



CAPTAR
ciência e ambiente para todos

volume 11 • 2022 • art. 8

Desenvolvimento embrionário do peixe-zebra

Nos últimos anos o peixe-zebra (*Danio rerio*) tem-se tornado um modelo científico com interesse crescente em diversas áreas. Para além da facilidade em ser mantido e reproduzido em laboratório, o facto de ter um desenvolvimento embrionário rápido, elevada fecundidade e de os seus embriões serem grandes, transparentes e não mucilaginosos propulsionaram o seu uso em estudos de embriologia. O desenvolvimento embrionário do peixe-zebra tem um grande potencial para ser usado como referência na leccionação de disciplinas relacionadas com biologia do desenvolvimento tanto a nível do ensino superior como a nível do secundário; no entanto, os trabalhos de referência na área, além de não estarem disponíveis em língua portuguesa, são complexos e demasiado aprofundados. Assim, o objetivo deste trabalho foi descrever o desenvolvimento embrionário do peixe-zebra com uma linguagem científica adequada a vários níveis de ensino.

Palavras-chave

Danio rerio
embriogénese
morfogénese
zigoto
clivagem
blástula
gástrula
segmentação
faringula e eclosão

Carla Quintaneiro¹

Mariachiara Gagliardi²

Luigi Capone²

Inês Domingues^{1*}

¹Departamento de Biologia & CESAM,
Universidade de Aveiro, Campus
Universitário de Santiago, Aveiro, Portugal.

²Dipartimento di Scienze e Tecnologie,
Università degli studi del Sannio,
Benevento, Itália.

* inesd@ua.pt

ISSN 1647-323X

Artigo em acesso aberto sob [licença CC-BY](#)

© 2021 Autores

INTRODUÇÃO

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um pequeno peixe de água doce da família Ciprinidae, nativo do sul da Ásia, originário dos principais rios da Índia, Bangladesh e Nepal; habita regiões alagadiças, sendo comumente encontrado em águas pouco profundas, paradas ou com pouca corrente, com vegetação aquática submersa e lodo. Alimenta-se principalmente de zooplâncton, de uma grande variedade de insetos e em menor quantidade de algas, detritos e de outros materiais orgânicos. É uma espécie gregária, vivendo em cardume de 5 a 20 indivíduos. Os adultos têm listas azuladas horizontais, medem cerca de 4 a 5 cm e vivem aproximadamente 2,5 a 3 anos (em cativeiro) (Figura 1). O peixe-zebra tem dimorfismo sexual não muito acentuado sendo que a protuberância abdominal das fêmeas grávidas é o maior distintivo entre sexos. Os peixes acasalam em grupos no



FIGURA 1: Cardume de peixes-zebra adultos.

início da manhã, executando um ritual em que os machos se movimentam à volta das fêmeas para estimular a liberação dos ovos. Normalmente preferem reproduzir-se em águas rasas e paradas com muita vegetação; os ovos são depositados no fundo (ovos demersais) e deixados sem cuidados. Os embriões desenvolvem-se e eclodem em 48 a 72 horas a 28,5°C. Normalmente, 24 a 78 horas após eclosão a bexiga natatória das larvas já se encontra operacional permitindo que estas se comecem a alimentar ativamente (Dammski et al, 2011). Ao final de 3 a 4 meses os peixes atingem a maturação sexual.

Inicialmente, esta espécie suscitou interesse para aquarioria devido à sua grande tolerância a variações ambientais (por ex. o pH e a temperatura registados em diversas zonas de onde é originário variam entre 5,9 a 8,5 (pH) e 16 a 38°C (temperatura)). No entanto, a sua facilidade em ser mantido e reproduzido em cativeiro tornaram-no um modelo científico com interesse crescente em diversas áreas. Juntamente com estas características, o facto de ter um desenvolvimento embrionário rápido, elevada fecundidade (as fêmeas podem pôr centenas de ovos semanalmente) e de os seus embriões serem grandes e transparentes (permitindo observar todas as estruturas internas) propulsionaram o seu uso em estudos de embriologia e manipulação genética permitindo vários estudos de investigação de mapeamento genético. O seu genoma foi sequenciado e comparado com o genoma humano, tendo-se verificado que 70% dos genes humanos têm genes homólogos no peixe-zebra (Howe et al, 2013), facto que o torna um modelo extremamente importante no que toca ao estudo do desenvolvimento e progressão de doenças. Nos dias de hoje é usado não só em ciências biomédicas mas também em ciências ambientais, nomeadamente em estudos de ecotoxicologia e avaliação de riscos ambientais.

Hisaoka e Battle (1958) e Hisaoka e Firlit (1960) foram dos primeiros cientistas a descrever o desenvolvimento embrionário do peixe-zebra. No entanto, em 1995, Kimmel e seus colaboradores (Kimmel et al., 1995) fizeram-no de uma forma mais completa e detalhada, sendo até hoje o trabalho de referência na área. O desenvolvimento embrionário do peixe-zebra tem um grande potencial para ser usado como

referência na lecionação de disciplinas relacionadas com biologia do desenvolvimento tanto a nível do ensino superior como a nível do secundário. No entanto, os trabalhos de referência mencionados acima, além de não estarem disponíveis em língua portuguesa, são complexos e demasiado aprofundados. Assim, o objetivo deste trabalho foi descrever o desenvolvimento embrionário do peixe-zebra com uma linguagem científica adequada a vários níveis de ensino e criar um repositório aberto de fotografias, disponibilizado perante solicitação.

METODOLOGIA

Os ovos de peixe-zebra foram obtidos através da reprodução de peixes adultos no biotério do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro usando metodologias já publicadas (Reis et al., 2019). Os ovos foram colocados em placas de Petri com água do cultivo usada no biotério e foram mantidos a 28,5°C sendo monitorizados regularmente usando uma lupa binocular acoplada a uma máquina fotográfica (Stereoscopic Zoom Microscope-SMZ 1500, Nikon Corporation). Foram tiradas fotografias dos embriões aproximadamente de meia em meia hora até às 17 horas de desenvolvimento e com maior espaçamento após este período para que os principais estádios de desenvolvimento fossem representados no registo fotográfico. Nalguns estádios foram capturadas fotografias de vários planos de focagem do embrião. Nesse caso o software Helicon Focus 7 (Helicon Soft Ltd.; versão trial) foi usado para juntar as fotografias dos diversos planos. O desenvolvimento embrionário foi monitorizado até às 120 horas após fertilização.

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

A embriogénese do peixe-zebra compreende 8 períodos, nomeadamente:

1. Zigoto (0 h): fase que decorre desde o ovo recém fertilizado até à primeira divisão celular.
2. Clivagem ($\frac{3}{4}$ h): fase em que 2 a 7 ciclos celulares ocorrem rápida e sincronizadamente.
3. Blástula ($2 \frac{1}{4}$ h): fase em que ocorrem 8 a 9 ciclos celulares rápidos e quase sincronizados seguidos de ciclos longos e não sincronizados na transição da blástula média; começa a epibolia.
4. Gástrula ($5 \frac{1}{4}$ h): nesta fase ocorrem movimentos morfogenéticos de involução, convergência e de extensão que formam o epiblasto, hipoblasto e o eixo embrionário; até ao final da epibolia.
5. Segmentação (10 h): nesta fase desenvolvem-se os somitos, os primórdios dos arcos branquiais e os neurómeros; ocorre a organogénese primária; dão-se os primeiros movimentos e aparece a cauda.
6. Farínghula (24 h): embrião em estágio filotípico; o eixo corporal, até aí curvado à volta do vitelo, endireita-se; aparece a circulação e inicia-se o desenvolvimento da pigmentação e das barbatanas.
7. Eclosão (48 h): completa-se a morfogénese dos sistemas de órgãos primários. Desenvolve-se a cartilagem na cabeça e nas barbatanas peitorais.
8. Larva inicial (72 h): a bexiga natatória infla, iniciam-se os comportamentos de alimentação e evitamento.

De referir que o desenvolvimento embrionário está dependente da temperatura a que os embriões se encontram, sendo que, dentro dos limites da espécie, o desenvolvimento é tanto mais rápido quanto mais elevada for a temperatura. Assim, neste trabalho os tempos referidos correspondem ao desenvolvimento de embriões sujeitos a uma temperatura de 28,5°C.

Zigoto (0 – ¾ h)

Esta fase corresponde ao período após a fertilização do ovo até à ocorrência da primeira divisão celular cerca de 40 minutos após a fertilização. O ovo do peixe-zebra é telolecítico (a maior parte do ovo é constituído por vitelo nutritivo) e tem aproximadamente 0,7 mm de diâmetro na altura da fertilização. Após a fertilização, o córion ou cório dilata e separa-se do ovo fertilizado formando o espaço perivitelínico (Figura 2A). A fertilização induz a ocorrência de movimentos citoplasmáticos que darão origem a um polo animal (onde se forma o blastodisco ou disco germinativo que irá dar origem ao embrião propriamente dito) e a um polo vegetal (vitelo nutritivo que permanece indivisível) (Figura 2B).

