



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
E BIOLOGIA CELULAR – PPGNBC

BERTHA RUTH ZELADA MARILUZ

**A BASE MOLECULAR DAS ADAPTAÇÕES VISUAIS NOS GENES DAS OPSINAS
DE ANABLEPS ANABLEPS E PHREATOBIUS CISTERNARUM ATRAVÉS DA
ANÁLISE DE TRANSCRIPTOMA**

**BELÉM / PARÁ
2019**

BERTHA RUTH ZELADA MARILUZ

**A BASE MOLECULAR DAS ADAPTAÇÕES VISUAIS NOS GENES DAS OPSINAS
DE ANABLEPS ANABLEPS E PHREATOBIUS CISTERNARUM ATRAVÉS DA
ANÁLISE DE TRANSCRIPTOMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Schneider

**BELÉM
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M336b Mariluz, Bertha Ruth Zelada
A base molecular das adaptações visuais nos genes das opsinas de *Anableps anableps* e *Phreatobius cisternarum* através da análise de transcriptoma / Bertha Ruth Zelada Mariluz. — 2019.
123 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^ª. Dra. Patrícia Neiva Coelho Schneider
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. Opsinas. 2. Substituições de aminoácidos. 3. Padrão de expressão. 4. Sensibilidade espectral. 5. Transcriptoma. I.
Título.

CDD 571.45

BERTHA RUTH ZELADA MARILUZ

**A BASE MOLECULAR DAS ADAPTAÇÕES VISUAIS NOS GENES DAS OPSINAS
DE ANABLEPS ANABLEPS E PHREATOBIUS CISTERNARUM ATRAVÉS DA
ANÁLISE DE TRANSCRIPTOMA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, como um requisito para obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Schneider

Data de avaliação: Belém, _____ de 2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Patrícia Neiva Coelho Schneider
(PPGNBC/ICB/UFPA – Orientadora)

Profa. Dra. Karen Renata Matos Oliveira
(PPGNBC/ICB/UFPA – Membro)

Prof. Dr. Sylvain Henri Darnet
(PPGBIOTEC/ICB/UFPA – Membro)

Prof. Dr. Júlio Cesar Pieczarka
(PPGBM/ICB/UFPA – Membro)

Prof. Dr. Fernando Allan de Farias Rocha
(PPGNC/ICB/UFPA – Membro)

Prof. Dr. Igor Schneider
(PPGBM/ICB/UFPA – Membro suplente)

À Deus,
Por sempre mostrar o caminho correto para a
felicidade eterna;

Aos meus pais, *Bertha e Remígio*,
Por sua dedicação e por me encorajar
à seguir meus sonhos;

Aos meus irmãos e minhas irmãs,
Pela companhia e amizade de sempre;

Aos meus sobrinhos, *Gino, Giorgio, Alonso,*
Micaela, Sebastian, Joaquim, Bráulio, Illari,
Nayaraq e Francisco.
Obrigada pelo amor e alegria.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pará pela oportunidade, onde fui formada em meu doutorado, muito obrigada.

À Pró-reitora de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPEP) da UFPA e aos órgãos de fomento PAEC/CAPES pela bolsa outorgada para este estudo doutoral. Agradeço ao Programa Capes PVE do qual minha orientadora, Profa. Dra. Patrícia Schneider foi ganhadora de uma bolsa para a minha estadia no Canadá.

À Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular pelo apoio, ao diretor Dr. Carlomagno Pacheco Bahia, ao ex-Diretores Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano, Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva pelo constante apoio; e à secretária do Programa de Pós-graduação, Socorro Sales de Andrade pela ajuda e auxílio constante.

À Profa. Dra. Patrícia Schneider, minha orientadora, obrigada pelos momentos de discussão e boas ideias. Assim mesmo, ao Prof. Dr. Igor Schneider pelas boas discussões para o aprimoramento de meu trabalho.

À minha banca examinadora da defesa, a Profa. Dra. Karen Renata Matos Oliveira, Prof. Dr. Sylvain Darnet, Prof. Dr. Julio Cesar Pieczarka, e Prof. Dr. Fernando Allan de Farias Rocha, pelas orientações e contribuições para o melhoramento do meu trabalho.

À minha banca examinadora da qualificação, o Prof. Dr. Givago da Silva Souza e Prof. Dr. Sylvain Darnet, pelas orientações e contribuições para o melhoramento do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Sylvain Darnet pela montagem do transcriptoma de *Anableps anableps*, e ao Prof. Dr. Marcos Souza, do Museu Paraense Emilio Goeldi - UFPA, pela montagem do transcriptoma de *Phreatobius cisternarum*.

À equipe do Laboratório de Evolução e Desenvolvimento, que contribuíram para minha formação de maneira direta ou indireta através de discussões, aprimoramento didático e apoio técnico. Expresso minha gratidão ao Prof. Dr. Igor Schneider, MSc. Gabriela N. Frola-Lima, MSc. Louise N. Perez, Dr. Jeferson Carneiro, MSc. Jamilly De Lima e MSc. Maysa Araújo pela coleta e classificação realizada do material utilizado neste trabalho. Agradeço a Profa. Dra. Iracilda Sampaio pelo apoio logístico no local de coleta.

Às Mestres Jamilly De Lima e Maysa Araújo pela grande colaboração e ajuda nas técnicas do laboratório e pelos seus comentários para o aprimoramento desta tese, assim como às Dra. Flora Bittencourt e Dra. Aline Cutrim Dragalzew pelos seus comentários para o meu trabalho. Ao Dr. Jeferson Carneiro pelos comentários nas construções das árvores

filogenéticas. Aos Mestre Jamily De Lima e Biólogo Danielson Amaral pelos comentários e ajuda na minha apresentação de meu trabalho final.

À Bernadete Costa de Oliveira, bibliotecária da Biblioteca Central da UFPA, por seus conselhos e comentários na elaboração da ficha catalográfica para este documento de pesquisa.

