

CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL DESARROLLO DEL SISTEMA VISUAL EN LARVAS DE DORADA *Sparus aurata* (Linnaeus 1758) F.J. ROO¹; M.S. IZQUIERDO²; J. SOCORRO¹. M.J. CABALLERO.²

⁽¹⁾Instituto Canario de Ciencias Marinas, Gobierno de Canarias, PO Box 56, E-35200 Telde (Las Palmas), Islas Canarias, España.

⁽²⁾Dpto de Biología, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, PO Box 550, E-35017. Las Palmas, Islas Canarias, España.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio es aportar nuevos conocimientos sobre el desarrollo del sistema visual en los primeros estadios larvarios de dorada. El entendimiento de la ontogenia del sistema visual puede contribuir a la mejora en las condiciones de iluminación en el cultivo, las cuales podrían tener repercusiones en la obtención de larvas de mejor calidad y unas mayores tasas de supervivencia en el cultivo larvario.

Las larvas de la mayoría de los peces son predadores visuales, lo que indica la gran importancia que juega el sistema visual en desarrollo (BLAXTER, 1986). El comportamiento trófico de la larva estará íntimamente ligado al desarrollo de su capacidad visual, que depende directamente de la organogénesis de la retina. El estudio muestra que durante el desarrollo post-embrionario y en las primeras etapas de vida larvaria, el sistema visual de dorada *Sparus aurata*, histológicamente, es muy similar al descrito por otros autores para especies similares, *Pagrus major* (KAWAMURA, 1984), *Pagrus auratus* (PANKHURST, 1996) y *Pagrus pagrus* (L. 1758) (ROO *et al.*, 1998). El tercer día de vida de la larva es uno de los más importantes, necesita estar preparada para capturar y digerir sus presas. En este día la larva muestra todas las estructuras necesarias para la función visual. El epitelio pigmentario bien definido, el músculo de la lente está presente y el iris está completamente formado. Las condiciones de iluminación que se utilizan en los criaderos comerciales difieren bastante de las condiciones naturales, pudiendo ser un factor a tener en cuenta para la obtención de una mejor calidad de larvas así como unas mejores tasas de supervivencia.

Palabras clave: larva, dorada, histología, sistema visual.

HISTOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE *Sparus aurata* (Linnaeus 1758) LARVAE VISUAL SYSTEM DEVELOPMENT.

ABSTRACT

The aim of this study is to increase our knowledge about the seabream larvae visual system. The understanding of the ontogeny of the visual system could contribute to improve the lighting rearing conditions and hatchery management in order to obtain best larval quality and survival rates.

Fish larvae are usually visual feeders, indicating that vision plays an important role in larval development at this stage (BLAXTER, 1986). Trophic behaviour of the larvae is closely related with the development of the visual capacity, which depends directly on the retina organogenesis. This study shows that the development of the visual system during post-embrionary and first larval stages *Sparus aurata* histologically is very close to other sparids such as *Pagrus major* (KAWAMURA, 1984), *Pagrus auratus* (PANKHURST, 1996) and *Pagrus pagrus* (ROO *et al.*, 1998). In these species the most important changes in the eye structure occur in the lecithotrophic larvae as a preparation for prey capture. Third day post-hatch larva shows all the structures necessary for visual function. Well defined pigment epithelium and lens muscle was present and the iris was formed. The lighting regimes in commercial hatcheries are quite different from natural conditions, and this could be one factor to take into consideration to obtain best quality larvae and better survival rates.

Keywords: Larvae, seabream, histology and visual system.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día uno de los principales problemas que siguen frenando el desarrollo de la acuicultura de especies marinas, es la obtención de alevines de buena calidad y en cantidades suficientes.

Las larvas de la mayoría de los peces son predadores visuales, lo que indica, la gran importancia que juega el sistema visual en desarrollo (BLAXTER, 1986). El comportamiento trófico de la larva está íntimamente ligado al desarrollo de la capacidad visual, que depende directamente de la organogénesis de la retina. Durante los primeros estadios de desarrollo de los peces, tienen lugar grandes cambios en la estructura de la retina, que son debidos al desarrollo del propio individuo. Al igual que en dorada, otros espáridos como *Pagrus major* (KAWAMURA, 1984), *Pagrus auratus* (PANKHURST, 1996) y *Pagrus pagrus* (ROO *et al.* 1998) presentan los cambios más importantes en la estructura del ojo durante el período lecitotrófico, como una preparación para la captura de presas. Estos cambios coinciden con el desarrollo del sistema digestivo de la larva (SARASQUETE *et al.*, 1995; HERNÁNDEZ CRUZ *et al.*, 1990).

