variedade na morfologia retiniana entre os vertebrados, principalmente entre os peixes teleósteo, pois a classe agrupa espécies que habitam desde as partes mais profundas do oceano até peixes que se adaptaram a enxergar no ar. O *Astronotus ocellatus* (Oscar), é um ciclídeo originário da bacia amazônica e habita ambientes claros, sendo altamente influenciados pela luz. Considerando-se as similaridades e diferenças da retina dos peixes, bem como as características do *Astronotus ocellatus*, como a sua resistência e cognição, que o tornam um interessante modelo experimental. O objetivo do presente estudo é realizar a descrição histológica da retina da espécie supracitada através da microscopia óptica e descrição morfométrica das camadas da retina. Para isso, foram utilizados três animais, seis olhos ao total, advindos da Estação de Aquicultura Prof. Johei Koike, situada na Universidade Federal Rural de Pernambuco. Após a eutanásia dos peixes em solução de eugenol, os olhos foram enucleados e fixados em solução de Davidson por 24 horas. Após o período, realizou-se a desidratação em solução crescente de álcoois, seguindo para impregnação e inclusão em parafina. Os cortes foram submetidos a coloração com Hematoxilina e Eosina, sendo que alguns deles foram selecionados para ser feito a despigmentação do epitélio pigmentar antes da coloração. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico e algumas imagens foram registradas para realização da morfometria. Pode-se evidenciar que a retina do peixe Oscar tem organização estrutural semelhante aos demais vertebrados, no entanto, é avascular e tem aporte sanguíneo vindo do plexo coróide e do processo falciforme. Ao se realizar mensuração das camadas histológicas da retina, não se observou variação ao longo de sua extensão. A camada de fibras nervosas foi a única a apresentar espessura com variação estatística significativa no teste de tukey entre as camadas ao longo das regiões da retina (periférica e central). A retina apresentou média total de $178,78 \pm 21,03\mu\text{m}$. Espera-se que as descrições contidas no presente

trabalho contribuam para fundamentar estudos futuros de caráter experimental ou que avaliem possíveis alterações nesse tecido.

Palavras chaves: Apaiari, Histomorfometria, oftalmologia experimental e modelo experimental.

ABSTRACT

Different studies demonstrate a great variety in retinal morphology among vertebrates, especially among teleost fish, as the class groups species that inhabit from the deepest parts of the ocean to fish that have adapted to seeing in the air. *Astronotus ocellatus* (Oscar), is a cichlid originating in the Amazon basin and inhabiting light environments, being highly influenced by light. Considering the similarities and differences of the fish retina, as well as the characteristics of *Astronotus ocellatus*, such as its resistance and cognition, make it an interesting experimental model. The aim of this study is to perform the histological description of the retina of the aforementioned species through optical microscopy and morphometric description of the layers of the retina. For this, three animals were used, six eyes in total, coming from the Prof. Johei Koike, located at the Federal Rural University of Pernambuco. After euthanizing the fish in eugenol solution, the eyes were enucleated and fixed in Davidson's solution for 24 hours. After the period, dehydration was carried out in a growing solution of alcohols, followed by impregnation and embedding in paraffin. The sections were stained with Hematoxylin and Eosin, and some of them were selected to undergo pigment epithelial depigmentation before staining. The slides were examined under an optical microscope and some images were recorded for morphometry. It can be seen that the Oscar fish retina has a structural organization similar to other vertebrates, however, it is avascular and has blood supply coming from the choroid plexus and the sickle cell process. When measuring the histological layers of the retina, no variation was observed along its length. The nerve fiber layer was the only one to present a thickness with statistically significant variation in the tukey test between layers along the retinal regions (peripheral and central). The retina had a total mean of $187.55 \pm 21 \mu\text{m}$. It is hoped that the descriptions contained in this work will contribute to support future studies of an experimental nature or that assess possible alterations in this tissue.

Key words: Apaiari, Histomorphometry, experimental ophthalmology and experimental model.

INTRODUÇÃO

Diversos estudos demonstram uma grande variedade na morfologia retiniana entre os vertebrados, apesar de apresentarem a estrutura do globo ocular semelhante entre as espécies (RODIECK, 1973; YAMADA, 1982; MCFARLAND, 1991). Esta variação é observada de forma mais acentuada entre os peixes teleósteos (FISHELSON et al., 2004), pois a classe agrupa espécies que habitam desde as partes mais profundas do oceano até peixes que se adaptaram a enxergar no ar (NICOL, 1973; MYRBERG E FUIMAN, 2002). Tais diferenças são observadas não só no formato ou posição dos olhos na cabeça, mas principalmente na conformação e quantificação dos fotorreceptores, assim como no desenvolvimento do epitélio pigmentar e seu pigmento (WAGNER, 1990; NAG E BHATTACHARJEE, 2002).