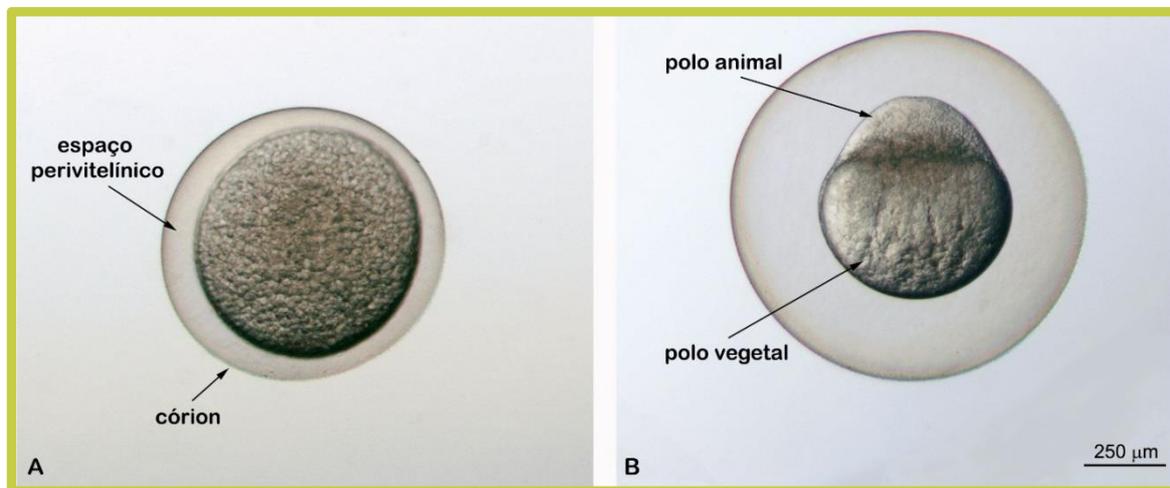


FIGURA 2: Fase do zigoto. A: ovo recém fertilizado; B: zigoto com o polo animal no topo e o polo vegetal a ocupar a maior parte do zigoto.

Clivagem (¾ – 2 ¼h)

No período de clivagem observam-se divisões celulares rápidas (a cada 15 minutos) e sincronizadas que fazem com que o número de células ou blastómeros no pólo animal aumente exponencialmente originando uma massa de células (Figura 3 e 4). Nesta fase, o embrião não aumenta de tamanho. A divisão do citoplasma é meroblástica ou incompleta, significando que os blastómeros ficam ligados uns aos outros por pontes citoplasmáticas. Podem ser identificados diferentes estádios neste período:

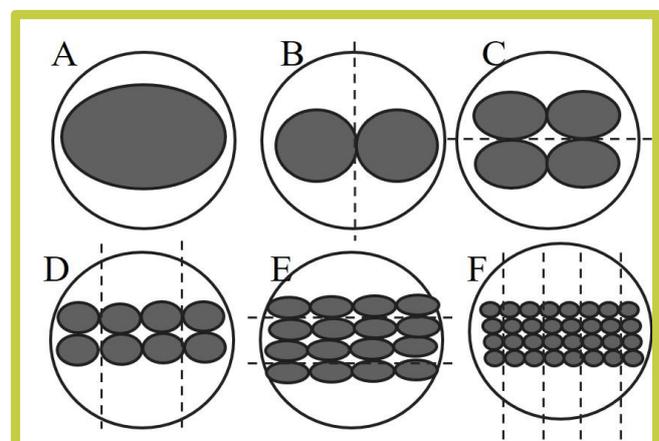


FIGURA 3: Esquema do processo de clivagem. A: estágio de 1 célula; B: estágio de 2 células; C: estágio de 4 células; D: estágio de 8 células; E: estágio de 16 células; F: estágio de 32 células.

- Estádio de 2 células: o 1º sulco de clivagem é orientado verticalmente, progredindo do pólo animal para o pólo vegetal, mas sem nunca entrar na parte do vitelo. Os dois blastómeros são iguais (Figuras 3 e 4A).
- Estádio de 4 células: os dois blastómeros sofrem uma clivagem incompleta (2º ciclo celular), num plano que passa no pólo animal perpendicularmente ao plano da 1ª clivagem (Figura 3 e 4B).
- Estádio de 8 células: a clivagem no final do 3º ciclo celular é ainda incompleta e ocorre em dois planos paralelos ao 1º plano de clivagem e em ambos os lados deste.

• Estádio de 16 células: a clivagem ocorre em dois planos, paralelos à segunda clivagem e em ambos os lados desta. Pela primeira vez algumas das células sofrem uma clivagem completa (o quarteto mais central que fica completamente rodeado das outras células) (Figuras 3 e 4C). Os blastómeros marginais permanecem ligados por pontes citoplasmáticas. A partir daqui e até ao período da blástula média as clivagens dividem sempre completamente os blastómeros do centro, mas não os marginais.

• Estádio de 32 células: A clivagem no final do 5º ciclo celular ocorre ao longo de 4 planos paralelos, no entanto os sulcos podem agora ter orientações oblíquas (Figuras 3 e 4D).

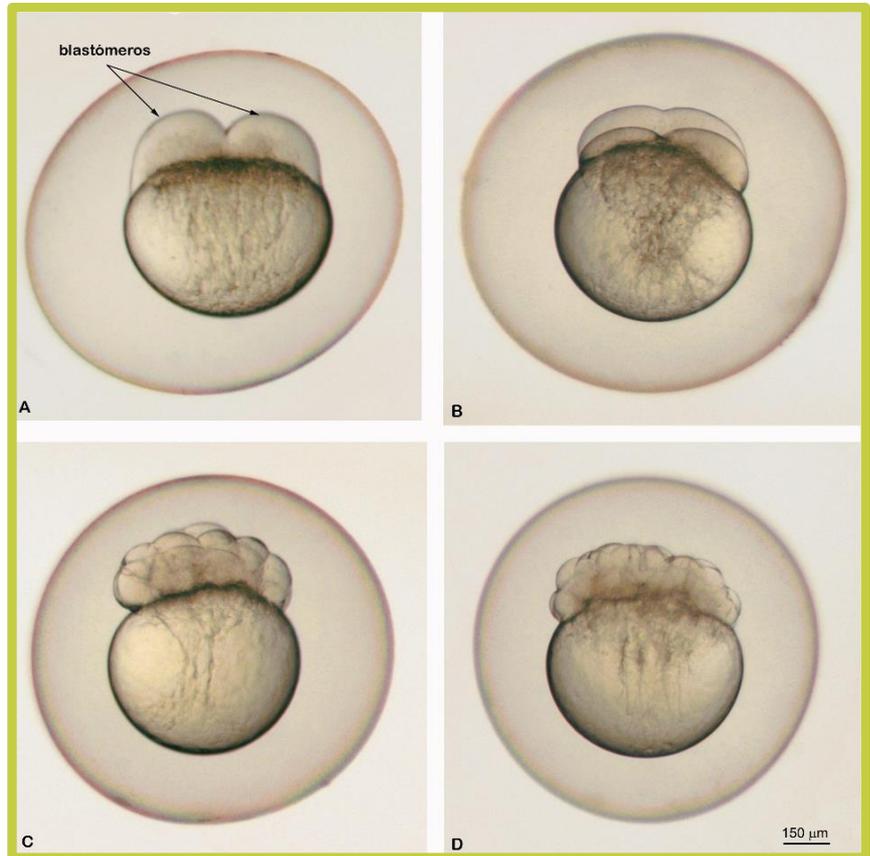


FIGURA 4: Fase de clivagem. A: estágio de 2 células; B: estágio de 4 células; C: estágio de 16 células; D: estágio de 32 células.

• Estádio de 64 células: a clivagem ocorre horizontalmente, sendo que, numa vista do polo animal este estágio pode assemelhar-se ao de 32 células apesar das células neste estágio serem mais pequenas. Pela primeira vez os blastómeros cobrem-se uns aos outros, encontrando-se em planos diferentes. A camada unicelular de blastómeros mais à superfície que recobre todos os outros chama-se camada envolvente e dará origem mais tarde à periderme (Figura 7).

Período de blástula (2 ¼ – 5 ¼ h)

No estágio de 128 células (8º ciclo celular zigótico) o blastodisco tem o aspeto de uma bola de células no topo do vitelo marcando o início do período de blástula (#1) que se estenderá até à gastrulação (ciclo 14). Os principais acontecimentos deste período são a transição da blástula média, a formação da camada sincicial do vitelo e o começo da epibolia (Figuras 6 e 7).

#1 Sabias que... Em embriologia, a blástula forma-se quando surge uma cavidade (blastocélio) no aglomerado de células resultante da clivagem. A blástula é assim uma esfera oca de células embrionárias constituída por uma camada unicelular (Figura 5). No peixe-zebra não existe blastocélio, sendo que neste caso a blástula se designa por estereoblástula.