El objetivo de este trabajo fue establecer el patrón de desarrollo del sistema visual de las larvas de dorada desde la eclosión hasta los 15 días de vida, lo que puede contribuir a una mejora de las condiciones de luz en los criaderos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El cultivo larvario se realizó en 3 tanques cilindro-cónicos de fibra de vidrio con una capacidad de 100 l.

Se sembraron 125 huevos/litro en cada uno de los tanques. El alimento consistió en *Brachionus plicatilis*, a una concentración de 5-10 rot/ml.

Estudios histológicos.

Durante los cuatro primeros días de vida de la larva cada 24 horas se tomaron 30 larvas por tanque, para microscopía óptica, posteriormente se realizó un muestreo el día 10 y por último el día 15.

La toma de muestras se realizó durante el periodo de fotofase, por lo cual los ojos de las larvas estaban adaptados a la luz en el momento de su fijación. Las larvas enteras, fueron fijadas en formaldehído al 4%, tamponado con fosfato (pH= 7.6). Posteriormente, fueron deshidratadas en una batería de etanoles seguido de xilol, en un procesador de tejidos (Jung Histokinette 2000, Leica, Germany).e incluidas en parafina (Paraplast Plus, Panreac, España) usando un dispensador automático (Histoembedder, Leica, Germany). Los bloques se cortaron en un microtomo (Jung 2055 Autocut, Leica, Germany) a 4-5 micras. Las secciones se tiñeron con hematoxilina eosina y ácido peryódico-reactivo de Schiff-Hx (PAS-Hx). (MARTOJA Y MARTOJA-PIERSON, 1970, GARCÍA DEL MORAL, 1993)

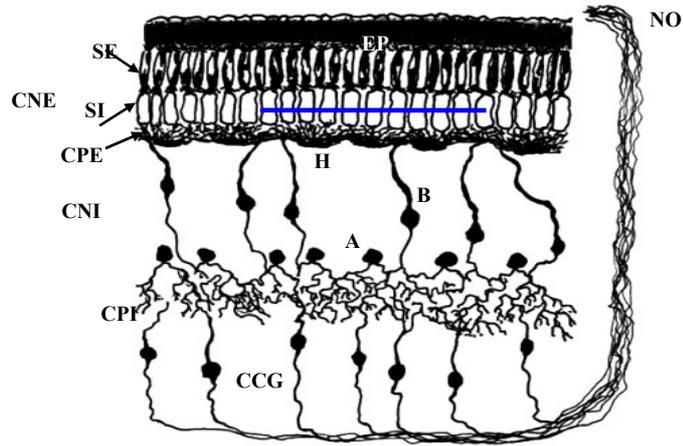
Con estas muestra se realizó un estudio descriptivo de las diferentes estructuras presentes en el sistema visual de la larva.

Morfometría y contajes celulares.

El contaje de células fotorreceptoras se realizó, en un segmento de 0.05mm seleccionado en la capa nuclear externa y dispuesto paralelamente a esta (Fig 1). Se contaron, dos segmentos por retina en tres larvas de cada grupo de edad. Estas mediciones, se realizaron con la ayuda de un programa informático de análisis de imagen (Image-pro Plus versión 2.0).

En los contajes no se diferenciaron conos dobles de simples, contándose ambos como una unidad.

Figura 1. Estructural de la retina, nervio óptico(NO), capa de células ganglionares (CCG), capa plexiforme interna (CPI), capa nuclear interna (CNI), células amacrinas (A), células bipolares (B), células horizontales (H), capa plexiforme externa (CPE), capa nuclear externa (CNE) constituida por los fotorreceptores, que se dividen en: segmento interno (SI) y segmento externo (SE), epitelio pigmentario (EP).



RESULTADOS

En un principio, el ojo está constituido por dos zonas claramente diferenciadas, la **lente (L)** y la **retina (R)** (Fig. 2).