Ao prof. Dr. John Taylor do Laboratório de Genômica Comparativa: duplicação de genoma e gene do Departamento de Biologia da Universidade de Victoria, Canadá, pelos ensinamentos e apoio durante o desenvolvimento do projeto de análise *in silico* do transcriptoma do peixe de quatro olhos *Anableps anableps* em seu laboratório.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

“Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve que renunciar para conseguir.”

(Dalai Lama)

RESUMO

Mariluz, B.R.Z. “**A base molecular das adaptações visuais nos genes das opsinas de *Anableps anableps* e *Phreatobius cisternarum* através da análise de transcriptoma**”. 2019. 123f. Tese de doutorado - Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

Embora os olhos de vertebrados compartilhem a mesma organização geral, muitas espécies desenvolveram especializações que melhoram sua percepção visual do ambiente. Essas especializações são frequentemente refletidas em uma variedade de adaptações visuais que envolvem mudanças na sensibilidade visual, que por sua vez podem ser moduladas pela variação no número de fotorreceptores, pela alteração dos pigmentos visuais ou pela combinação de ambos os mecanismos. No caso das mudanças adaptativas nos pigmentos, estes podem ocorrer devido a diferenças estruturais, no padrão de expressão e no tamanho do repertório dos genes da família das opsinas. No entanto, muito pouco se sabe sobre mudanças adaptativas em pigmentos para ambientes aquáticos com luminosidade diferente. Esta investigação tem por finalidade avaliar a base molecular das adaptações visuais nos genes das opsinas de *Anableps anableps* e *Phreatobius cisternarum*, espécies de ambientes de luminosidade diferentes, a primeira de um ambiente de superfície e a segunda de um habitat subterrâneo, através da análise de transcriptoma. Esta investigação compreende dois capítulos. **O primeiro capítulo** aborda o estudo da espécie *Anableps anableps*. Combinamos as análises de RNA-Seq e hibridização *in situ* do tecido do olho desta espécie para entender as adaptações visuais ao ambiente aéreo-aquático. O RNA-Seq do olho exibiu um repertório de 20 genes de opsinas não visuais, o que reflete a heterogeneidade ambiental na qual a espécie vive. Assim mesmo, as análises comparativas nas sequências codificantes da proteína das opsinas permitiram a identificação de seis opsinas apresentando os típicos motivos de aminoácidos do tipo C e nove do Grupo 4, conservadas entre si. Estudos por hibridização *in situ* na retina mostraram expressão assimétrica destas opsinas não visuais nos diferentes estágios, assim como durante o desenvolvimento ocular da espécie. **O segundo capítulo** apresenta o estudo da espécie *Phreatobius cisternarum*. Combinamos análises histológicas, moleculares e de RNA-Seq para entender as adaptações visuais e sensoriais ao ambiente de lençol freático de *P. cisternarum*. O RNA-Seq da cabeça de *P. cisternarum* revelou repertório de onze genes de opsinas, 3 opsinas visuais e 8 opsinas não visuais. Duas opsinas visuais, *rh1* e *lws*, apresentaram substituições de aminoácidos que potencialmente contribuíram para o

deslocamento vermelho e azul, respectivamente. Nossa análise histológica mostrou a presença de retina rudimentar e a análise de RNA-Seq identificou a expressão de 38 genes de cristalino e 51 genes relacionados ao epitélio pigmentado da retina (RPE), indicando que os olhos reduzidos de *P. cisternarum* retiveram algumas estruturas do cristalino. A expressão extra-retiniana de *opn4m3* está possivelmente associada à regulação do relógio periférico. Além disso, a presença de potenciais pseudogenes de opsinas seria regulada por uma pequena retina exposta a um ambiente de baixa luminosidade. Os capítulos introduzem e fornecem uma visão geral da investigação de substituições de aminoácidos de opsinas, alterações nos padrões de expressão e no tamanho do repertório de opsinas (duplicação e pseudogeneização), e como eles poderiam contribuir na mudança da sensibilidade espectral e finalmente na adaptação visual das espécies *A. anableps* e *P. cisternarum* a seu ambiente peculiar. O presente estudo fornece a primeira evidência para o entendimento da base molecular adaptativa nos genes das opsinas a ambientes subterrâneos e aéreo-aquático, nas espécies *P. cisternarum* e *A. anableps*.

Palavras-chave: Opsinas. Substituições de aminoácidos. Padrão de expressão. Sensibilidade espectral. Transcriptoma.

ABSTRACT

Mariluz, B.R.Z. “**The molecular basis of the visual adaptations in the opsin genes from *Anableps anableps* and *Phreatobius cisternarum* through transcriptome analysis**”. 2019. **123f**. Tese de doutorado - Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

Although vertebrate eyes share the same general organization, many species have developed specializations that improve their visual perception of the environment. These specializations are often reflected in a variety of visual adaptations that involve changes in visual sensitivity, which in turn can be modulated by the variation on the photoreceptors number, by altering the visual pigments or by combining both mechanisms. In the case of adaptive changes in the pigments, these may occur due to structural differences in the pattern of expression and the repertoire amount of the opsin genes family. However, there is no much information regarding adaptive changes on visual pigments over different luminosity on aquatic environments. This research aims to evaluate the molecular basis of the visual adaptations in the opsin genes from *Anableps anableps* and *Phreatobius cisternarum*, species present in environments with different light conditions, the first one from a surface environment and the second one from an underground habitat, through transcriptome analysis. This investigation comprises two chapters. The **first chapter** comprises the studies of the *Anableps anableps* specie. We combined the analysis of RNA-Seq and *in situ* hybridization of the eye tissue of this specie aiming to understand them visual adaptations to the aerial-aquatic environment. RNA-Seq data from the eye exhibited a repertoire of 20 non-visual opsin genes, which reflects the environmental heterogeneity these species lives. Likewise, comparative analyzes in protein coding sequences of the opsins allowed the identification of six opsins presenting the typical amino acid motifs of C-type and nine of Group 4, conserved among themselves. *In situ* hybridization studies on the retina showed asymmetric expression of these non-visual opsins at different stages, as well as during the ocular development. The **second chapter** presents the studies of the *Phreatobius cisternarum* specie. We combine histological, molecular and RNA-Seq analyzes to understand the visual and sensorial adaptations of *P. cisternarum* to the phreatic environment. RNA-Seq data from *P. cisternarum* head revealed a repertoire of eleven opsin genes, three visual opsins and eight non-visual opsins. Two visual opsins, *rh1* and *lws*, presented amino acid substitutions that potentially contributed to the red and blue shift, respectively. Our histological analysis showed the presence of a rudimentary