O *Astronotus ocellatus* (Oscar), é um peixe com origem na bacia amazônica e habita ambientes claros, sendo altamente influenciados pela luz, alimentando-se preferencialmente de animais vivos (BRAGA, 1964; PAVANELLI, 2000). Essa espécie pertence à família *Cichlidae* a qual apresentou expressiva evolução na sensibilidade visual, pois emprega a visão em cores para detectar, identificar e discriminar diferentes alimentos e parceiros sexuais (ESCOBAR-CAMACHO, 2016; CARLETON et al., 2016). Por isso, os ciclídeos são considerados modelos emergentes para compreensão da ecologia visual porque, assim como a maioria dos teleósteos, possuem particularidades morfológicas responsáveis pela percepção de comprimentos de ondas invisíveis a várias espécies de animais (HÄRER et al., 2019).

A utilização de peixes como modelo experimental na oftalmologia é promissora devido às semelhanças retiniana, tanto estrutural quanto celular, com os mamíferos e apresentando com o diferencial em relação à capacidade de regeneração, enquanto os mamíferos respondem a uma lesão na retina com uma resposta cicatricial e não regenerativa podendo ocorrer perda ou déficit de função, a retina dos peixes pode se regenerar (RAO et al., 2017). Já se observou em teleósteos que a retina deles apresenta neurogênese pós-embrionária tanto associada ao crescimento quanto induzida por lesão sendo os novos neurônios oriundos da margem ciliar, local de junção da retina ao epitélio da íris, onde persiste um remanescente da retina embrionária, que forma a zona germinativa circunferencial (OTTESON e HITCHCOCK, 2003).

Considerando-se então as similaridades e diferenças entre a retina dos peixes e mamíferos, bem como as características do *Astronotus ocellatus*, como a sua resistência e cognição, que o tornam um interessante modelo experimental, optou-se por essa espécie para avaliação histomorfológica da retina, tendo como objetivo do presente estudo a descrição morfológica da estrutura retiniana para fundamentar estudos futuros que avaliem possíveis alterações nesse tecido.

O objetivo do presente estudo é realizar a descrição histológica da retina do *Astronotus ocellatus* através da microscopia óptica e descrição morfométrica de cada camada da retina. Elucidar características histomorfológicas da retina, intrínsecas da espécie em questão.

MATERIAL E MÉTODOS

Comissão de Ética e Eutanásia

Todo o estudo só foi conduzido após concessão de licença prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob número 118/2019. Além disso, o presente estudo também conta com registro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado nº A7AAAEC.

Obtenção dos Peixes

Para esse estudo foram utilizados três animais da espécie *Astronotus ocellatus*, seis olhos ao total, advindos da Estação de Aquicultura Prof. Johei Koike, situada na Universidade Federal Rural de Pernambuco. Para eutanásia, os peixes foram colocados individualmente em tanques de 9 litros com solução de eugenol a uma concentração de 286,55 mg/L até que viessem a óbito, conforme realizado em estudo anterior (SILVA SOUZA *et al*, 2015).

Amostras oculares

Os olhos foram enucleados, através da dissecação e remoção de toda gordura e músculo periorbital, preservando parte do nervo óptico e tecido adjacente a ele. Posteriormente fixados em solução de Davidson por 24 horas. Após o período, realizou-se secções sagitais nos globos oculares e a desidratação em solução crescente de álcoois, seguindo para impregnação e inclusão em parafina. Sendo

alguns blocos realizada inclusão com a retina paralela a face de corte, para realização de cortes tangenciais, e outros com a retina perpendicular em que a face convexa do hemicírculo do globo ficasse voltada a face de corte.

Cortes, coloração e montagem

Os blocos foram cortados transversais e tangenciais, com espessura de 5µm de forma seriada em micrótomo (Leica®) e as lâminas histológicas foram coradas em Hematoxilina e Eosina (H&E) e cobertas com meio de montagem (Entellan®), seguindo os protocolos histológicos de rotina (TOLOSA et al., 2003). Algumas lâminas foram submetidas ao processo de despigmentação do Epitélio Pigmentar da Retina para melhor evidenciar o segmento externo dos fotorreceptores, com soluções de permanganato de potássio a 0,25% e ácido oxálico a 5% (MANICAM et al, 2014).

Histomorfometria

A análise histomorfométrica da retina foi realizada a partir da obtenção de imagens (Fotomicrografia) através do programa de computador LAS EZ acoplado ao microscópio óptico Leica ICC50 HD. Para as mensurações da espessura total e das camadas retinianas foi utilizado o software Image J. Para a mensuração da espessura total, a retina foi dividida em seis porções (regiões), central: ventral e dorsal; periférica: ventral e dorsal; e extrema: ventral e dorsal. Sendo realizada 4 mensurações verticais para cada região no aumento de 10x, desde a camada de células visuais à camada de fibra nervosa, com um intervalo linear entre as mensurações de 80µm (micrômetro). A espessura total da retina foi representada pela média da espessura total de todas as regiões. Na análise das camadas da retina as mensurações foram feitas no aumento de 40x, dentro das divisões (grupos) retina central, periférica ventral e dorsal. Mensuradas as camadas: nuclear externa, plexiforme externa, nuclear interna, plexiforme interna, células ganglionares e fibras nervosas. Após a despigmentação, mensurou-se as camadas de epitélio pigmentar e segmentos externo e interno dos fotorreceptores. As imagens das lâminas com cortes tangenciais foram obtidas a partir da objetiva de 40x com intuito de verificar o arranjo conformacional das células da camada fotorreceptora.