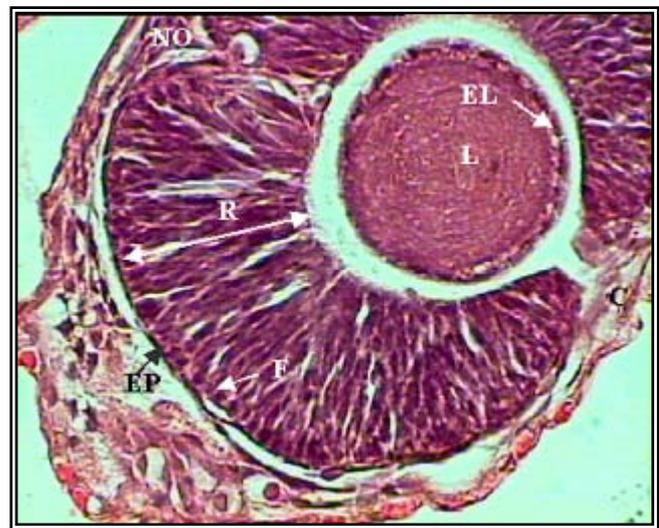


Figura 2. Ojo de una larva recién eclosionada. Retina (R), lente (L), córnea (C), nervio óptico (NO), núcleos de los fotorreceptores (F) y precusores del epitelio pigmentario (EP). Tinción H&E (X 40).

La lente presenta una disposición con dos estructuras: una zona más externa formada por una capa unicelular de células cúbicas, que evolucionan transformándose en un epitelio plano más definido que determina los límites de la lente, y formará el conjunto denominado **cápsula y epitelio de la lente (EL)**. Esta capa adquiere un carácter más basófilo respecto al tejido que encierra en su interior, el cual, presenta una textura más homogénea, constituida por las **fibras de la lente**, células epiteliales altamente modificadas. La diferencia de afinidad por la tinción puede ser una consecuencia de la pérdida de núcleo en las fibras de la lente, lo que disminuye su basofilia.

Los primeros días de vida lecitotrófica, se puede observar la **córnea (C)** que aún no está bien diferenciada.

La retina, al eclosionar la larva está formada por una densa masa de células alargadas dispuesta radialmente. Desde este momento, en la zona más externa de la retina, a medida que nos separamos de la hendidura del nervio óptico (NO), se pueden observar unas células con forma cónica, que son, los núcleos de los fotorreceptores (F), conos. Esta primera capa presenta una mayor afinidad por la tinción eosinófila. Exteriormente a estos, aparecen pequeños núcleos de pigmentos dispersos, que son precusores de la capa del epitelio pigmentario (EP), este es el responsable de la absorción del exceso de radiación, así como de fagocitar a través de los lisosomas los sacos que contienen a los pigmentos y retornar las opsinas.

La retina no es una capa uniforme, siendo discontinua en dos de sus puntos. En una primera zona es el nervio óptico presente desde la eclosión, el responsable de esta división, por otro

lado, los extremos de la retina estarán definidos por la zona de generación (ZG), y los músculos de la lente (ML) e iris (I), que se desarrollan posteriormente.

Veinticuatro horas tras la eclosión, se hace más evidente la diferenciación de las capas de la retina. Se pueden distinguir las dos capas plexiformes, externa (CPE) e interna (CPI). La capa plexiforme externa separa la capa nuclear externa (CNE), de la capa nuclear interna (CNI), y la plexiforme interna, separa a su vez, la capa nuclear interna de la capa de células ganglionares (CCG) (Fig.3).

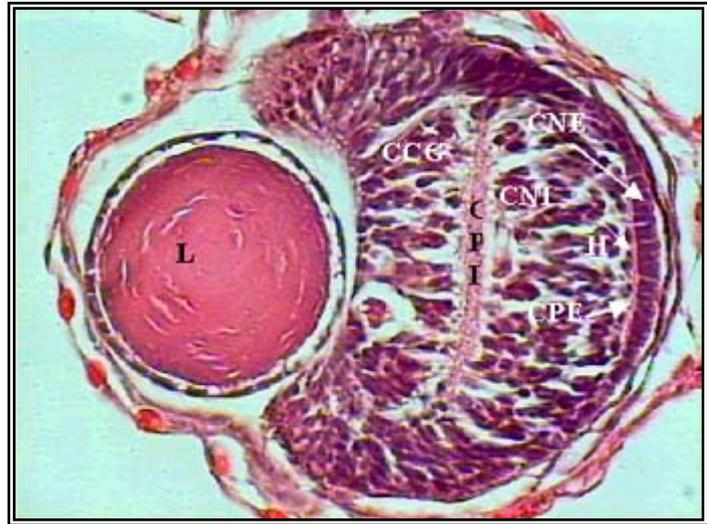


Figura 3. Diferenciación de capas de la retina en una larva de 24 tras la eclosión. Capa plexiforme externa (CPE), capa plexiforme interna (CPI), células horizontales (H), capa nuclear interna (CNI), capa nuclear externa (CNE) y capa de células ganglionares (CCG). Tinción H&E (X 100).