retina, while the RNA-Seq analysis identified the expression of 38 genes related to the lens fiber cells and 51 genes related to the retinal pigmented epithelium (RPE), indicating that the reduced eyes of *P. cisternarum* retained some lens structures. The extra-retinal expression of *opn4m3* is possibly associated with the peripheral clock regulation. Furthermore, the presence of potential opsin pseudogenes would be regulated by a small retina exposed to a low-light environment. The chapters introduce and provide an overview of the investigation on opsins amino acid substitutions, changes on expression patterns and opsin repertoire size (duplication and pseudogenization), and how these could contribute to the shift in spectral sensitivity and finally visual adaptation of *A. anableps* and *P. cisternarum* to their peculiar environment. The present study provides fundamental evidence for the understanding of the adaptive molecular basis in the opsin genes to subterranean and aerial-aquatic environments, in the species *P. cisternarum* and *A. anableps*.

Keywords: Opsins. Amino acid substitutions. Expression pattern. Spectral sensitivity. Transcriptome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Adaptações estruturais do olho dos vertebrados.....	22
Figura 2 - A organização da retina de um peixe.....	23
Figura 3 - Diagrama mostrando o mecanismo de fototransdução em fotorreceptores de vertebrados.....	25
Figura 4 - Estrutura das opsinas e do cromóforo retinal.....	27
Figura 5 - Classificação das opsinas	28
Figura 6 - Sítios fotoreceptivos em peixes.....	30
Figura 7 - Hibridização <i>in situ</i> da opsina <i>va</i> na retina de <i>Salmo salar</i>	32
Figura 8 - Hibridização <i>in situ</i> da opsina <i>va</i> na retina de <i>Rutilus rutilus</i>	32
Figura 9 - Distribuição da expressão da opsina <i>va</i> no olho de zebrafish.....	32
Figura 10 - Hibridização <i>in situ</i> dos cinco genes de melanopsina (<i>opn4m1</i> , <i>opn4m2</i> , <i>opn4m3</i> , <i>opn4x1</i> , <i>opn4x2</i>) na retina de zebrafish.....	34
Figura 11 - A expressão de melanopsina na retina de <i>Salmo salar</i>	34
Figura 12 - Hibridização <i>in situ</i> de <i>opn5m</i> e <i>opn5m2</i> na retina de medaka e zebrafish.....	35
Figura 13 - Localização dos genes das opsinas <i>opn6</i> , <i>opn7</i> , <i>opn8</i> e <i>opn9</i> na retina de zebrafish por hibridização <i>in situ</i>	35
Figura 14 - Estratégias de mecanismos moleculares no pigmento visual de vertebrados na adaptação a ambientes fóticos diversos.....	38
Figura 15 - Cones duplos na retina de <i>Metriaclima zebra</i> expressam constantemente <i>rh2b</i> e <i>rh2a</i> em diferentes regiões da retina.....	40
Figura 16 - Espécies de ambientes aéreo-aquático.....	46
Figura 17 - Morfologia do olho de <i>Anableps anableps</i>	47
Figura 18 - Distribuição de <i>Anableps anableps</i> em estados de Brasil.....	48
Figura 19 - Desenvolvimento dos olhos durante os estágios larvais de <i>Anableps anableps</i>	49
Figura 20 - Caracterização morfológica do olho de <i>Anableps anableps</i> , coloração por Hematoxilina e Eosina.....	51
Figura 21 - Expressão assimétrica dos genes das opsinas visuais na retina de indivíduos adultos de <i>Anableps anableps</i>	53
Figura 22 - Expressão assimétrica dos genes das opsinas visuais na retina de	53

indivíduos larvais (estágio 6) de <i>Anableps anableps</i>	
Figura 23 - Expressão assimétrica dos genes das melanopsinas na retina de <i>Anableps anableps</i>	54
Figura 24 - Coleta de <i>Anableps anableps</i> . (A) Mapa da região de coleta no município de Bragança, Pará, Brasil. (B) Coleta de <i>A. anableps</i> sendo realizada com rede de arrastro.....	56
Figura 25 - Desenho esquemático da coleta de olhos de indivíduos larvais de <i>Anableps anableps</i>	57
Figura 26 - A árvore filogenética das três classes de opsinas não visuais de <i>Anableps anableps</i>	63
Figura 27 - Caracterização das opsinas não visuais de <i>Anableps anableps</i>	64
Figura 28 - Distribuição da expressão dos genes das opsinas não visuais <i>tmt1b</i> , <i>tmt3b</i> e <i>rgr2</i> na retina da larva (estágio 5) de <i>Anableps anableps</i>	66
Figura 29 - Distribuição da expressão dos genes das opsinas não visuais <i>tmt1b</i> , <i>tmt3b</i> , <i>parapinopsina-2</i> , <i>opn5</i> e <i>rgr2</i> na retina de adultos de <i>Anableps anableps</i>	67
Figura 30 - Distribuição da expressão dos genes das opsinas não visuais <i>tmt1b</i> , <i>tmt3b</i> e <i>rgr2</i> ao longo da ontogenia ocular de <i>Anableps anableps</i>	68
Figura 31 - Distribuição da expressão dos genes das opsina <i>tmt3b</i> na córnea e pele de indivíduos larvais e adultos de <i>Anableps anableps</i>	69
Figura 32 - Espécies de ambientes subterrâneos.....	76
Figura 33 - Modelos propostos na degeneração ocular em espécies subterrâneas.....	78
Figura 34 - Espécies do gênero <i>Phreatobius</i>	79
Figura 35 - Distribuição geográfica das espécies de <i>Phreatobius</i> em estados brasileiros.....	81
Figura 36 - Mapa da região de coleta de <i>Phreatobius cisternarum</i> no município de Benevides, Pará, Brasil.....	83
Figura 37 - A árvore filogenética de opsinas visuais e não visuais de <i>Phreatobius cisternarum</i>	89
Figura 38 - Diagrama esquemático da relação filogenética da opsina <i>rh1.1</i> de <i>Phreatobius cisternarum</i> contra sequências publicadas.....	90
Figura 39 - Comparação de sequências de aminoácidos da opsina <i>lws</i> de <i>Phreatobius cisternarum</i> contra sequências publicadas.....	91
Figura 40 - Diagrama esquemático da relação filogenética da opsina <i>lws</i> de	92