Análise Estatística

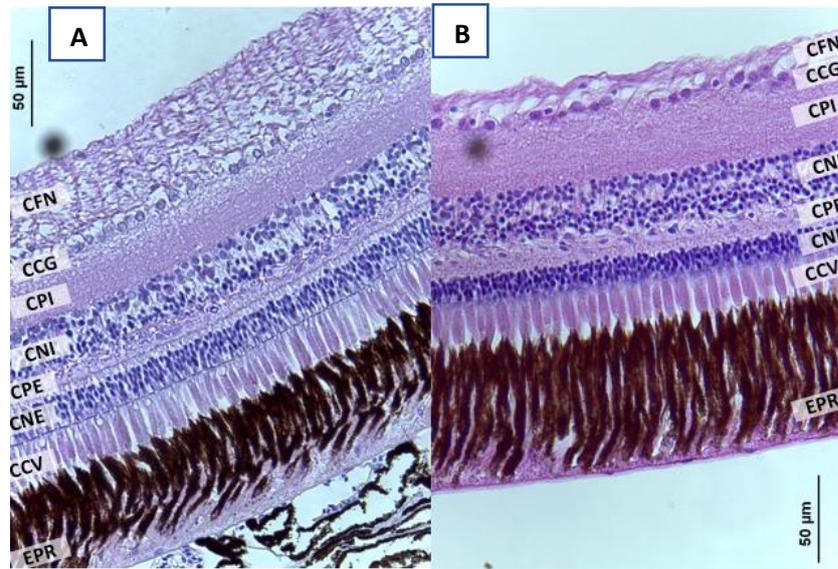
Os dados obtidos foram agrupados em uma tabela contendo as médias e desvios padrão, para cada região, de espessura total (ET) da retina e de cada camada da retina (nuclear externa, plexiforme externa, nuclear interna, plexiforme interna, ganglionar e fibras nervosas).

Em cada parâmetro analisado foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk afim de testar a distribuição normal ($p > 0,05$). Seguindo-se com análise de variância (ANOVA) e posteriormente, ao teste de Tukey, com significância de 5% para averiguar as possíveis diferenças estatísticas entre as regiões central dorsal/ventral e periférica dorsal/ventral, para os parâmetros espessura total da retina e espessura das camadas da retina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A retina do peixe Oscar apresenta organização estrutural semelhante aos demais vertebrados (KERN e COLITZ, 2013), conforme demonstrado na figura 13. Além disso, conforme observado em outros teleósteos, a túnica nervosa é avascular, tendo aporte sanguíneo vindo do plexo coróide, anteriormente chamado de glândula Coroidal (Figura 14) e do processo falciforme (Figura 15); este último adentra a câmara vítrea por uma fissura embrionária próxima ao nervo óptico, estabelecendo-se sobre a retina. Tais achados corroboram com descrições anatômicas do aparato ocular de outros peixes, como o Pacu (*Colossoma macropomum*), espécie nativa de águas doce sul-americanas (GUSTAVSEN et al., 2018).

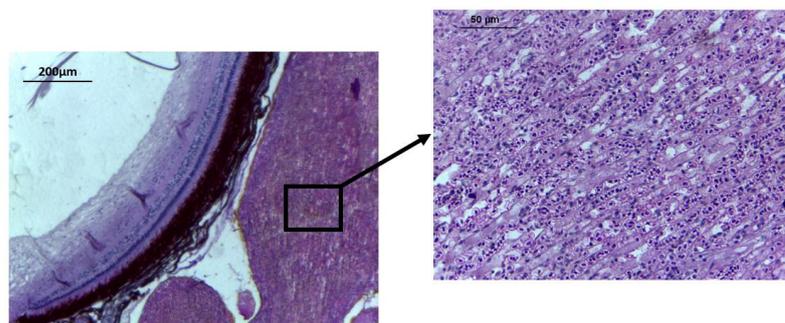
Figura 13 - Fotomicrografia de um corte transversal da retina do peixe Oscar (*Astronotus ocellatus*) demonstrando disposição das camadas retinianas.



A, Retina central; **B**, retina periférica. EPR: Epitélio pigmentar da retina, CCV: Camada de células visuais, CNE: Camada nuclear externa, CPE: Camada plexiforme externa, CNI: Camada nuclear interna, CPI: Camada plexiforme interna, CCG: Camada de células ganglionares, CFN: Camada de Fibras nervosas. Ponta de seta: rede admirável. HE, obj.40x, bar = 50 µm.

Fonte: ARAÚJO, 2020.