Bajo la plexiforme externa, además, se puede diferenciar una subcapa perfectamente definida que está constituida por las células horizontales (H). Estas neuronas con forma ovalada conectan conos a través de sus dendritas, que extienden a lo largo de la plexiforme.

Los núcleos de los fotorreceptores que forman la CNE aumentan en número, y en tamaño dando una mayor definición a su forma. Se pueden dividir en tres partes: el núcleo del fotorreceptor (F) situado en la zona basal: con forma rectangular que se estrecha hacia su extremo, el segmento interno (SI) con forma circular, y un tercer segmento, que todavía no está bien definido, casi transparente ya que no presenta todavía pigmentos visuales en su interior y que será el segmento externo del fotorreceptor (SE) (Fig4).

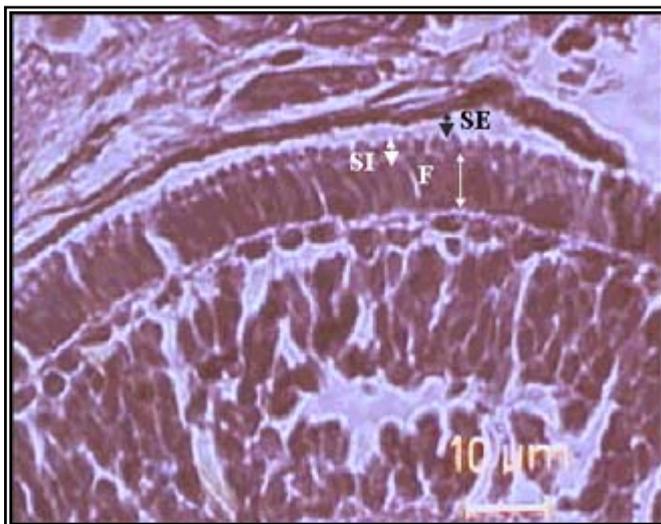


Figura 4. Fotorreceptores de una larva de 24 h. Tinción H&E (X 100).

La zona cercana a la hendidura del nervio óptico no presenta núcleos, que aparecen a medida que nos alejamos de él, aumentando el tamaño del fotorreceptor.

En cuanto al epitelio pigmentario, se ve un aumento ligero de la cantidad de pigmentos, siendo más significativo en los extremos de la retina, los cuales se desarrollarán posteriormente, como iris.

Por lo que respecta a la intensidad de la tinción es uniforme mostrando una mayor intensidad en la zona de la CNE y una baja afinidad en las zonas de conexiones, como son las capas plexiformes.

El día dos de vida lecitotrófica, destaca la aparición de la capa de epitelio pigmentario, se establece un iris primario en el extremo de la retina, así como el primitivo músculo de la lente (Fig. 5). Los fotorreceptores toman un tamaño mayor que el día anterior, manteniendo su forma, pero en su segmento externo comienza a aparecer gradualmente la pigmentación, que se continúa con el epitelio pigmentario siendo difícil establecer el límite con este.