<i>Phreatobius cisternarum</i> contra sequências publicadas.....	
Figura 41 - Histologia do olho de <i>Phreatobius cisternarum</i>	93
Figura 42 - Imagens fluorescentes de neuromastos com DASPEI.....	94
Figura 43 - Hibridização <i>in situ</i> do gene <i>opn4m3</i>	95
Figura 44 - Genes de opsinas não visuais comuns e únicos em <i>Anableps anableps</i> e <i>Phreatobius cisternarum</i>	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sensibilidade espectral de pigmentos visuais em vertebrados.....	29
Tabela 2 - Sensibilidade espectral de pigmentos não visuais em peixes.....	37
Tabela 3 - Repertório e medida de absorbância espectral para os genes das opsinas visuais de <i>Anableps anableps</i>	52
Tabela 4 - A análise estatística da montagem do transcriptoma.....	61
Tabela 5 - Repertório dos genes das opsinas não visuais no transcriptoma do olho de <i>Anableps anableps</i>	62
Tabela 6 - Características morfológicas principais das espécies do gênero <i>Phreatobius</i>	79
Tabela 7 - Repertório dos genes das opsinas visuais e não visuais no transcriptoma da cabeça de <i>Phreatobius cisternarum</i>	88

LISTA DE APÊNDICE

Apêndice A - Alinhamento da sequência de aminoácidos da opsina <i>rh1.1</i> de <i>Phreatobius cisternarum</i> contra sequências publicadas.....	119
Apêndice B - Alinhamento da sequência de aminoácidos da opsina <i>lws</i> de <i>Phreatobius cisternarum</i> contra sequências publicadas.....	120
Apêndice C - Genes relacionados às células das fibras do cristalino encontrados no transcriptoma de <i>Phreatobius cisternarum</i>	121
Apêndice D - Genes relacionados ao RPE encontrados no transcriptoma de <i>Phreatobius cisternarum</i>	122
Apêndice E - Órgão eletrosensorial ampular individual corado com Hematoxilina e Eosina em <i>Phreatobius cisternarum</i>	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1	<i>11-cis-retinal</i> ou retinal
A2	<i>3, 4-dehydroretinal</i>
CNE	Camada nuclear externa
CNI	Camada nuclear interna
CPE	Camada plexiforme externa
CPI	Camada plexiforme interna
CG	Camada de células ganglionares
CMZ	Zona marginal ciliar
DEPC	Dietilpirocarbonato
DAG	Diacilglicerol
Exo-rod	Exorodopsina
FP	Faixa pigmentada
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
GPCR	Proteína G heptahelicoidal
Gr4	Opsinas do Grupo 4
H&E	Hematoxilina e Eosina
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
Indels	Eventos de inserção / deleção
IP3	Inositol trifosfato
LWS/MWS	Sensíveis ao comprimento de onda longo ou vermelho/verde
Na ⁺	Íon de sódio
NGS	Sequenciamento de Nova Geração (NGS, <i>Next-Generation Sequencing</i>)
Opn1	Opsinas de cones
Opn2	Opsinas de bastonetes
Opn3	Encefalopsina/Panopsina
Opn4	Melanopsina
Opn5	Neuroopsina
ORFs	Quadro aberto de leitura (ORFs, <i>Open Reading Frames</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDE	Fosfodiesterase
PFA 4%	Paraformaldeído 4%

PLC	Fosfolipase
PIP2	fosfoinosítídeos
% CG	Porcentagem de pares de base C-G
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
R	Retina
Rrh	Peropsina / homólogo derivado de rodopsina-RPE
Rgr	Opsina receptor acoplado a proteína retiniana G
RPE	Epitélio pigmentado da retina
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA
RT-PCR	Reação da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase.
Rho	Rodopsina bovina
RH1	Opsinas bastonetes ativos em baixos níveis de luz
RH2	Sensíveis ao comprimento de onda média
SE	Segmento externo
SI	Segmento interno
SWS1	Opsinas de cone tipo 1 sensíveis a comprimentos de onda curtos
SWS2	Opsinas de cone tipo 2 sensíveis a comprimentos de onda curtos
Tipo C	Opsinas em fotorreceptores ciliares
Tipo R	Opsinas de fotorreceptores rabdoméricos
Tmt	Opsina de tecido múltiplo de teleósteos
T	Transducina
TRP	Canais iônicos
UV	Ultravioleta
VA	Opsina antiga de vertebrado