No início do período de blástula as células continuam a dividir-se ao mesmo ritmo da fase anterior, mas de forma metassíncrona porque as mitoses não ocorrem exatamente ao mesmo tempo. No estágio de 512 células (10º ciclo celular) inicia-se a transição da blástula média (*mid blastula transition*) onde os ciclos celulares se tornam mais demorados (#2) e assíncronos, as células adquirem motilidade e inicia-se a transcrição de mRNA do embrião (#3). Ao

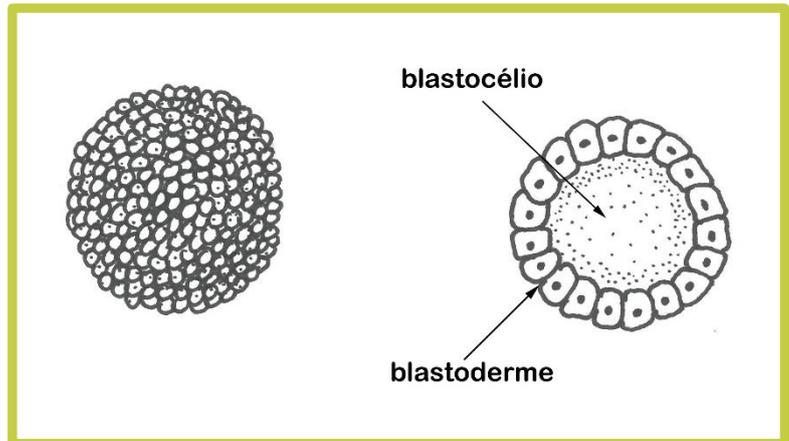


FIGURA 5: Esquema da fase de transição da blástula média (*mid blastula transition*).

mesmo tempo que se dá esta transição da blástula média ocorre a formação da camada sincicial do vitelo (CSV). A CSV forma-se quando os blastómeros que se encontram encostados ao vitelo colapsam libertando o seu citoplasma e núcleo no citoplasma do vitelo adjacente. Os núcleos da CSV continuam a dividir-se, mas estas divisões não são acompanhadas por divisões citoplasmáticas de modo que o vitelo permanece sem clivagens. A CSV é exclusiva dos teleósteos, tem uma localização entre as células embrionárias e o vitelo e pensa-se que terá um papel na nutrição do embrião (Figura 7).

No final do período de blástula inicia-se a epibolia (Figuras 6 E e F), processo que consiste no adelgaçamento e expansão tanto da CSV como do blastodisco à volta do vitelo (para facilitar a visualização imaginar um gorro (o blastodisco) a entrar na cabeça (vitelo)). Ao mesmo tempo, o vitelo também altera a sua forma: a superfície da CSV projecta-se em direção ao pólo animal (formando um domo) aumentando a área de contacto com o blastodisco. A camada envolvente adelgaça e estica até formar uma fina monocamada difícil de ver.

#2 Sabias que... Os investigadores tentaram perceber porque é que por volta do 10º ciclo celular os ciclos começavam a ter durações diferentes e chegaram à conclusão que a duração do ciclo estava relacionada com o tamanho (volume) dos blastómeros: células mais pequenas sofrem ciclos mais demorados. Os diferentes tamanhos das células eram por sua vez devido a divisões celulares assimétricas (Kane e Kimmel, 1993).

#3 Sabias que... Até este momento o zigoto não produz o seu próprio mRNA, as proteínas necessárias para a proliferação celular produzem-se à custa do mRNA proveniente da mãe que foi integrado no oócito. O DNA do embrião até aqui está reprimido por vários mecanismos (por ex. metilação) (Meehan et al., 2005).

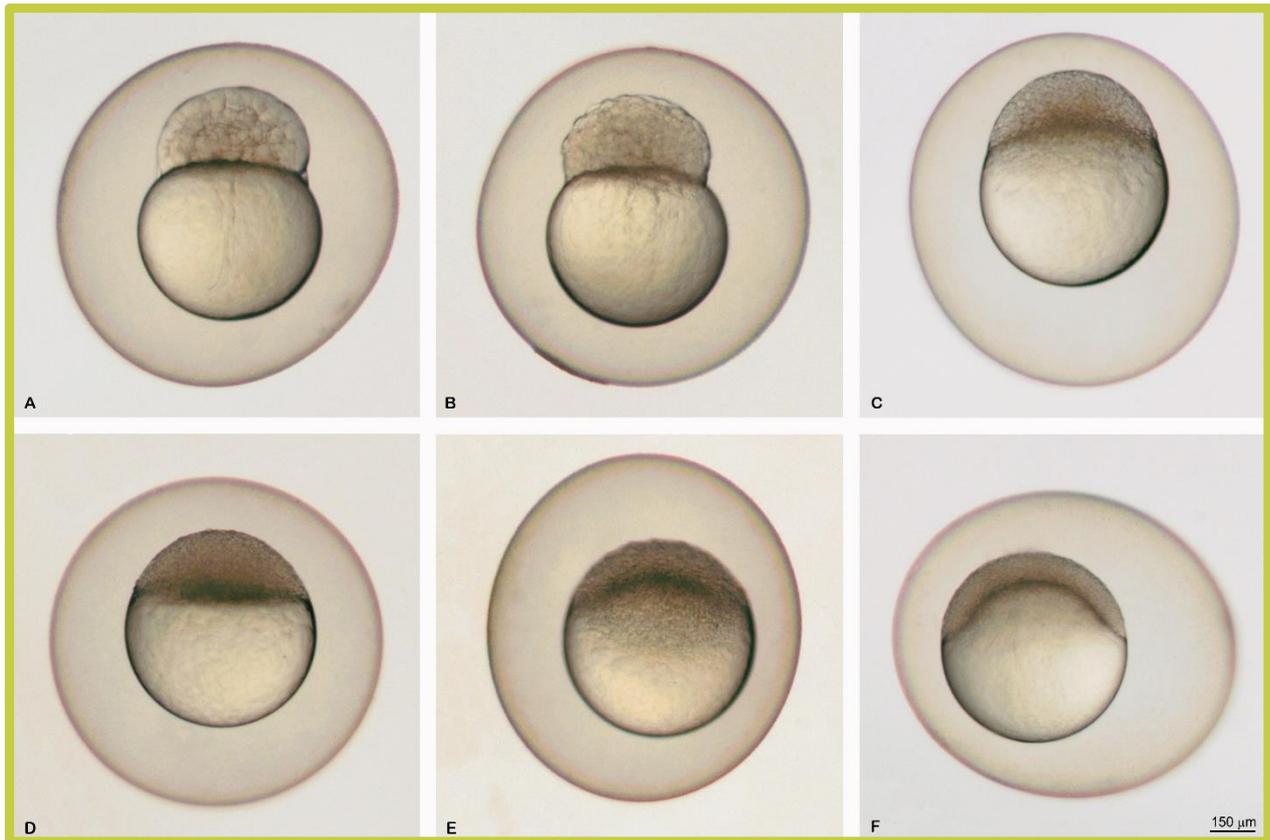


FIGURA 6: Fase de blástula. A: estágio de 256 células; B: estágio de 512 células a 1K; C: estágio oblongo; D: estágio de esfera; E: estágio de domo; F: estágio de 30% epibolia.

Podem ser identificados diferentes estádios neste período:

- Estádio de 128 células: blastodisco constituído por 5 camadas de blastómeros, os planos de clivagem são irregulares.
- Estádio de 256 células: blastodisco constituído por 7 camadas de blastómeros (Figura 6A).
- Estádio de 512 células: inicia-se a transição da blástula média, os ciclos celulares alongam-se, embrião constituído por 9 camadas de blastómeros, inicia-se a formação da camada sincicial do vitelo (CSV).
- Estádio de 1 K células: blastodisco constituído por 11 camadas de blastómeros, a CSV contém uma única camada de núcleos, ligeira assincronia nas divisões celulares (Figura 6B).
- Estádio alto: > 11 camadas de blastómeros, estágio em que o blastodisco atinge a sua altura máxima acima do vitelo, observam-se 2 camadas de núcleos na CSV, as divisões celulares são assíncronas.
- Estádio oblongo: o eixo animal-vegetal da blástula encurta, o blastodisco é comprimido em direção ao vitelo produzindo uma forma elíptica, a CSV contém múltiplas camadas de núcleos, a camada envolvente é agora extremamente fina (Figura 6C).
- Estádio de esfera: o eixo animal-vegetal continua a encurtar produzindo uma blástula esférica, a borda entre o blastodisco e o vitelo é direita (Figura 6D).

- Estádio de domo: o vitelo forma um domo em direção ao polo animal constituindo o primeiro sinal de que a epibolia começou (Figura 6E).
- Estádio de 30% epibolia: o blastodisco, agora designado blastoderme, tem espessura uniforme, a sua margem atinge 30% da distância entre o polo animal e vegetal (Figura 6F). Esta blastoderme é constituída por uma camada envolvente extremamente fina e por uma camada de células profundas com aproximadamente 4 células de espessura (Figura 7). A percentagem de epibolia será usada para identificar os próximos estádios de desenvolvimento e corresponde à fração de vitelo coberta pela blastoderme.

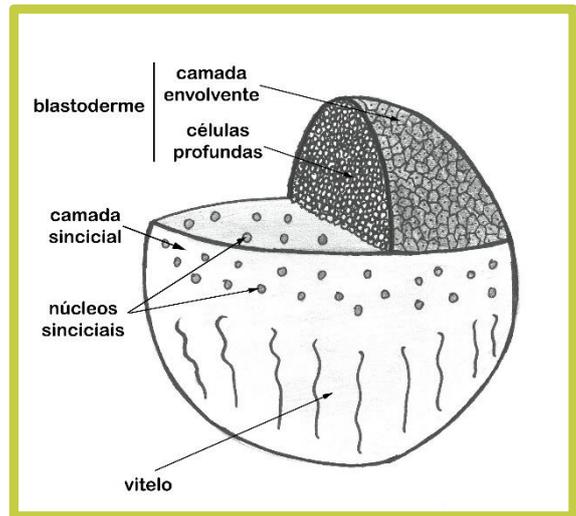


FIGURA 7: Esquema de uma blástula.