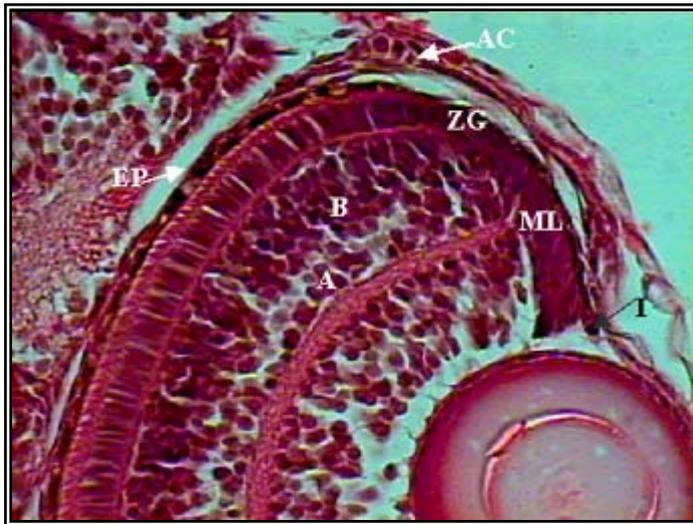


Figura 5. Definición de la zona de generación (ZG) y músculos de la lente (ML), aumento de la pigmentación en el epitelio pigmentario (EP), células amacrinas (A), células bipolares (B) y anillo cartilaginoso, de una larva de dos días tras la eclosión, (AC). Tinción H&E (X 40).

En la capa ganglionar las células presentan una forma ovalada característica, apreciándose, una mayor densidad celular subdividida en tres franjas celulares con diferente grosor y número de células en la zona subyacente a la plexiforme interna.

Por otra parte, en la CNI se pueden diferenciar tres zonas, con distinta densidad celular, donde en la parte media podemos observar la mayor concentración de células (células bipolares (B)), mientras que en la región apical de la capa, son más visibles las células horizontales que yacen en toda la superficie de la capa plexiforme externa. En la zona inferior de la CNI se puede diferenciar una capa unicelular formada por células amacrinas (A), que tienen otra simétrica en el extremo superior de la capa ganglionar, separadas ambas por la capa plexiforme interna, que actúa a modo de conexión.

La córnea presenta una estructura más definida y aparece un indicio de músculo de la lente e iris. También esta visible el anillo cartilaginoso (AC).

El tercer día de vida de la larva, el ojo está totalmente pigmentado, tomando el epitelio pigmentario una tonalidad negra o marrón muy oscura y brillante. A medida que nos desplazamos hacia el interior de la retina se observa una gradación de pigmentación que avanza sobre el fotorreceptor con menor intensidad, en la CNE se puede ver que está más desarrollado que el día anterior, pudiéndose distinguir claramente los segmentos del cono. El núcleo del fotorreceptor con forma rectangular, ha cedido su protagonismo en tamaño a otra parte más externa donde se distinguen ambos segmentos del fotorreceptor, interno y externo, (Fig. 6).

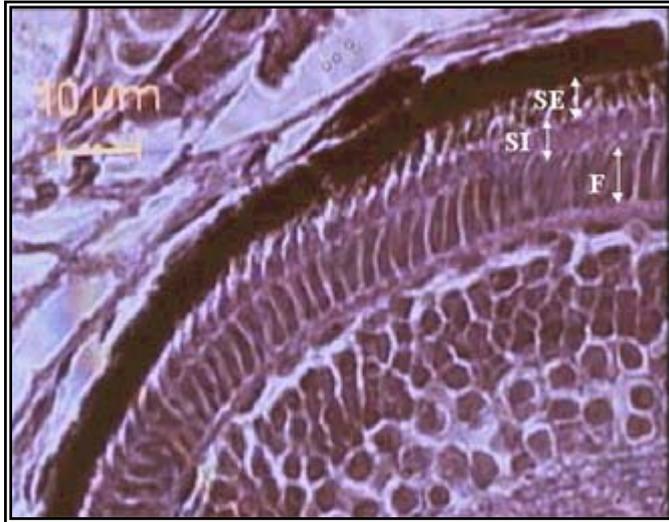


Figura.6. Fotorreceptores de una larva de 72 h. Se observa la presencia de pigmentos visuales en el segmento externo del fotorreceptor (SE), mientras que están ausentes en el segmento interno (SI) y núcleo (F). Tinción H&E (X 100).

El epitelio pigmentario se continúa, rodeando toda la superficie del ojo hasta los extremos de la retina donde toma una forma más angular, adquiriendo la apariencia de un iris formado (Fig.7). Así mismo, desde el músculo de la lente, se pueden ver unos ligamentos que lo unen a la misma. Se pueden observar pequeños filamentos que parecen sujetar a la lente, y provienen de todas las partes de la retina.



Figura 7. Iris de una larva al tercer día de vida. Tinción H&E (X 40).

En este tercer día la córnea adquiere una estructura formada por tres zonas, una externa con mayor afinidad por la tinción denominado epitelio corneal, otra intermedia mas difusa, el estroma y una interior, el endotelio. Son visibles los canales detrás del iris y el músculo de la lente, el canal posterior y otro en la zona externa entre el iris y la córnea, el canal anterior.