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	21
1.1.	ESTRUTURA BÁSICA EM PEIXES TELEÓSTEOS.....	21
1.2.	SINALIZAÇÃO FÓTICA: FOTOPIGMENTOS.....	23
1.2.1.	A fototransdução: sinalização mediada por opsina.....	24
1.2.2.	Cromóforo do fotopigmento: O <i>retinal</i>.....	26
1.2.3.	Opsinas é a porção proteica do fotopigmento.....	26
1.2.3.1.	Opsinas visuais são pigmentos fotossensíveis.....	29
1.2.3.2.	Opsinas não visuais um novo tipo de fotopigmentos.....	29
1.3.	FOTOPIGMENTOS E O AMBIENTE FÓTICO.....	37
2.	CAPÍTULO I. ADAPTAÇÕES VISUAIS A AMBIENTES	
	 AÉREO-AQUÁTICOS EM ANABLEPS ANABLEPS.....	43
2.1.	RESUMO.....	43
2.2.	ABSTRACT.....	44
2.3.	INTRODUÇÃO.....	45
2.3.1.	Adaptações oculares a um ambiente aéreo-aquático.....	45
2.3.2.	<i>Anableps anableps</i>: visão anfíbia.....	46
2.3.2.1.	<i>Anableps anableps</i> : ecologia e distribuição populacional da espécie.....	48
2.3.2.2.	<i>Anableps anableps</i> : caracterização morfológica e molecular dos olhos.....	50
2.3.2.3.	Repertório dos genes de opsinas em <i>Anableps anableps</i>	51
2.4.	OBJETIVOS.....	55
2.4.1.	Objetivo Geral.....	55
2.4.2.	Objetivos Específicos.....	55
2.5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
2.5.1.	Coleta de espécimes.....	56
2.5.2.	Preparo de biblioteca e sequenciamento no Illumina.....	56
2.5.3.	Montagem do transcriptoma.....	57
2.5.4.	Busca por genes e análise filogenética.....	57
2.5.5.	Identificação dos típicos motivos de aminoácidos nas sequencias codificantes das opsinas não visuais de tipo C e grupo Gr4.....	58
2.5.6.	Preparação de cortes histológicos para hibridização <i>in situ</i>.....	58
2.5.7.	Hibridização <i>in situ</i> (HIS)	59
2.6.	RESULTADOS.....	61

2.6.1.	A análise estatística da montagem do transcriptoma.....	61
2.6.2.	Um repertório diversificado dos genes das opsinas não visuais no transcriptoma do olho de <i>Anableps anableps</i>.....	61
2.6.3.	Típicos motivos de aminoácidos nas sequências codificantes da proteína das opsinas tipo C e Grupo 4	63
2.6.4.	Expressão assimétrica dos genes das opsinas não visuais na retina de <i>A. anableps</i>.....	65
2.7.	DISCUSSÃO.....	70
2.8.	CONCLUSÕES.....	73
3.	CAPÍTULO II. ADAPTAÇÕES VISUAIS A AMBIENTES AQUÁTICOS SUBTERRÂNEOS EM PHREATOBIUS CISTERNARUM.....	74
3.1.	RESUMO.....	74
3.2.	ABSTRACT.....	75
3.3.	INTRODUÇÃO.....	76
3.3.1.	Adaptações oculares a um ambiente subterrâneo.....	76
3.3.2.	<i>Phreatobius cisternarum</i>: adaptação visual em ambiente aquático subterrâneo.....	77
3.3.2.1.	<i>Phreatobius cisternarum</i> : ecologia e distribuição populacional da espécie.....	80
3.4.	OBJETIVOS.....	82
3.4.1.	Objetivo Geral.....	82
3.4.2.	Objetivos Específicos.....	82
3.5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	83
3.5.1.	Coleta de espécimes.....	83
3.5.2.	Preparo de biblioteca e sequenciamento no Illumina.....	84
3.5.3.	Montagem de <i>novo</i> do transcriptoma.....	84
3.5.4.	Busca por genes no transcriptoma.....	84
3.5.4.1.	Repertório de genes das opsinas e análise filogenética.....	84
3.5.4.2.	Genes envolvidos na estrutura ocular.....	85
3.5.5.	Identificação de substituições de aminoácidos nas opsinas <i>lws</i> e <i>rh1</i> com possíveis efeitos de ajuste espectral conhecidos.....	85
3.5.6.	Preparação de cortes histológicas para as análises histológicas e hibridização <i>in situ</i> (HIS).....	86
3.5.6.1.	Preparações histológicas com Hematoxilina e Eosina (H&E)	86
3.5.6.2.	Hibridização <i>in situ</i> (HIS)	86

3.5.7. Coloração de neuromastos com DASPEI.....	87
3.6. RESULTADOS.....	88
3.6.1. Um repertório pouco diversificado dos genes das opsinas no transcriptoma da cabeça de <i>Phreatobius cisternarum</i>	88
3.6.2. Genes do cristalino e RPE estão presentes no transcriptoma de <i>Phreatobius cisternarum</i>	90
3.6.3. Substituições de aminoácidos na proteína das opsinas <i>lws</i> e <i>rh1</i> mostram possíveis ajuste espectral dos pigmentos visuais.....	90
3.6.4. Na análise histológica por H&E estruturas oculares foram identificadas.....	92
3.6.5. Neuromastos foram identificados lateralmente na cabeça e corpo.....	94
3.6.6. O gene <i>opn4m3</i> é expresso na epiderme.....	95
3.7. DISCUSSÃO.....	96
3.8. CONCLUSÕES.....	99
4. DISCUSSÕES GERAIS.....	100
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	103
PUBLICAÇÕES.....	104
REFERÊNCIAS.....	105
APÊNDICE.....	119

INTRODUÇÃO GERAL

As variações significantes nos olhos de animais aquáticos são um reflexo de variações na incidência de luz em ambientes aquáticos em diferentes profundidades (WARRANT; JOHNSEN, 2013). A medida que a profundidade aumenta, a luz torna-se mais fraca devido à absorção, e a cor da luz muda porque a absorção não é igual para todos os comprimentos de onda (HELFMAN et al., 2009). Neste ambiente, os efeitos combinados da refração, da absorção seletiva do comprimento de onda e da dispersão provocam uma redução significativa da distância que os objetos podem ser vistos através da água (LYTHGOE, 1988). Não é surpreendente, portanto, que mais de 500 milhões de anos de seleção natural tenham produzido numerosas adaptações morfológicas e fisiológicas adequadas para captar e detectar a luz que é característica do habitat em que uma espécie vive (HELFMAN et al., 2009).