Gástrula (5 ¼ – 10 h)

Neste período a epibolia continua e ocorrem movimentos celulares morfogenéticos de involução, convergência e extensão produzindo as camadas germinativas primárias e o eixo embrionário (Figuras 8, 9 e 10).

O início da gastrulação ocorre no estágio de 50 % de epibolia quando, através de movimentos de involução, a borda da blastoderme dobra para trás de si própria, formando uma região espessada e marginal: o anel germinativo (Figura 8). O anel germinativo contém já duas camadas germinativas: o epiblasto em cima e o hipoblasto em baixo. A fissura entre as duas camadas chama-se brecha de Brachet. As células do epiblasto dividem-se em direção à margem e as células que chegam à margem movem-se em direção ao interior para integrar o hipoblasto (Figura 8). No final da gastrulação as células que permanecem no epiblasto correspondem à ectoderme e originarão a epiderme, o sistema nervoso central, a crista neural e placódios sensoriais. O hipoblasto originará a mesoderme e endoderme (#4). Apenas a camada de células profundas sofre este movimento de involução, a camada envolvente não: ela diferencia-se diretamente em periderme, uma camada unicelular que recobre todo o embrião (Figura 9). Ocorre de seguida uma convergência de células de todos os sectores da blastoderme para o lado dorsal, originando uma acumulação de células: o escudo embrionário. À medida que o escudo embrionário se estende em direção ao pólo animal, fica definido o eixo embrionário primário (Figura 8 e 9). Esta estrutura marca o futuro lado dorsal do embrião. A epibolia para temporariamente neste processo, mas após a formação do escudo embrionário retoma e a margem da blastoderme avança à volta do vitelo até o cobrir completamente. O período de gástrula termina com o final da epibolia e a formação do primórdio da cauda (Figura 10I).

#4 Sabias que... Em muito organismos a blástula sofre uma invaginação e dá origem a uma gástrula constituída por 3 camadas germinativas (endoderme, mesoderme e ectoderme), que rodeiam um espaço denominado arquêntero que se liga ao exterior por um blastóporo. No desenvolvimento do peixe-zebra a gastrulação não se faz por esta via, pelo que não resultam três camadas germinativas, mas apenas duas (a ectoderme e a mesendoderme). Também não se observa o arquêntero nem o blastóporo.

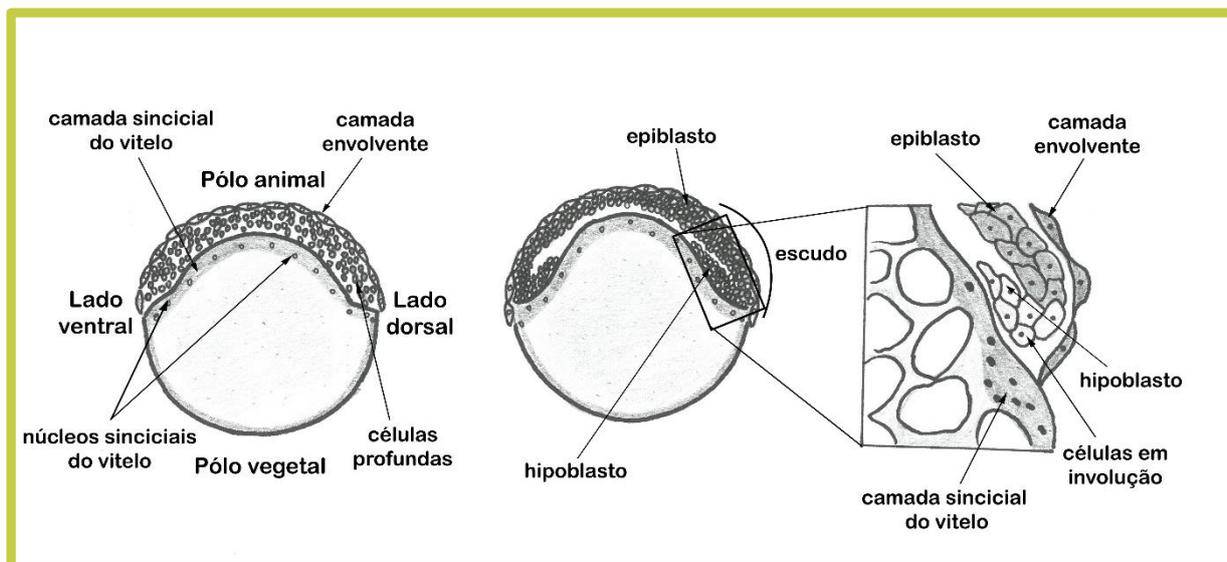


FIGURA 8: Esquema da gastrulação, movimentos celulares (adaptada de Gilbert, 2000).

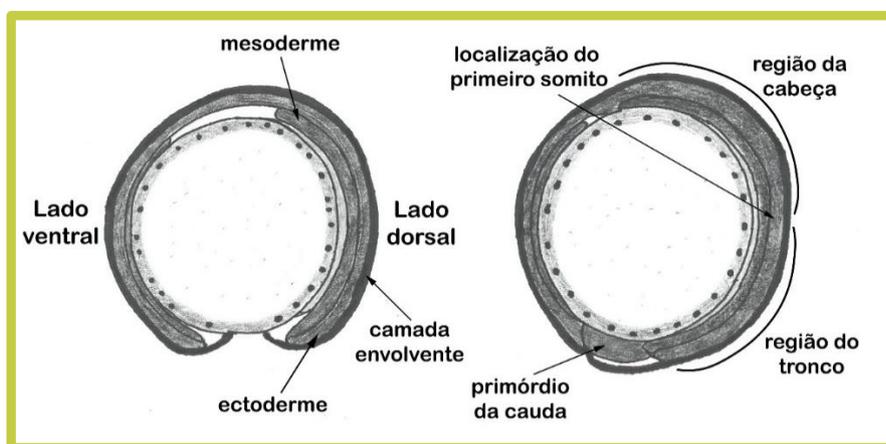


FIGURA 9: Esquema da gastrulação, formação da ectoderme e mesoderme.

Estádios do período de gástrula:

- 50% epibolia: a blastoderme tem ainda uma espessura uniforme e cobre 50% da distância entre o pólo animal e vegetal (Figura 10A).
- Anel germinativo: forma-se um anel espesso na margem da blastoderme. A blastoderme no anel é composta, para além da camada envolvente, por duas camadas, o epiblasto na parte de cima (com uma espessura de 3 camadas celulares) e o hipoblasto que se localiza entre epiblasto e a camada sincicial do vitelo (com uma ou duas células de espessura) (Figura 10B e C).
- Escudo embrionário: o epiblasto e o hipoblasto estão espessados no escudo. Pela primeira vez é possível identificar os eixos antero-posterior e dorso-ventral do embrião, pois o escudo marca a região dorsal e as células do polo animal dão origem às estruturas da cabeça (Figura 10D e E).

Período de segmentação (10 – 24 h)

Depois da epibolia ocorre uma grande variedade de movimentos morfogenéticos, desenvolvem-se os somitos e o tubo neural, tornam-se visíveis os rudimentos dos órgãos primários, o primórdio da cauda torna-se mais proeminente e o embrião alonga-se. Ocorre a primeira diferenciação morfológica de células e os primeiros movimentos corporais. Os somitos aparecem sequencialmente no tronco e na cauda. A maioria das células de cada somito vão-se desenvolver como miótomos ou segmentos musculares e mais tarde vão adquirir uma forma em V. Os esclerótomos que originam cartilagem vertebral também derivam dos somitos. Neste período desenvolvem-se os pronefros (rim embrionário), diferencia-se o notocórdio e a endoderme torna-se morfológicamente distinta.

No final da gastrulação, o primórdio do sistema nervoso central, a placa neural, está já delineada. Forma-se agora o tubo neural por neurulação secundária, sendo que o seu lúmen se forma por um processo de cavitação em vez de haver levantamento e fusão de pregas neurais como por exemplo nos anfíbios. Aqui, forma-se primeiro um primórdio sem lúmen, chamado quilha neural, que origina um cilindro neural que por sua vez se torna oco originando o tubo neural (Figura 11). Ainda antes da cavitação, a parte anterior da quilha neural que formará o cérebro sofre morfogênese. No início da segmentação o cérebro rudimentar aparece uniformemente em todo o comprimento. Durante a primeira parte da segmentação, aparecem 10 protuberâncias chamadas neurómeros: as primeiras 3 são maiores e correspondem ao diencéfalo, telencéfalo e mesencéfalo. Os rudimentos dos olhos (primórdios óticos) surgem nas laterais do diencéfalo. Durante a última parte da segmentação aparecem os primórdios do hipotálamo e da glândula pineal também no diencéfalo. Os restantes 7 neurómeros são os rombómeros.