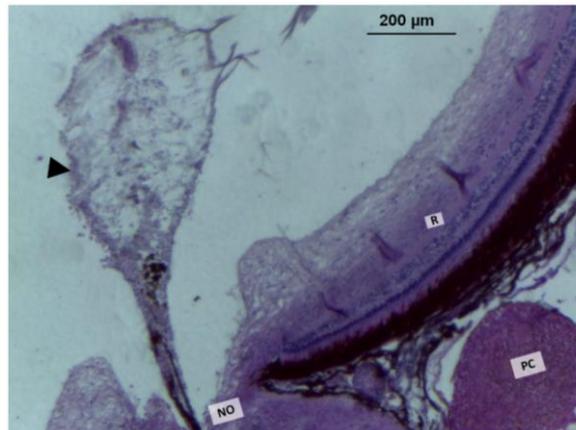
Figura 14 - Fotomicrografia de um corte transversal retina do *Astronotus ocellatus*, enfatizando no quadrado e na foto B, o plexo coroidal (rede admirável).



A: HE, obj.10x, bar = 200 µm; **B**: HE, obj.40x, bar= 50 µm.

Fonte: ARAÚJO, 2020.

Figura 15 - Fotomicrografia de um corte transversal da retina do peixe Oscar

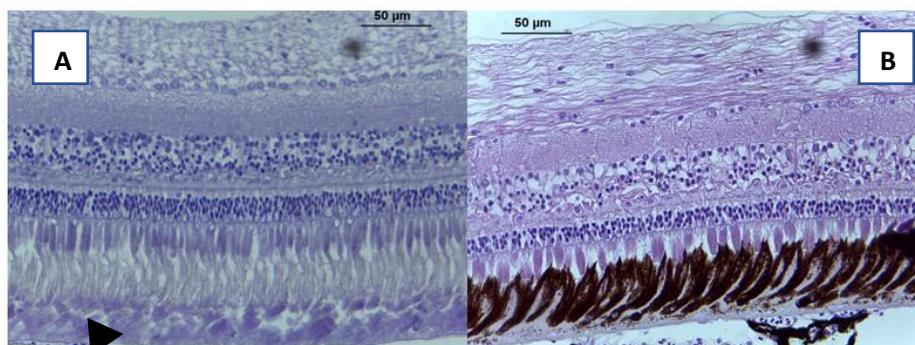


Ponta de seta: Processo falciforme. **R**: Retina, **NO**: Nervo óptico, **PC**: Plexo Coroidal. HE, obj.10x, bar = 200 µm.

Fonte: ARAÚJO, 2020.

Assim como encontrado em outros teleósteos, o *Astronotus ocellatus* apresenta tapete lúcido na retina não neurosensorial e epitélio pigmentar (EP). Estudos realizados em Characiformes revelou que seu tapete lúcido apresenta a reflexão característica dessa estrutura devido a metabólitos da tirosina que ficam agrupados em glóbulos juntos do EP, cujo mesmo também foi isolado inicialmente na retina de bagres (Siluriformes) (GUSTAVSEN et al, 2018). Seu EP possui processos digitiformes extensos que recobrem grande parte do segmento externo e interno dos fotorreceptores, dificultando a visualização histológica destes, principalmente em animais que tiveram suas retinas previamente sensibilizadas pela luz. Após processo de despigmentação (Figura 16) se visualiza as células do EP e a extensão das vilosidades destas sobre os segmentos externos e parte dos internos da retina neurosensorial.

Figura 16 - Imagem histológica de um corte sagital da retina do peixe Oscar (*Astronotus ocellatus*) demonstrando a disposição do epitélio pigmentar retiniano nessa espécie.

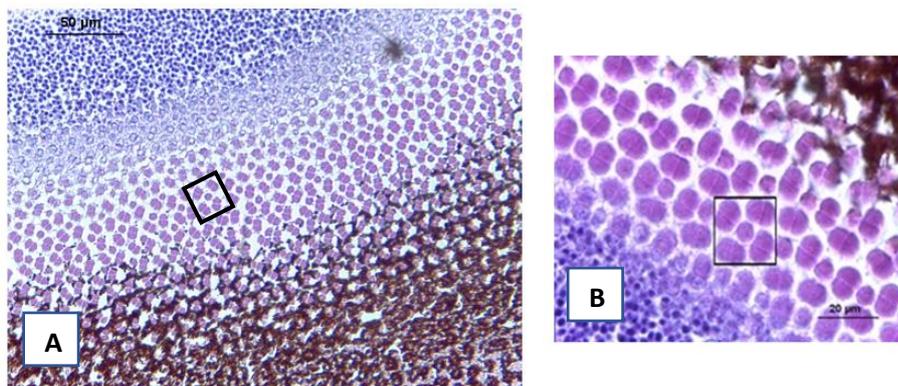


A: Retina periférica após processo de despigmentação; **B:** Retina periférica sem a despigmentação. Ponta de Seta: células do epitélio pigmentar. HE, obj.40x, bar = 50 µm.

Fonte: ARAÚJO, 2020.