A estrutura dos olhos de peixes mostra adaptações à natureza direcional da luz subaquática (LYTHGOE, 1988). A classe Actinopterygii (peixes com nadadeiras raiadas) constituem a radiação dominante de vertebrados com mais de 32.000 espécies (FAIRCLOTH et al., 2013), sendo os teleósteos o grupo mais rico e diversificado, com cerca de 29.585 espécies existentes, agrupados em 63 ordens; presentes em diversos ambientes aquáticos, de habitats superficiais à zonas afóticas, como as profundezas oceânicas e os habitats subterrâneos continentais (NELSON; GRANDE; WILSON, 2016).

Esses ambientes contribuíram no desenvolvimento de modificação a nível ocular. Espécies de ambientes superficiais, especialmente aquelas que vivem no limite aéreo-aquático, exibem duplicação de estruturas oculares (NIEDER, 1999, 2001; SCHWAB et al., 2001). Enquanto, os peixes que habitam ambientes subterrâneos, sejam de habitats freáticos ou de cavernas, apresentam uma redução e perda de olhos (JEFFERY, 2009; PROTAS; JEFFERY, 2013; MURIEL-CUNHA; DE PINNA, 2005).

1.1. ESTRUTURA BÁSICA EM PEIXES TELEÓSTEOS

Os olhos de peixes são semelhantes das outras classes dos vertebrados (HELFMAN et al., 2009), uma estrutura quase esférica, limitada pela camada esclerótica e pela córnea (AYOUB, 2008; HELFMAN et al., 2009). A córnea é a parte anterior transparente do olho, é o elemento de focagem para o caminho visual no olho de vertebrados mamíferos. A focagem da luz pela córnea é necessária para criar uma imagem na retina, que é a porção sensível à luz

do olho (AYOUB, 2008). No olho do peixe, o cristalino é o principal elemento de focagem com alto índice de refração. Além disso, apresenta movimento ântero-posterior (BEJARANO-ESCOBAR et al., 2014) (Figura 1).

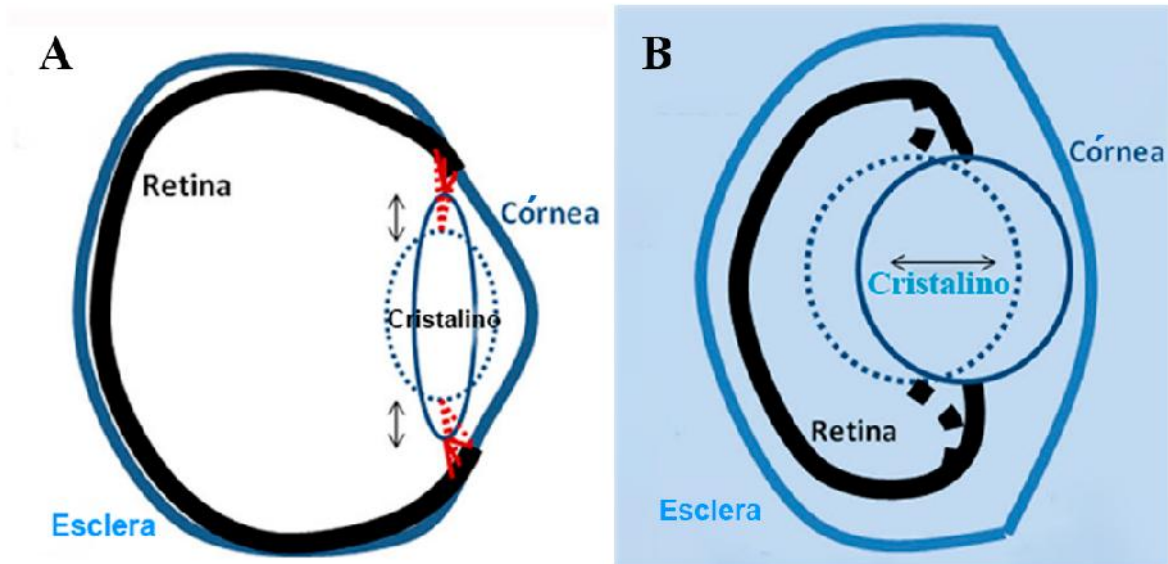


Figura 1 - Adaptações estruturais do olho dos vertebrados. (A) Esquema do olho de um vertebrado mamífero. (B) Esquema do olho de um peixe. No olho de vertebrados mamíferos, a córnea é o elemento de focagem para o caminho visual. No olho do peixe, o cristalino é o principal elemento de focagem, além disso, apresenta movimento ântero-posterior (Adaptado de BEJARANO-ESCOBAR et al., 2014).