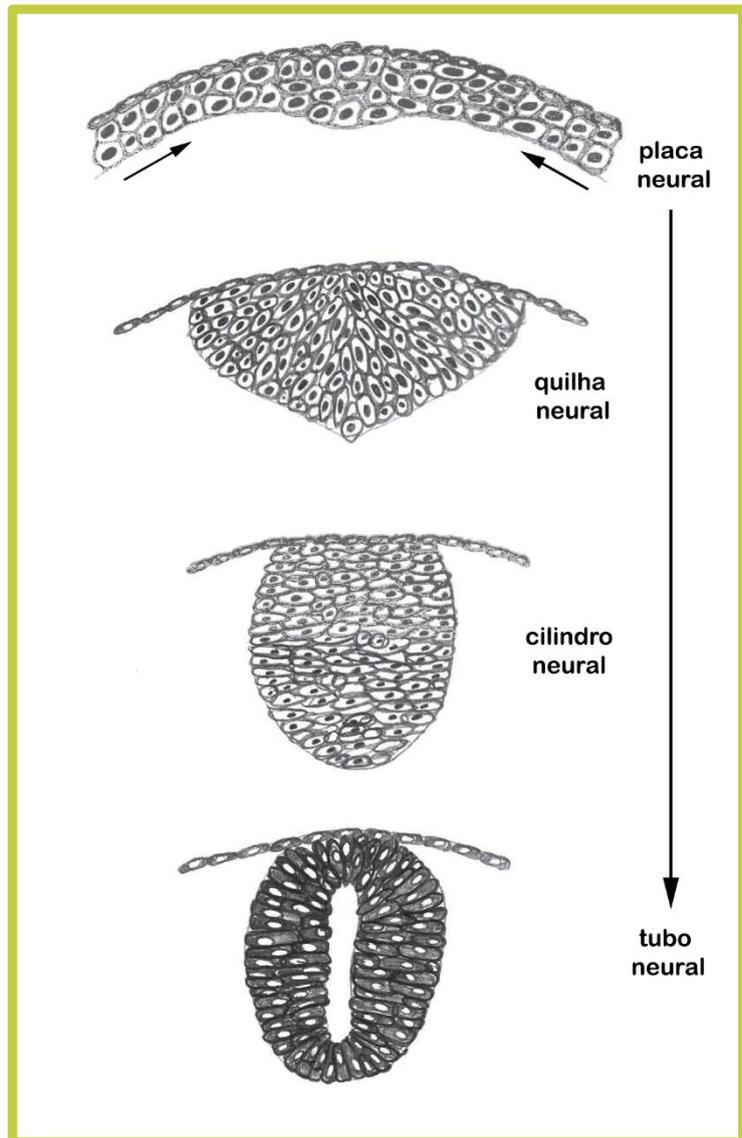


FIGURA 11: Esquema da neurogênese (adaptado de Araya, 2016).

A crista neural forma-se a partir da delaminação dos primórdios do cérebro e medula espinal começando no estágio da quilha neural e continuando até depois do tubo neural estar constituído. Numa posição adjacente à quilha neural formam-se placódios resultantes de espessamentos da ectoderme que originarão tecidos

sensoriais: placódio ótico, olfativo e auditivo. Juntamente com a morfogénese inicial do tubo neural começam a diferenciar-se os primeiros neurónios. Aparecem os primórdios dos arcos branquiais.

Estádios do período de segmentação:

- 1-somito: O sulco do primeiro somito forma-se normalmente após o final da epibolia e formação do primórdio da cauda (Figuras 12A, B, C).
- 5-somitos: os primeiros 5 a 6 somitos formam-se a uma taxa de 3 por hora. O embrião mede 0,8 mm (o mesmo que o zigoto). A placa neural começa a dar origem à quilha neural primeiro na zona do cérebro e depois no tronco. Distingue-se o primórdio ótico (Figuras 12D e E). No estágio de 8-somitos observam-se rudimentos dos pronefros e migração de células da crista neural na zona do cérebro (Figuras 12F, G e H).
- 14-somitos: a extensão do rudimento da cauda começa a alongar o embrião que mede agora 0,9 mm. Distinguem-se 4 divisões do cérebro. No tronco, a quilha neural arredonda no cilindro neural. Os somitos formam-se agora a uma taxa de 2 por hora e os mais antigos começam a desenvolver miótomos, adotando uma estrutura em V que indica a divisão futura dos miótomos em massas musculares dorsais e ventrais. A notocorda distingue-se na parte ventral da quilha neural. O vitelo sofre uma constrição na sua parte posterior conferindo-lhe uma forma de feijão. A constrição continua dando origem a uma extensão do vitelo mais fina e cilíndrica do lado posterior por oposição à região anterior em forma de bola. A cauda começa a destacar-se do corpo do embrião (Figura 12I).
- 20-somitos: O embrião alonga (1,4 mm) como resultado da constrição do vitelo. O placódio auditivo transforma-se numa vesícula que contém dois minúsculos otólitos. O cérebro torna-se oco com ventrículos ao longo do seu comprimento e consegue-se ver o rudimento do cerebelo. Aparece o primórdio da linha lateral. Os axónios crescem nos neurónios. Todos os somitos adquirem forma de V e os miótomos começam a produzir fracas contrações musculares. O ducto pronéfrico cresce a todo o comprimento do tronco e curva-se ventralmente marcando o local onde se irá desenvolver o ânus.
- 26-somitos: o embrião mede 1,6 mm, a parte posterior do tronco já está quase completamente esticada, mas a cauda ainda curva ventralmente. Os otólitos vêem-se claramente. Os últimos somitos formam-se mais lentamente, formando-se um número variável de 30 a 34 pares. Aparece o rudimento da barbatana média (Figuras 13A, B, C e D).

Faríngula (24 – 48 h)

A faríngula corresponde ao embrião que atingiu o estágio filotípico (#5) possuindo o plano corporal característico dos vertebrados.

Nesta fase o embrião tem uma organização claramente bilateral e um notocórdio bem desenvolvido. O sistema nervoso é oco e expandido anteriormente. No início deste estágio o cérebro está esculpido em 5 lóbulos. O nome faríngula deriva dos primórdios dos arcos branquiais que darão origem às mandíbulas, ao opérculo e às brânquias. Durante as primeiras horas do período de faríngula o embrião alonga-se rapidamente seguindo-se uma fase em que a taxa de alongamento decresce abruptamente. A cabeça endireita-se levantando-se dorsalmente.

#5 Sabias que... Em embriologia, o estágio ou período filotípico é o estágio de desenvolvimento em que os embriões de um grupo de espécies aparentadas partilham o máximo de pareanças. No caso do peixe-zebra o estágio filotípico representa a fase do desenvolvimento em que o embrião possui as características básicas dos vertebrados. Estas características são: tubo neural formado com vesículas cefálicas e respectivas estruturas sensoriais, musculatura segmentar, extremidades presentes (barbatanas ou membros), coração na região ventral e arcos branqueais na região da boca.