Nos cortes tangenciais da camada fotorreceptora, na porção dos segmentos externos, observou-se um padrão mosaico composto por um cone simples circundado por quatro cones duplos (Figura 17), estrutura denominada mosaico quadrangular, já descrita em outros peixes ósseos como salmonídeos (LYALL, 1957) e ciclídeos da espécie *Oreochromis niloticus* (AZAB, 2017). Acredita-se que um mosaico organizado de cones favorece a percepção de movimentos e, por isso, se destaca em peixes predadores; além do mais, a organização também permite melhor distinção de cores e assim está presente principalmente em peixes que habitam águas rasas (WAGNER, 1990; COLLIN e COLLIN, 1998; SALEM, 2016). Como o Oscar enquadra-se em tais nichos, justifica-se a presença dos mosaicos em sua retina.

Figura 17 - Fotomicrografia de secção tangencial da retina do *Astronotus ocellatus* - Mosaico quadrangular.



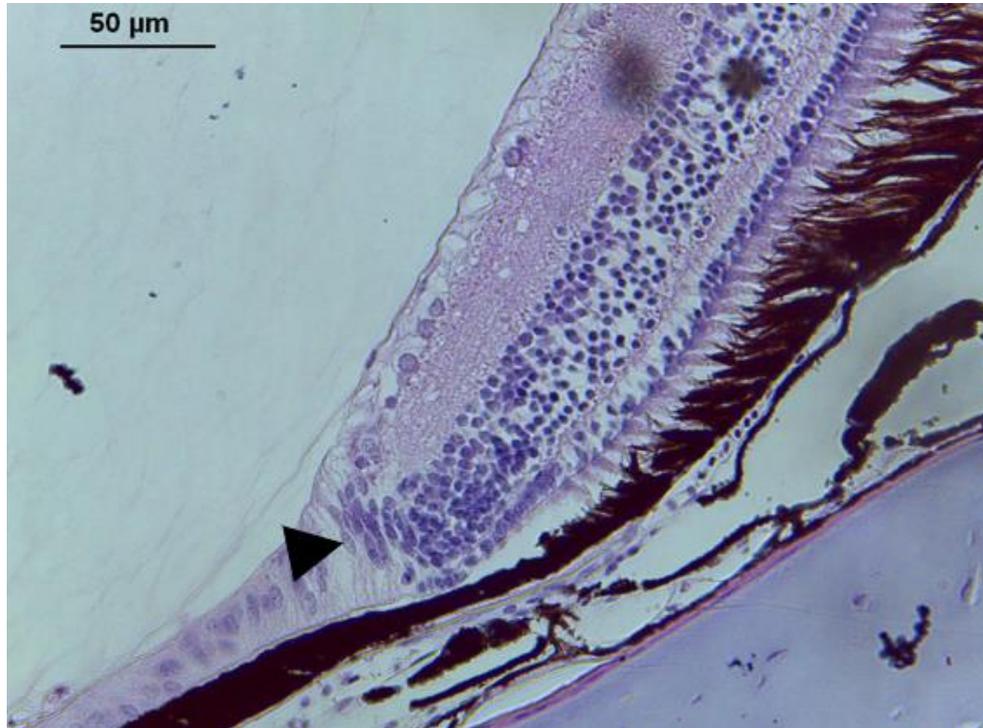
A: No quadrado: Região da camada fotorreceptora em que o mosaico está presente; obj.40x; bar= 50µm. **B:** No quadrado- Quatro cones duplos e um cone simples no centro (mosaico quadrangular); obj. 100x; bar= 20µm. H.E.

Fonte: ARAÚJO, 2020.

Outra estrutura que merece destaque é a zona germinativa circunferencial (Figura 18), que fica localizada na transição entre a retina e margem ciliar. Tal estrutura concentra a presença de células tronco multipotentes que são responsáveis por diferenciar e gerar muitos dos neurônios presentes na retina (OTTESON e HITCHCOCK, 2003); sabe-se também que em outros peixes esta zona germinativa fornece a morfogênese celular de acordo com a modulação de células da camada neurosensorial (TSINGOS et al, 2019). Acredita-se que a zona germinativa

circunferencial da retina do Oscar se comporte de forma semelhante e a sua existência permite a regeneração neuronal pós-embrionária.

Figura 18 – Fotomicrografia da margem ciliar da retina do *Astronotus ocellatus*.



Ponta de seta: Zona Germinativa Circunferencial (ZGC); HE, objetiva de 40x; barra de escala= 50µm.
Fonte: ARAÚJO, 2020.

O presente estudo demonstrou que a espessura média total da retina neurossensorial (Tabela 5 e Figura 19) do *Astronotus ocellatus*, compreendida a partir da camada nuclear externa a camada de fibras nervosas, é de $178,78 \pm 21,03\mu\text{m}$. Havendo variações na espessura da retina de acordo com a região (central e periférica), na porção mais próxima ao nervo óptico (central) é mais espessa, e a medida que se estende para as regiões mais periféricas vai se tornando mais delgada, tendo-se $174,8 \pm 25,34\mu\text{m}$ por média para periférica ventral (PV) e $205,65 \pm 12,3\mu\text{m}$ para central ventral (CV). Entretanto, não há diferença estatística significativa entre as regiões dorsal e ventral. Este achado corrobora com descrições já realizada para a retina de teleostes (MEEKINS, J. M.; RANKING, A. J.; SAMUELSON, D. A., 2021).