A retina de um peixe tem uma estrutura muito semelhante das outras classes dos vertebrados (Figura 2) (BEJARANO-ESCOBAR et al., 2014). Assim, esta apresenta o segmento externo (SE) das células fotorreceptoras (contém uma pilha de discos membranosos impregnada com pigmentos fotorreceptores), a camada nuclear externa (CNE) que contém principalmente os núcleos celulares dos fotorreceptores (bastonetes e cones) (BELLINGHAM; FOSTER, 2002; AYOUB, 2008). Além disso, a retina contém outras estruturas laminares, como a camada plexiforme externa (CPE). Esta contém os processos e terminais sinápticos dos bastonetes, cones, células horizontais e células bipolares. A camada plexiforme interna (CPI) consiste nas conexões entre células bipolares, amácrinas e ganglionares (BEJARANO-ESCOBAR et al., 2014), enquanto na camada nuclear interna (CNI) encontramos núcleos das células bipolares, células amácrinas, células horizontais e células gliais de Müller. Os núcleos de células ganglionares formam a camada celular ganglionar (CG) (BEJARANO-ESCOBAR et al., 2014). As células ganglionares projetam seus axônios, e estes se unem no disco óptico e deixam o olho passando através da retina e da esclera, criando o nervo óptico. Este nervo estende para o núcleo geniculado lateral do tálamo,

localizado no centro da cabeça (AYOUB, 2008). Esses tipos de células formam microcircuitos paralelos que integram e processam sinais visuais (MENG et al., 2013a).

Finalmente, nos vertebrados, a visão é mediada por cones e bastonetes. Juntos, esse sistema visual duplo processa a informação visual, que é enviada ao cérebro através do nervo óptico, mas os principais detectores de luz são os **pigmentos visuais** que residem nos fotorreceptores da retina (DAVIES; COLLIN; HUNT, 2012).

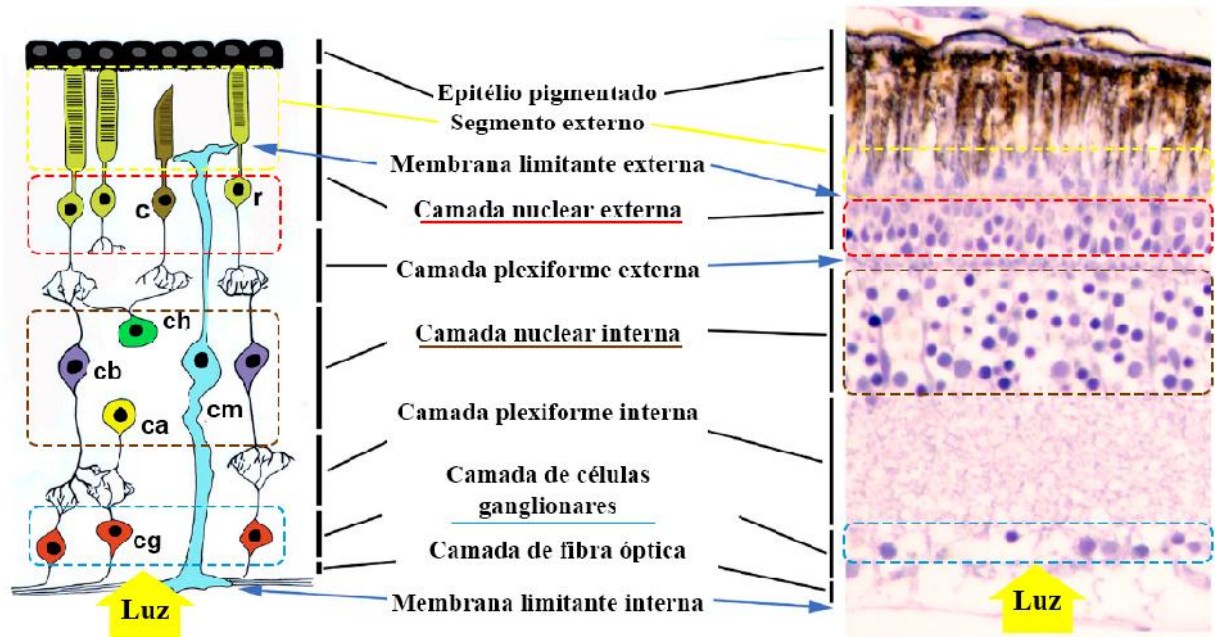


Figura 2 - A organização da retina de um peixe. Na esquerda, uma ilustração das diferentes camadas presentes na retina: fotorreceptores cones (c) e bastonetes (r) perto ao epitélio pigmentado, os corpos das células glia de Muller (cm), horizontal (ch), amácrinas (ca), bipolar (cb) compreendem a camada nuclear interna (CNI); células ganglionares (cg); camada plexiforme interna (CPI), camada nuclear externa (CNE); camada plexiforme externa (CPE), segmento externo das células fotorreceptoras (SE), epitélio pigmentado da retina (RPE). Escala: 50 μ m (Adaptado de BEJARANO-ESCOBAR et al., 2014).

1.2. SINALIZAÇÃO FÓTICA: FOTOPIGMENTOS

Os **pigmentos** ou fotopigmentos são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR) e consistem de uma porção de proteína a “opsina” ligada através de uma base de Schiff a um cromóforo (DAVIES; COLLIN; HUNT, 2012), o qual tem a forma de *11-cis-retinal* ou *3, 4-dehydroretinal* (YOKOYAMA, 2000).

1.2.1. A fototransdução: sinalização mediada por opsinas

A fototransdução é o processo pelo qual um fóton é capturado por uma molécula do pigmento visual e gera uma resposta elétrica no fotorreceptor (ARSHAVSKY; LAMB; PUGH, 2002). O mecanismo da fototransdução é baseada em uma cascata de sinalização da proteína G heterotrimérica e ocorre no segmento externo dos fotorreceptores (Figura 3) (ARSHAVSKY; LAMB; PUGH, 2002).