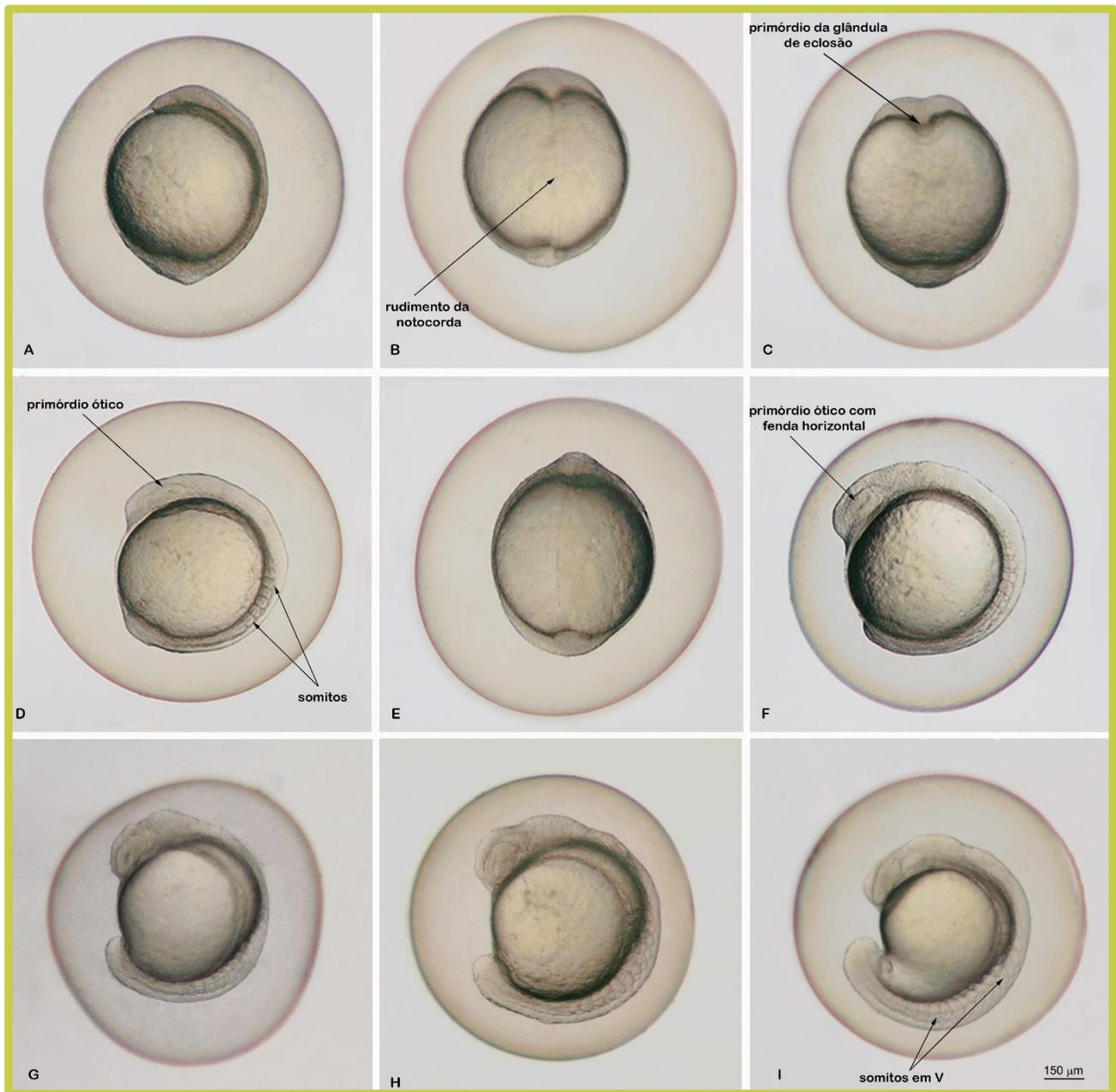


FIGURA 12: Fase de segmentação. A: estágio de 1-somito (vista lateral), B: estágio de 1-somito (vista dorsal); C: estágio de 1-somito (vista ventral); D: estágio de 5-somitos (vista lateral); E: estágio de 5 somitos (vista ventral), F: estágio de 7 somitos; G e H: estágio de 12 somitos; I: estágio de 14 somitos.

A morfogênese que acompanha este processo encurta a cabeça, tornando-a mais compacta ao longo do eixo antero-posterior. Os rudimentos do olho e do ouvido aproximam-se fornecendo um método para avaliação do estágio de desenvolvimento: simplesmente estimando o número de vesículas acústicas que caberiam no espaço entre o olho e a vesícula acústica (“Comprimentos de vesícula acústica” - CVA). Este número varia de 5 no início do período de farínghula até menos de uma no final.

No entanto, o método mais preciso utilizado para definir os estádios durante o período de farínghula consiste em determinar a extremidade de migração do primórdio da linha lateral posterior. Este primórdio migra na pele, de cada lado do corpo, a uma taxa de 1,7 miótomos por hora. Os estádios de primórdio “prim” definem-se pelo número do miótomo sobre o qual a extremidade do primórdio se sobrepõe. Nesta fase as barbatanas começam a formar-se, as células de pigmentos diferenciam-se, forma-se o sistema circulatório (o sangue começa a circular por um conjunto de canais fechados) e o coração começa a bater e tem câmaras bem delineadas. A nível comportamental, surge a sensibilidade tátil e as flexões descoordenadas que apareceram durante os estádios finais do período de segmentação são agora orquestradas em movimentos rítmicos.

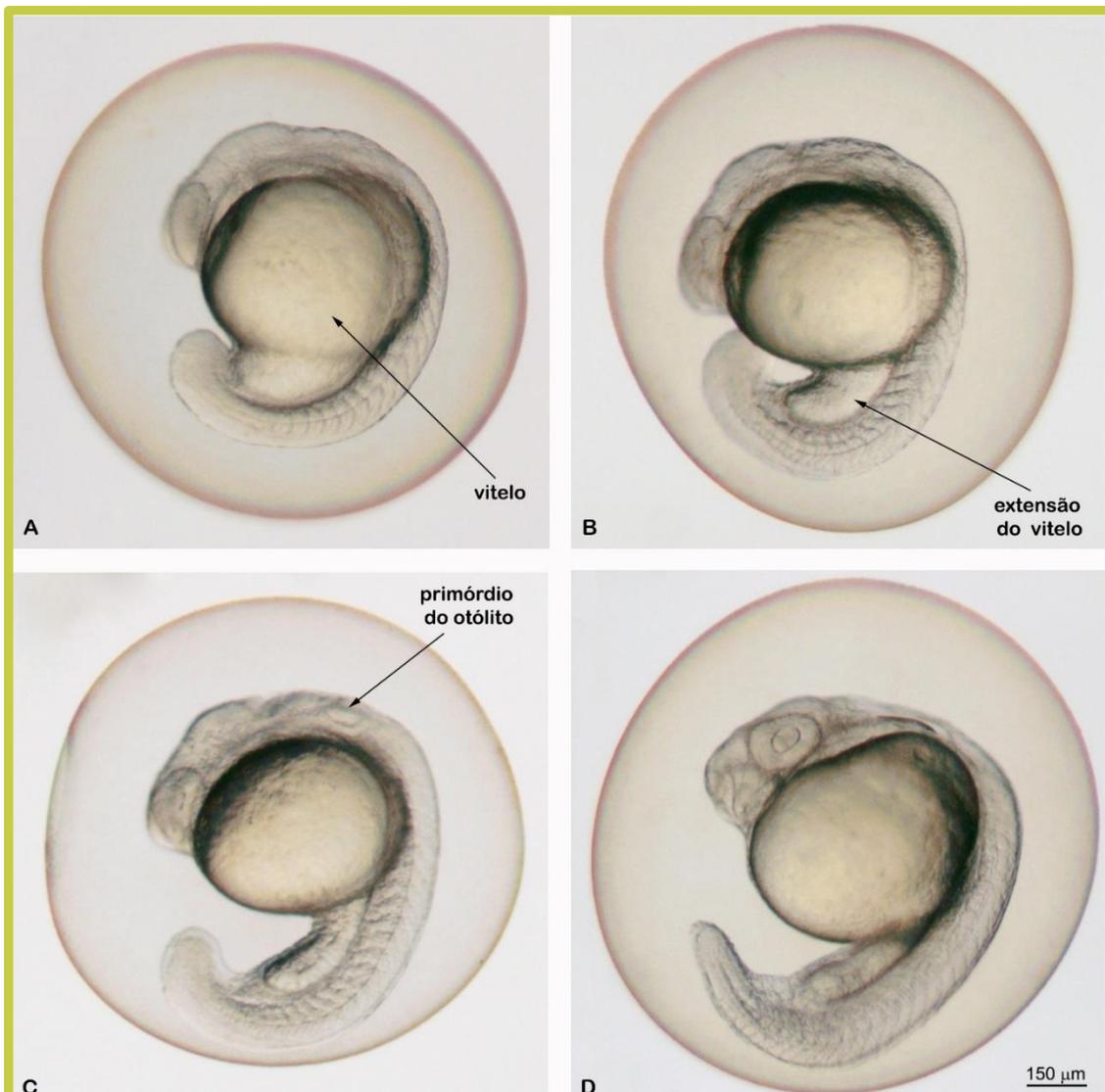


FIGURA 13: Fase de segmentação (continuação); A: estágio de 15 somitos; B: estágio de 17 somitos; C: estágio de 20 somitos; D: estágio de 25 somitos.

Estádios do período de faríngula:

- **Prim-5:** O embrião mede 1,9 mm, CVA = 5 e tem cerca de 30 somitos. O comprimento da extensão do vitelo é semelhante ao diâmetro maior da “bola” de vitelo (Figura 14A). Reconhece-se o rudimento da barbatana média. Às 26 horas (prim-8) o mesênquima acumula-se lateralmente ao terceiro somito, local onde as barbatanas peitorais irão aparecer. Os primórdios aparecerão às 28 - 29 horas. A pigmentação aparece no epitélio da retina e depois na pele nos melanóforos dorsolaterais. Os melanóforos irão aparecer num gradiente antero-posterior (Figura 14B - F). O embrião em prim-5 exhibe contrações espontâneas laterais. O coração tem primeiramente a forma de um cone ocupando o saco pericárdico na região mais anterior do vitelo. Começa a bater mesmo antes deste estágio, primeiramente sem direção e com ritmo por vezes interrompido. No estágio prim-7 o coração alonga-se e o batimento ocorre como uma onda no sentido antero-posterior. A maioria das células sanguíneas localizam-se nos ilhéus de Wolff e às 24/25 horas muitas migram para a região entre o vitelo e o notocórdio que é onde se vão formar os vasos sanguíneos mais importantes que fornecem o tronco e a cauda. Os circuitos sensoriais-motores começam a estar funcionais. Em prim-10 ocorrem as primeiras respostas táteis.
- **Prim-15:** O embrião mede 2,5 mm, CVA = 3. A extensão do vitelo é mais comprida que o vitelo. A porção ventral do primórdio da barbatana média estende-se anteriormente rodeando a extensão do vitelo. O embrião começa a desacelerar a sua taxa de alongamento à medida que a morfogénese da cauda termina. As células da camada pigmentada da retina desenvolvem grânulos de pigmentos visíveis. Agregados de melanóforos formam o início de uma risca dorsal e uma risca ventral. A migração de melanóforos é mais rápida na parte anterior do que em regiões mais posteriores e origina uma sub-região da risca ventral que se estende até à base dos olhos. O coração ainda é um tubo, mas os batimentos ocorrem já em duas partes sugerindo a existência de câmaras. As contrações espontâneas diminuem e o embrião tem agora uma resposta robusta a um estímulo de toque.
- **Prim-25:** O embrião mede 2,7 mm, CVA = 1. O comprimento da extensão do vitelo ultrapassa o diâmetro do vitelo. Desenvolvem-se fibras que originarão os raios na barbatana média. Os rudimentos das barbatanas peitorais vão aumentando de altura. A pigmentação torna-se mais proeminente no olho. A risca dorsal torna-se mais escura e estende-se do diencéfalo até ao extremo da cauda. Aparecem melanóforos lateralmente no tronco e cauda e também na parte dorsal e lateral do vitelo (Figura 14E). A circulação é forte e o coração, que até aqui era direito, dobra ligeiramente. O reflexo de fuga ao toque é agora mais longo e resulta já na movimentação do embrião.
- **High-pec:** O embrião mede 2,9 mm, CVA = $\frac{3}{4}$. O nome deste estágio deriva dos rudimentos da barbatana peitoral. Neste estágio a altura dos rudimentos é igual à largura da sua base. A extensão do vitelo tem uma forma cilíndrica distinta ao longo de todo o seu comprimento e mede 1,5 vezes o diâmetro do vitelo. A risca dorsal encontra-se já bem delineada até ao fim da cauda (Figura 14F). A pigmentação estende-se já até ao final da cauda apesar de com muitas lacunas. Na cabeça aparecem outros pigmentos: xantóforos e iridóforos. A curvatura do coração é agora evidente e marca a divisão entre o átrio e o ventrículo. Nesta fase ocorrem 180 batimentos por minuto.