A camada, nuclear externa possui maior abundância de cones, já tendo sido descrito a presença de cones duplos e gêmeos na espécie em questão (HIBBARD, 1971). Ao se investigar a relação de proporção da camada nuclear externa (NE) com a nuclear interna (NI) (NE/NI) para análise histológica da retina de peixes diurnos e

noturnos, verificou-se que valores menores que 1 estão atrelados a animais diurnos (AZAB, 2017); quando essa proporção é empregada na retina do *Astronotus ocellatus* obtém-se o valor de 0,44 que, assim como no estudo citado, reforça a natureza diurna da espécie em questão (Tabela 5), pois camada nuclear interna é geralmente mais espessa nos animais diurnos do que nos noturnos (WANG; TANG; YAN, 2011).

A camada plexiforme externa (CPE) apresentou homogeneíze entre a regiões da retina, assim como a nuclear interna (CNI), plexiforme interna (CPI) e ganglionar (CG). A CNI é formada pelos núcleos das células horizontais, bipolar, amácrina, e células de müller, embora para esta diferenciação seja necessária análise de imuno-histoquímica. A CG é composta por apenas uma camada de células ganglionares, que apresentam formato irregular e tamanho variável.

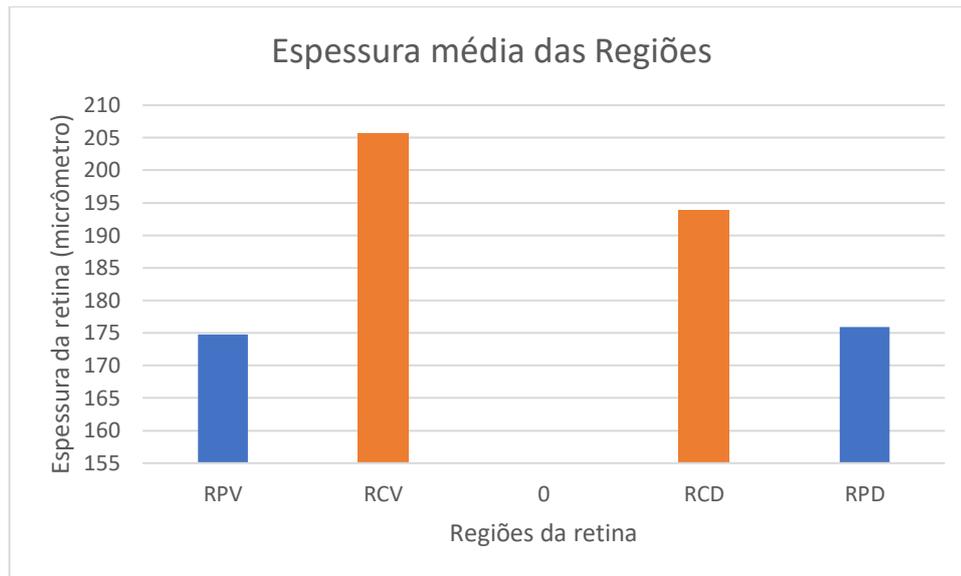
A camada de fibras nervosas foi a única a apresentar espessura com variação estatística significativa entre as regiões da retina com média total (MT) de $24,83 \pm 18,44 \mu\text{m}$, com espessura de $45,71 \pm 11,37 \mu\text{m}$ na retina central ventral (CV) e de $46,96 \pm 15,82 \mu\text{m}$ na central dorsal (CD), enquanto na periferia apresentou valores de $20,7 \pm 10,4 \mu\text{m}$ na região periférica ventral (PV) e de $21,53 \pm 8,9$ na periférica dorsal (PD). Acredita-se que este fato esteja relacionado à abundância de cones presentes na região central (FISHELSON et al., 2004), já que eles são responsáveis por mais sinapses com células bipolares e, conseqüentemente, mais sinapses com células ganglionares (OFRI, 2018; MEEKINS, J. M.; RANKING, A. J.; SAMUELSON, D. A., 2021).

Tabela 5 – Espessuras da retina do *Astronotus ocellatus* em micrômetros. (Média \pm desvio padrão)

	RT	NE	PE	NI	PI	G	FN	NE/NI
PV	174,80 \pm 25,34	13,28 \pm 2,64	10,37 \pm 2,56	29,48 \pm 2,74	31,98 \pm 6,36	5,80 \pm 0,72	20,80 \pm 10,42	0,45
CV	205,65 \pm 12,30	15,52 \pm 3,42	11,67 \pm 1,35	28,55 \pm 4,53	26,55 \pm 6,91	5,77 \pm 1,11	45,71 \pm 11,37	0,54
NO	-	-	-	-	-	-	-	-
CD	193,79 \pm 19,64	14,94 \pm 3,01	10,59 \pm 2,83	30,65 \pm 3,41	29,00 \pm 11,17	6,28 \pm 1,35	46,96 \pm 15,82	0,49
PD	175,93 \pm 5,92	13,96 \pm 2,41	10,38 \pm 2,53	31,37 \pm 2,50	32,74 \pm 8,19	5,42 \pm 1,50	21,53 \pm 8,90	0,45
MT	178,78 \pm 21,03	14,42 \pm 2,79	10,75 \pm 2,22	30,011 \pm 3,29	30,07 \pm 7,87	5,81 \pm 1,34	33,75 \pm 16,68	0,48

Unidade: μm . MT- Média Total. Camadas: RT- Retina Total, NE – Nuclear Externa; PE – Plexiforme Externa; NI – Nuclear Interna; PI - Plexiforme Interna; G- Ganglionares; FN – Fibras Nervosas. Regiões: PV – Periférica Ventral; CV- Central Ventral; NO – Nervo Óptico; CD – Central Dorsal; PD – Periférica Dorsal.