Histológicamente las estructuras presentes en el ojo de las larvas de 10 y 15 días de vida son, un iris perfectamente definido, posiblemente igual de funcional que el del día tres pero, que ahora por una cuestión de tamaño se observa mejor (Fig 8). Es de destacar el aumento de tamaño del segmento externo del fotorreceptor, que ahora supera al resto del mismo.



Figura 8. Ojo de una larva de 10d de vida. Tinción H&E (X 20).

El día 15 se puede observar una estructura que si bien estaba presente de forma difusa , ahora ha adquirido una forma definida, se trata de la capa esclerótica, tejido cartilaginoso que rodea interiormente el ojo y le ayuda a mantener la forma característica de globo (Fig.9).

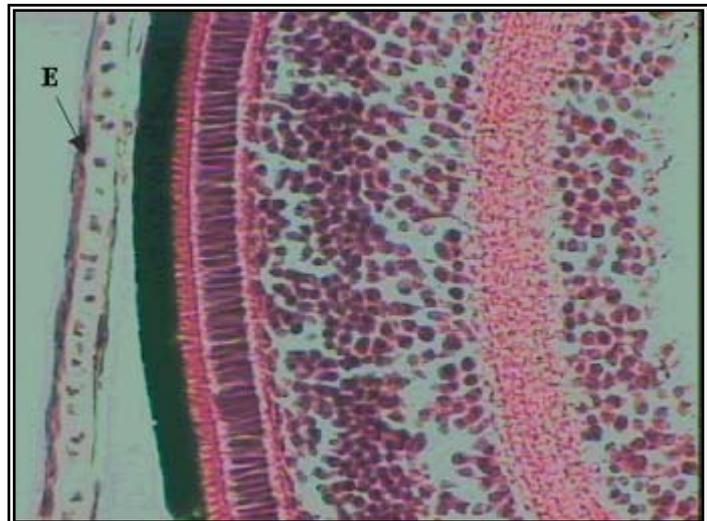


Figura. 9. Aparición de la esclera (E) en larvas de 15 días. Tinción H&E (X 100).

En cuanto al número de fotorreceptores se puede observar, que parece haber una primera disminución, aunque realmente no es tal, sino que el aumento del tamaño del ojo es mayor que el crecimiento en número de los fotorreceptores, estando de acuerdo con la idea de que hasta el tercer día de vida, la larva no completa las estructuras necesarias para poder ver, una vez que ya lo ha hecho el crecimiento del número de fotorreceptores va aumentando junto con el propio crecimiento en tamaño de la larva. Hay evidencias de que el número de fotorreceptores puede verse afectado por las condiciones de luz aportadas en el cultivo (Fig 10).

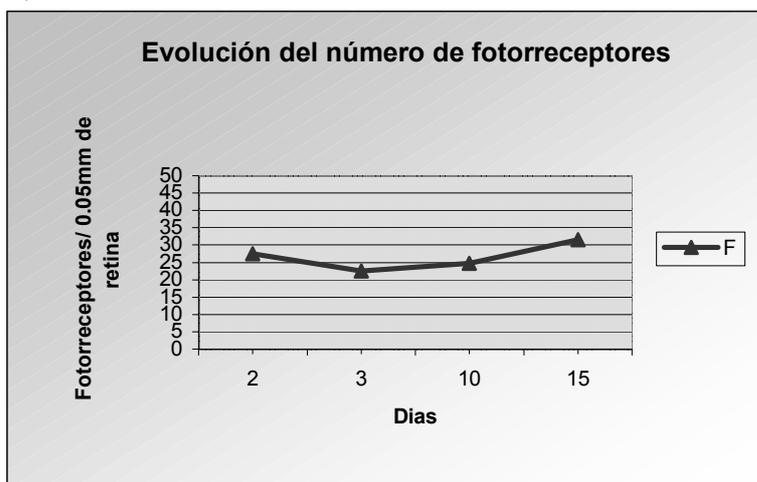


Figura. 10 :Evolución del número de fotorreceptores/0.005mm de retina.