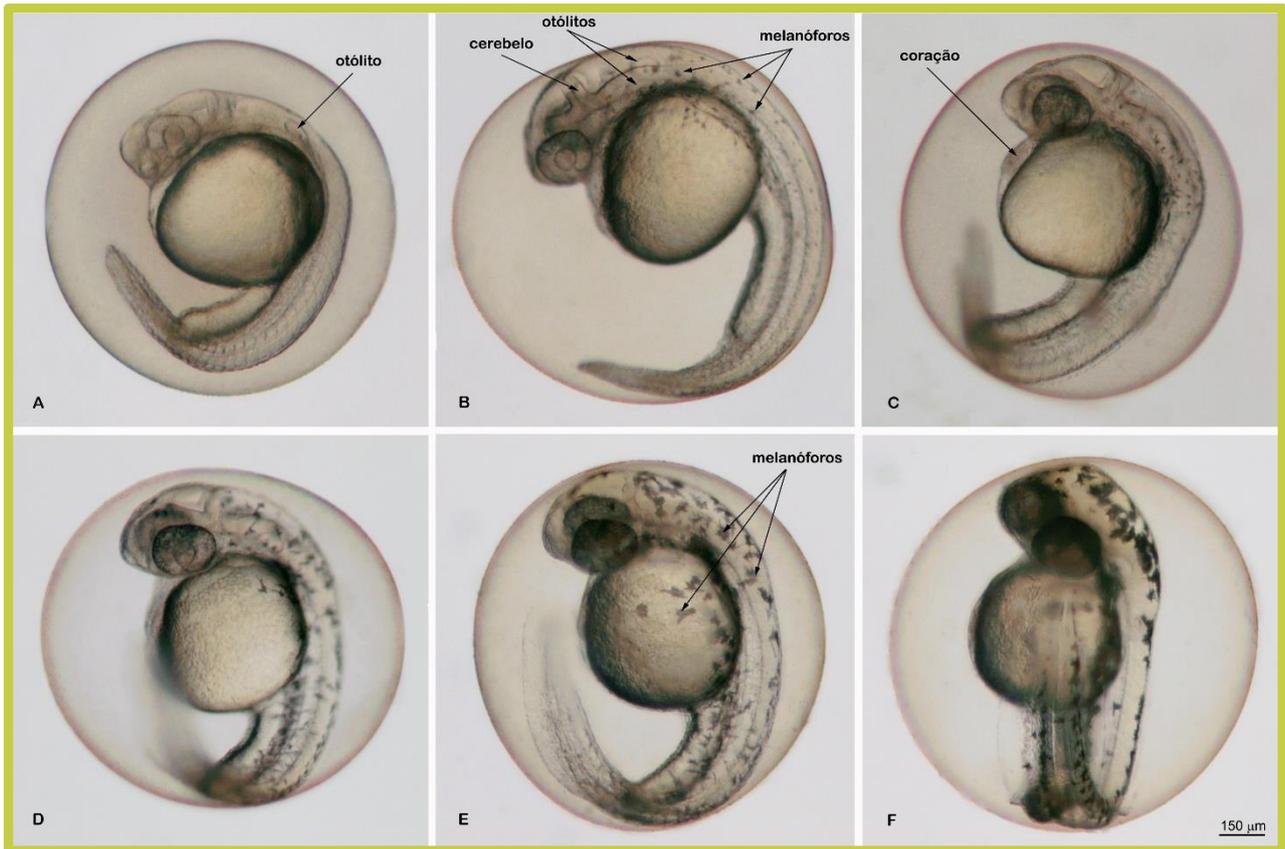


FIGURA 14: - Fase de faríngea; A: estágio Prim-5; B e C: estágio Prim-12; D e E: estágio Prim-20 F: estágio high-pec.

Eclosão (48 – 72 h)

A eclosão não é síncrona, os embriões podem eclodir em qualquer momento durante este período. Independentemente de terem eclodido ou não, são designados “embriões” os organismos até ao fim do terceiro dia e a partir daí “larvas”. Durante este período o embrião continua a crescer, a morfogénese de alguns órgãos rudimentares termina. Os rudimentos das barbatanas peitorais, das mandíbulas e das brânquias desenvolvem-se rapidamente. No início deste período os rudimentos das barbatanas são primórdios alongados que contêm já condensação do mesênquima que irá dar origem à cartilagem, a parte de cima do primórdio expande-se numa lâmina e aparecem os raios das barbatanas. Durante o início desta fase abre-se uma pequena boca no meio dos olhos que vai posteriormente reposicionar-se sobressaindo para além dos olhos.

Estádios do período de eclosão:

- **Long-pec:** o embrião mede 3,1 mm, CVA = $\frac{1}{2}$. Os primórdios das barbatanas peitorais estão bastante alongados. Devido ao consumo do vitelo e crescimento do embrião, vista de lado a bola de vitelo é aproximadamente do mesmo tamanho da cabeça, mas vista dorsalmente é ligeiramente mais larga. A extensão do vitelo tem agora uma forma ligeiramente cónica (Figuras 15 A, B e C).
- **Pec-fin:** o embrião mede 3,3 mm. A barbatana peitoral tem agora uma lâmina. Na vista dorsal a largura da cabeça (a nível dos olhos) excede a largura do vitelo. Na vista ventral consegue-se ver a boca ligeiramente aberta. Os músculos das mandíbulas diferenciam-se e os rudimentos dos filamentos das brânquias

aparecem. Pigmentação muito densa na retina. No tronco e cauda a linha lateral é ocupada por até 10 melanóforos (Figuras 15 D e E).

• **Protruding-mouth:** O embrião mede 3,5 mm. A boca está amplamente aberta e sobressai em relação aos olhos. As barbatanas peitorais continuam a expandir-se, estendendo-se posteriormente pela maioria do comprimento do vitelo (Figuras 16 A e B).