Figura 19 - Gráfico demonstrando os valores de espessura média das regiões da retina.



LEGENDA: **O**, altura do nervo óptico; **RCV**, retina central ventral; **RCD**, retina central dorsal; **RPV**, retina periférica ventral; **RPD**, retina periférica dorsal.

Fonte: ARAÚJO, 2020.

CONCLUSÃO

A retina do *Astronotus ocellatus* possui estruturação semelhante a outros vertebrados e apresenta espessura total média de $178,78 \pm 21,03\mu\text{m}$. Dentre todas as camadas analisadas a que apresentou variação significativa estatisticamente de tamanho entre as regiões foi a de fibras nervosas. Apresenta padrão de mosaico na camada fotorreceptora, tendo sido observado uma zona germinativa circunferencial que possivelmente é responsável pela regeneração retiniana pós- embrionária. Assim, o presente estudo fornece dados que podem ser empregados em diversas pesquisas, tanto em ensaios clínicos quanto em avaliações de regeneração nervosa.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- AZAB, A. M. *et al.* Comparative Studies on the Histology of Eye Retina in Some Nile Fishes with Different Dial Activities. **The Egyptian Journal of Hospital Medicine**, Cairo, v.68, p.815-823, 2017. DOI: 10.12816/0038179.
- BRAGA, R.A. Apaiari ou acará-açu, *Astronotus ocellatus ocellatus* Spix. Fortaleza: DNOCS, p.2, 1962.
- CARLETON K.L., KOCHER T.D. Cone opsin genes of African cichlid fishes: Tuning spectral sensitivity by differential gene expression. *Mol Biol Evol* 2001, 18:1540-1550.
- COLLIN S.P.; COLLIN H. B. Retinal and lenticular ultrastructure in the aestivating salamanderfish, *Lepidogalaxias salamandroides* (Galaxiidae, Teleostei) with special reference to a new type of photoreceptor mosaic. **Histology and Histopathology**, v.13, p.1037-1048, 1998. DOI: 10.14670/HH-13.1037
- ESCOBAR-CAMACHO, D.; CARLETON, K. L. Sensory modalities in cichlid fish behavior. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 2016, v. 6, p.115-124. doi:10.1016/j.cobeha.2015.11.002.
- FISHELSON L.; AYALON G.; ZVERDLING A.; HOLZMAN R. Comparative morphology of the eye (with particular attention to the retina) in various species of cardinal fish (Apogonidae, Teleostei). *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004 Apr;277(2):249-61.
- GUSTAVSEN, K. A. *et al.* Ocular anatomy of the black pacu (*Colossoma macropomum*): gross, histologic, and diagnostic imaging. **Veterinary Ophthalmology**, USA, v.21, n.5, p. 507–515, 2018. DOI:10.1111/vop.12539
- HÄRER, A.; KARAGIC, N.; MEYER, A.; DOWDALL J. T. Reverting ontogeny: rapid phenotypic plasticity of colour vision in cichlid fish. **R. Soc. open sci.** Germany, V.6, p.1-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.190841>.
- HIBBARD, E. Grid patterns in the retinal organization of the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. **Experimental Eye Research**, v. 12, n.2, p.175 - 180, 1971. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(71\)90087-X](https://doi.org/10.1016/0014-4835(71)90087-X)
- KERN, T.J; COLITZ, C.M.H. Exotic Animal Ophthalmology. In: GELATT, K. N; GILGER, B. C; KERN, T. J. **Veterinary Ophthalmology**.5. ed. USA: WILEY-BLACKWELL, 2013.p.1750-1819. ISBN: 978-0-470-96040-0.
- LYALL, A.H. The growth of the trout retina. **The Quarterly Journal of Microscopic Science**, v.98, p. 101–110, 1957
- MANICAM, C. *et al.* Effective Melanin Depigmentation of Human and Murine Ocular Tissues: An Improved Method for Paraffin and Frozen Sections. **Plos one**, v.9, n.7, p. 1-8, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0102512.
- MCFARLAND, W.N., A study of the effects of anaesthetics on the behaviour and physiology of fishes, *Publ. Inst. Mar. Sci.*, v.6, p.22–55. 1959
- MEEKINS, J. M.; RANKING, A. J.; SAMUELSON, D. A. Ophthalmic Anatomy. In: GELATT, K. N, *et al.* **Veterinary Ophthalmology**. 6th USA: WILEY-BLACKWELL, 2021. p.41-123.
- MYRBERG A.A. JR.; FUIMAN L.A. The sensory world of reef fishes. *Coral reef fishes*. New York: Elsevier Science. 2002, p 123–160.
- NAG T.C.; BHATTACHARJEE, J. Retinal cytoarchitecture in some mountain-stream teleosts of India. *Environ Biol Fish.* 2002, 63:435– 449.
- NICOL J.A.C. Studies on the eyes of fishes: structure and ultrastructure. In: Ali MA, editor. *Vision in fishes*. New York: Plenum. 1975, p 579 – 607.
- OFFRI, R. Diseases of the Retina. In: MAGGS, D. J; MILLER, P. E; OFRI, R. **Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology** ,6.ed. Missouri: Elsevier, 2018, p. 347- 389.
- OTTESON, D. C.; HITCHCOCK, P.F. Stem cells in the teleost retina; persistent neurogenesis and injury-induced regeneration. **Vision Research**, USA, v.43, p.927-936, 2003.