DISCUSION

La estructura ocular de dorada al eclosionar se presenta histológicamente, en un estadio de desarrollo algo más avanzado al observado por otros autores para especies similares. Así, mientras que KAWAMURA, (1984) y ROO *et al.*, (1999) muestran para *Pagrus major* y *Pagrus pagrus* respectivamente, una lente indiferenciada dispuesta de forma radial, la dorada por su parte al eclosionar muestra una lente claramente definida en dos capas. En la retina el desarrollo es el mismo para las especies citadas anteriormente: células en disposición radial, donde se observan los núcleos de los fotorreceptores y el nervio óptico en el momento de la eclosión

Las larvas de un día de vida presentan todos los elementos necesarios para la función visual, pero no completamente desarrollados. Esto es una indicación de que el ojo está próximo a ser funcional. KAWAMURA, (1984), observó que el sistema visual de *Pagrus major* es funcional 36h después de la eclosión cuando las células visuales y los pigmentos están presentes y el nervio óptico conecta con el tectum óptico. En dorada, se presenta un sistema visual en este estadio posiblemente no funcional, como ocurre con el pargo ROO *et al.*, (1999), principalmente por la falta de un patrón de pigmentación capaz de absorber la luz.

El tercer día de vida de la larva es uno de los más importantes, ya que necesita estar preparada para el comienzo de la actividad trófica. Histológicamente la larva muestra todas las estructuras necesarias para la función visual. El epitelio pigmentario está bien definido. El músculo de la lente está presente y en contacto con ésta, y el iris está completamente formado. La larva de dorada, presenta una retina con un único tipo de fotorreceptores al inicio de la actividad trófica, estando únicamente equipada con conos simples, como ocurre con *Pagrus major* (KAWAMURA, 1984), *Pagrus auratus* (PANKHURST, 1996) y *Pagrus pagrus* (ROO *et al.*, 1999).

Otras especies como el salmón pacífico *Oncorhynchus mykiss* eclosionan en un estadio de desarrollo más avanzado, presentando algunos bastones desde este momento de la eclosión (O'CONNELL, 1981). La anchoveta nórdica *Engraulis mordax* tiene una retina formada únicamente por bastones al eclosionar (O'CONNELL, 1981). Los bastones permiten una mejora de la visión en condiciones de baja intensidad de luz (O'CONNELL, 1981, KAWAMURA 1984, PANKHURST., 1996).

A pesar de que la mayoría de las larvas comienzan su actividad depredadora al cuarto día de vida. El tercer día de vida hay larvas que comienzan a alimentarse, presentando una buena capacidad para la depredación que aumentará con el crecimiento del cuerpo que le permitirá un desarrollo de movimientos más rápidos y una mayor efectividad en sus capturas.

El hecho de que el sistema visual de la larva aún esté en desarrollo hasta varias semanas tras la eclosión, lo hace más vulnerable de sufrir alteraciones en estos primeros días de vida. Las condiciones de cultivo larvario intensivo, en las cuales la cantidad de luz utilizada difiere enormemente de los regímenes naturales, puede tener implicaciones directas en el desarrollo del sistema visual lo cual puede conllevar alteraciones en el mismo que se verían reflejadas como una menor capacidad visual, lo cual repercutiría en todas las funciones fisiológicas de la larva y consecuentemente en su crecimiento y supervivencia.

BIBLIOGRAFÍA

- Blaxter, J.H.S. 1986. *Trans. Am. Fish.Soc.*115:98-114.
- García del Moral, R. 1993. *Laboratorio de anatomía patológica*.Ed. Interamericana McGraw-Hill. Madrid, España. 651p.
- Hernández Cruz, C.M., Fernández-Palacios, H. y Fernández-Palacios, J. E., 1990.. *Vieraea* 19:215-224.
- Kawamura, G. 1984.*Bull.Jpn. Soc.Sci. Fish.* 50:1975-1980.
- Martoja ,R. y Martoja-Pierson, M., 1970. *Técnicas de histología animal. Editorial Toray-Mason S.A.*, Barcelona, España,350 p.
- O'Connell,C.P.1981.*Amer.Zool.* 21:429-446.
- Pankhurst. P.M.1996.*New. Zel.J.Mar.Freshwater. Res.*30:79-90.
- Roo, F J., Socorro, J., Izquierdo, M.S., Caballero, M. J., Hdez. Cruz, C.M., Fernández, A. and Fernández-Palacios, H. 1999. *Aquaculture*.179:499-512.
- Sarasquete, M.C., Polo, A., Yúfera, M. 1995. *Aquaculture* 130:79-92.