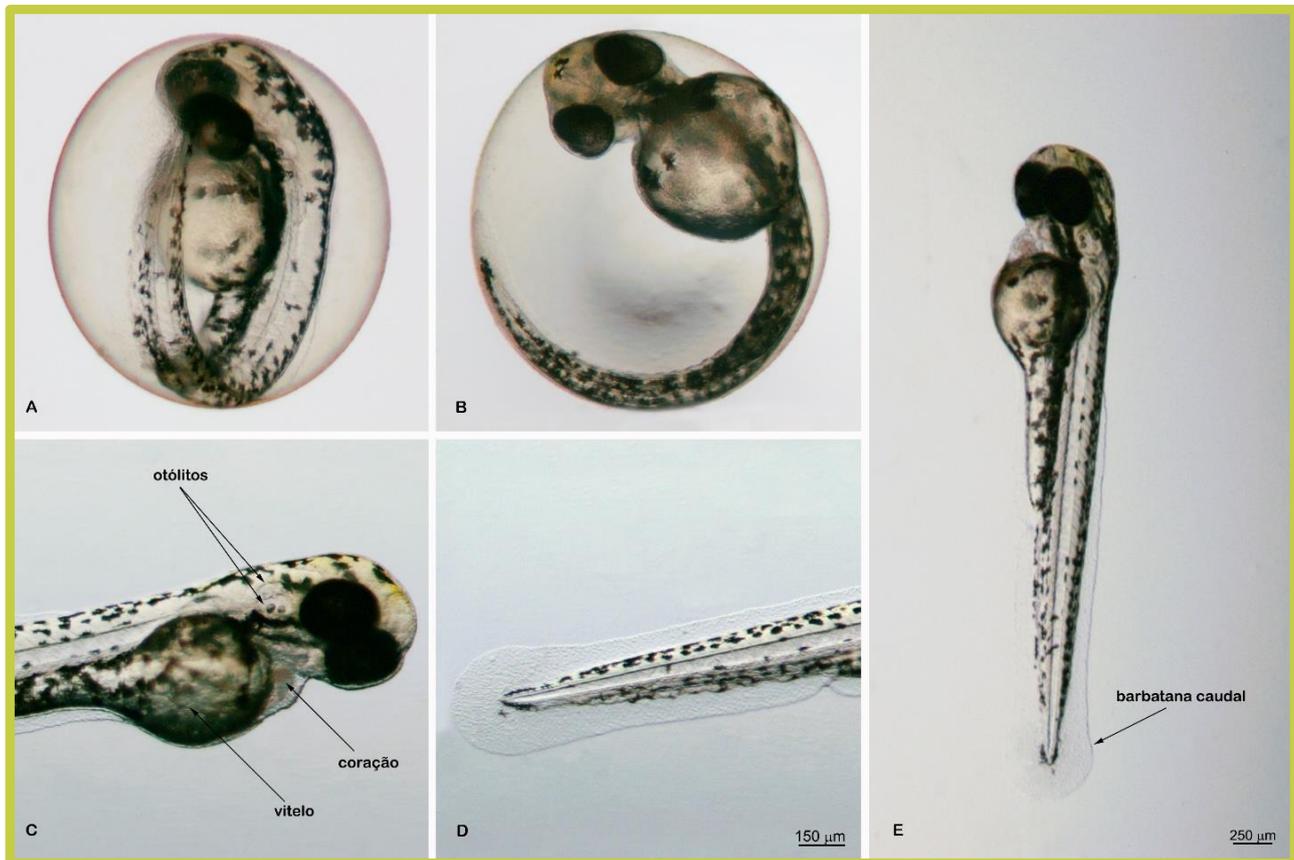


FIGURA 15: Fase de eclosão; A: estágio long-pec (vista lateral); B: estágio long-pec (vista dorsal); C: estágio pec-fin (pormenor zona anterior); D: estágio pec-fin (pormenor zona posterior); E: estágio pec-fin.

O primeiro osso visível do zebrafish, o cleitro, aparece superficialmente na divisão entre os dois primeiros miótomos e marca o fim da embriogénese. Este osso estende-se do crânio, a seguir à vesícula ótica, até ao último arco branquial e serve de âncora à barbatana peitoral.

Período da larva inicial

Pelo terceiro dia a larva completou a maioria da sua morfogénese e continua a crescer rapidamente. A bexiga natatória infla e a boca continua a sobressair. A extensão do vitelo “esvazia”. A larva começa a nadar ativamente, move as mandíbulas, os opérculos, as barbatanas peitorais e os olhos (Figuras 16 A e B).



FIGURA 16: Período de larva inicial; A: larva inicial (vista dorsal); B: larva inicial (vista lateral).

GLOSSÁRIO

Arcos branquiais: série de estruturas ósseas circulares que suportam as brânquias. São derivadas dos últimos 5 arcos faríngeos.

Arcos faríngeos: segmentos da parede lateral da faringe que originarão as mandíbulas (os primeiros dois arcos) e as brânquias (os 5 arcos posteriores).

Blastodisco: região do citoplasma que se forma a partir do vitelo em direção ao pólo animal durante e após o estágio de uma célula e que irá sofrer divisão celular e originar o embrião propriamente dito (o mesmo que disco germinativo).

Blastômero: células resultantes da clivagem (Fig 3 e 4).

Bexiga natatória: órgão cheio de gás que permite ao peixe controlar a sua flutuabilidade (Fig 16).

Cavitação: processo de formação de uma cavidade no seio de uma massa celular (Fig 11).

Clivagem: processo pelo qual o ovo fecundado unicelular se transforma numa massa de células denominadas blastômeros (Fig 3).

Córion ou cório: membrana que reveste o embrião (Fig 2).

Crista neural: população de células derivada da ectoderme embrionária que dá origem a diversos tipos de células tais como células de pigmentação da pele, neurónios periféricos, células da glia e da cartilagem da cabeça.

Divisão meroblástica ou incompleta: tipo de divisão celular em que as células resultantes não ficam completamente separadas

Epiblasto: a mais exterior das duas camadas de blastoderme que se formam durante a gastrulação, correspondendo à ectoderme (Fig 8).

Epibolia: adelgaçamento e expansão da blastoderme e camada sincicial do vitelo à volta do vitelo até à sua cobertura total (Fig 6).

Estádio filotípico: estágio mais conservado da embriogénese, onde, dentro de um filo, as espécies partilham as mesmas características de similaridade (Fig 14).

Genes homólogos: genes de duas espécies herdados de um ancestral comum e que têm as mesmas funções.

Hipoblasto: a mais interior das duas camadas de blastoderme que se formam durante a gastrulação, correspondendo à endoderme e mesoderme (Fig 8).

Linha lateral: sistema de órgãos sensoriais encontrado em peixes que serve para detetar movimento, vibração e gradientes de pressão no meio aquático envolvente. A linha lateral percorre longitudinalmente os lados do peixe desde as brânquias até à base da cauda.

Melanóforo ou melanócito: células derivadas da crista neural que contêm pigmentos pretos de melanina.

Mesênquima: tecido conjuntivo primitivo em forma de rede e menos compacto que um epitélio. Originará vários tecidos conjuntivos e musculares.

Neurómeros: segmentos do tubo neural do embrião.

Notocórdio: estrutura cilíndrica que serve de suporte ao embrião e à larva, localizada ventralmente ao tubo neural (Fig 12).

Oócito: célula sexual feminina (produzida nos ovários).

Organogénese primária: fase do desenvolvimento embrionário onde se inicia a formação dos primórdios dos vários órgãos a partir da diferenciação do epiblasto e do hipoblasto.

Otolito: são estruturas de carbonato de cálcio localizadas na vesícula acústica e que têm a função de controlar a posição do corpo do animal (manter o equilíbrio postural) (Fig 13-15).

Ovos demersais: ovos que não flutuam, após a postura permanecem no lodo ou vegetação.

Ovo meroblástico: tipo de ovo em que as divisões celulares iniciais não são completas (as células ficam parcialmente unidas).

Ovo teleolecítico: tipo de ovo que contém uma grande quantidade de vitelo nutritivo que ocupa quase a totalidade da massa do ovo.

Placódio: região espessada de um epitélio.

Plano corporal: organização anatómica característica dos organismos de determinado grupo.

Somitoss: blocos de células resultantes da segmentação da massa mesodérmica dorsal dispostos de forma regular ao longo dos dois lados do tubo neural do embrião (Fig 12).

Transição da blástula média (*mid blastula transition*): momento no estágio de blástula em que os ciclos celulares se alongam, as divisões perdem sincronicidade e em que se observa pela primeira vez mobilidade celular e transcrição com a maquinaria do próprio zigoto (Fig 5).

Tubo neural: cavidade que dará origem ao sistema nervoso central, desenvolve-se a partir do cilindro neural no final do período de segmentação.

agradecimentos • São devidos agradecimentos à FCT/MCTES pelo apoio financeiro ao CESAM (UIDP/50017/2020 + UIDB/50017/2020 + LA/P/0094/2020) através de fundos nacionais. Carla Quintaneiro foi financiada por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito da celebração do contrato-programa previsto nos números 4, 5 e 6 do art. 23.º do D.L. n.º 57/2016, de 29 de agosto, alterado pela Lei n.º 57/2017, de 19 de julho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araya, C, Ward, L C, Girdler, G C and Miranda, M (2016) Coordinating cell and tissue behavior during zebrafish neural tube morphogenesis. *Dev. Dyn.*, 245: 197-208. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24304>
- Aral F, Şahinöz E and Doğu Z (2011) Embryonic and Larval Development of Freshwater Fish, Recent Advances in Fish Farms pp 83-94, Dr. Faruk Aral (Ed.) ISBN: 978-953-307-759-8, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-fish-farms/embryonic-and-larval-development-offreshwater-fish>
- Costa, A Celestino da; Morato, M J Xavier (1984) Desenvolvimento Embrionário dos Vertebrados. Editorial Verbo
- Dammski A P, Muller B R, Gaya C and Regonato D (2011) Zebrafish -Manual de criação em biotério, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, URL: <https://gia.org.br/portal/wp-content/uploads/2013/06/ZEBRAFISH.pdf>
- Ganeco-Kirschnick L N, Franceschini-Vicentini I B, Paes M C F and Nakaghi L S O (2018) Embryonic development of teleost Brycon orbignyanus. *Zygote* 26(4): 294-300 DOI: <https://doi.org/10.1017/S0967199418000229>
- Gilbert, S F (2000) *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates ISBN-10: 0-87893-243-7
- Hisaoaka K K e Battle H I (1958) The normal developmental stages of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *J. Morphol.* 102:311-323.
- Hisaoaka K K e Firlit C F (1960) Further studies on the embryonic development of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *J. Morphol.* 107:205-225.
- Howe K, Clark M D, Torroja C F, Torrance J, Berthelot C et al. (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496: 498–503 DOI: 10.1038/nature12111
- Kane, D A e Kimmel C B (1993) The zebrafish midblastula transition. *Development* 119: 447-456
- Kimmel C B, Ballard W W, Kimmel S R, Ullmann B, Schilling T F (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203(3):253-310. DOI: 10.1002/aja.1002030302
- Meehan R R, Dunican D S, Ruzov A, Pennings S (2005) Epigenetic silencing in embryogenesis. *Exp Cell Res* 309(2):241-9.
- Reis S, Gagliardi M, Capone L, Domingues I (2019) Efeitos do composto 3,4-dicloroanilina na natação de larvas de peixe zebra. *Captar- Ciência e Ambiente para todos* 8(2):79-88 ISSN 1647-323X.