- PAVANELLI, G. C. Sanidade de peixes, rãs, crustáceos e moluscos. In: VALENTI, W. C. *et al.* **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPQ, 2000. p. 208-209.
- RAO, M.B.; DOMINIC, D.; PATTON, J.G. Neurotransmitter-Regulated Regeneration in the Zebrafish Retina. **Stem Cell Reports**, vol. 8, n.4, 2017, p.831–842. doi: 10.1016 / j. stemcr.2017.02.007.
- RODIEK R.W. The vertebrate retina: principles of structure and function. San Francisco: WA Freeman. 1973.
- SALEM, M. A. Structure and function of the retinal pigment epithelium, photoreceptors and cornea in the eye of *Sardinella aurita* (Clupeidae, Teleostei). **The Journal of Basic e Applied Zoology**, v.75, p. 1-12, 2016.
- SILVA-SOUZA, J.G.; ANDRADE, D.R.; VIDAL JÚNIOR, M.V.; FARIAS, W.M.; VALÉRIO JÚNIOR, J.F., P.P, MENDONÇA. Eugenol como anestésico para oscar, *Astronotus ocellatus*. **Archivos de Zootecnia** [Internet]. v.64(247), p.205-210. 2015.
- TOLOSA, E.M.C.; RODRIGUES, C.J.; BEHMER, O.A.; FREITAS NETO, A.G. Manual de técnicas para histologia: normal e patológica. [S.l: s.n.], 2003.
- TSINGOS E.; HÖCKENDORF B.; SÜTTERLIN T.; KIRCHMAIER S.; GRABE N.; CENTANIN L.; WITTBRODT J. Retinal stem cells modulate proliferative parameters to coordinate post-embryonic morphogenesis in the eye of fish. *Elife*. 2019 Mar 26;8:e42646.
- WAGNER H.J. Retinal structures in fishes. In: Douglas RH, Djamgoz MBA, editors. The visual system of fish. Chapman & Hall. 1990, p 109 –157
- YAMADA E. Morphology of vertebrate photoreceptors. *Methods Enzymol*. Ed. 81:3–17, 1982.
- WANG, F. Y.; TANG, M. Y.; YAN; A comparative study on the visual adaptations of four species of moray eel. **Vision Research**, v.51, p. 1099–1108, 20211

ANEXO

1 - Licença CEUA

60

ANEXO 1

Licença da Comissão de Ética no uso de Animais



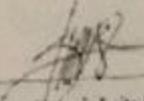
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
 Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n.
 Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

CEUA - UFRPE
 Aprovado em
 18/09/2019
 Validade
 18/09/2021

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Licença para o uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	118 /2019
Número do processo	23082.017279/2019-11
Data de emissão da licença	18 de setembro de 2019
Título do Projeto	Estado comparativo da associação de propofol com cloridrato de lidocaína para padronização de anestesia em peixe oscar (<i>Astronotus ocellatus</i>) e avaliação eletrofisiológica
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Fabício Bezerra de Sá
Colaboradores	Rômulo Nunes Rocha, Bruna Daby Figuerêdo de Souza, Stéphane Ingrand Vieira de Araújo, Dijaci Araújo Ferreira
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Peixe macho e fêmea 30. Total: 30


 Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza - SIAPE - 1.929.164
 (Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA UFRPE)

2- Licença SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
 Cadastro nº A7AAAEC

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: A7AAAEC
 Usuário: Fabrício Bezerra de Sá
 CPF/CNPJ: 695.225.374-20
 Objeto do Acesso: Patrimônio Genético
 Finalidade do Acesso: Pesquisa

Espécie

Astronotus ocellatus

Título da Atividade: ESTUDO COMPARATIVO DA ASSOCIAÇÃO DE PROPOFOL COM CLORIDRATO DE LIDOCAÍNA PARA PADRONIZAÇÃO DE ANESTESIA EM PEIXE OSCAR (ASTRONOTUS OCELLATUS) E AVALIAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA

Equipe

Fabrício Bezerra de Sá UFRPE

Data do Cadastro: 30/08/2019 13:23:16
 Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 13:26 de 30/08/2019.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - SISGEN