Nos vertebrados, existem duas vias de fototransdução conhecidas nos fotorreceptores ciliares e nos fotorreceptores rabdoméricos (DÍAZ; MORERA; GUIDO, 2016). No caso do mecanismo de fototransdução em fotorreceptores ciliares de vertebrados (KLAPPER et al., 2016) (Figura 3). No escuro (Figura 3A), o *11-cis-retinal* está ligado à rodopsina, que é encontrada dentro da membrana dos discos do segmento externo (SE). A transducina (T) (proteína Gt) e a fosfodiesterase (PDE) são inativas (Figura 3A, painel superior). O monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) desencadeia a abertura de canais catiônicos na membrana fotorreceptora, que medeia o influxo de Na⁺ (Figura 3A, painel do meio). Isso, por sua vez, despolariza o potencial de membrana do segmento interno (SI) e desencadeia a liberação de glutamato das sinapses neurais (Figura 3A, painel inferior) (KLAPPER et al., 2016). Na Luz (Figura 3B), a absorção de luz induz alterações na estrutura molecular da rodopsina que permitem ativar a transducina (T). Da mesma forma, a *11-cis-retinal* torna-se *all-trans-retinal* e dissocia-se da rodopsina. O sinal de rodopsina recebido é amplificado nesta fase, uma vez que uma molécula de rodopsina pode ativar muitas moléculas de transducina (T), que por sua vez ativa fosfodiesterase (PDE), cuja atividade catalítica degrada o GMPc (Figura 3B, painel superior). Isso efetivamente reduz a concentração de GMPc, o que leva ao fechamento dos canais de cátions (Figura 3B, painel do meio). Portanto, o segmento interno (SI) é hiperpolarizado e a exocitose de glutamato é interrompida (Figura 3B, painel inferior) (KLAPPER et al., 2016; SHICHIDA; MATSUYAMA, 2009). Em seguida, o isômero *all-trans* é transportado ativamente para o epitélio pigmentado da retina (RPE), é reisomerizado em *11-cis retinal* e transportado de volta para os fotorreceptores para regenerar o pigmento visual (Figura 3A, painel superior). A conversão de luz em sinais neurais dentro das células fotorreceptoras da retina é o melhor exemplo de estudo de sinalização mediada por opsinas (PROVENCIO et al., 1998).

Finalmente, podemos dizer que a atividade neuronal, em geral, é mediada pela despolarização e hiperpolarização da membrana (KLAPPER et al., 2016).

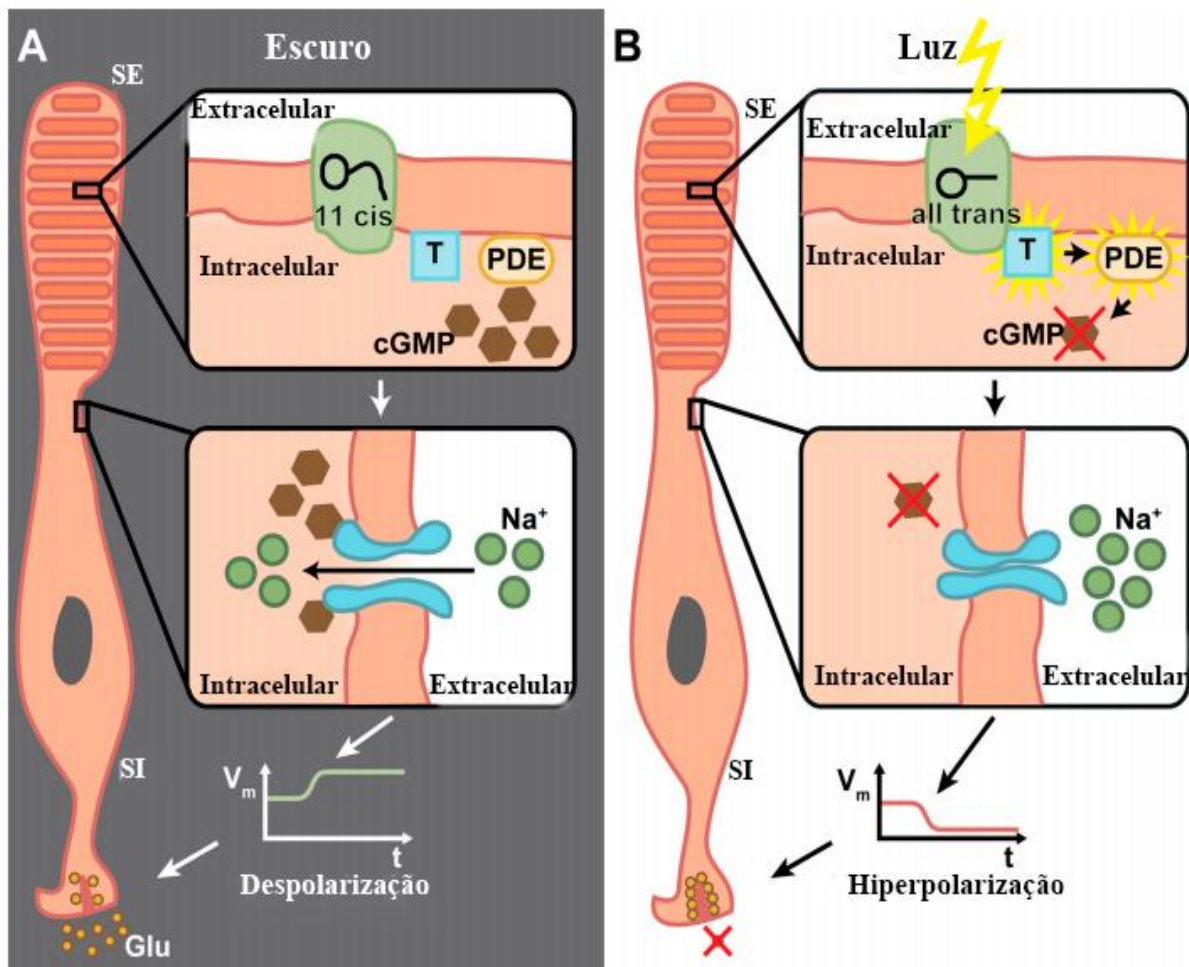


Figura 3 - Diagrama mostrando o mecanismo de fototransdução em fotorreceptores de vertebrados. A. No escuro. O *11-cis-retinal* está ligado à rodopsina, a transducina (T), e PDE são inativas (painel superior). O monofosfato de guanosina cíclica (GMPc) medeia o influxo de Na⁺ (painel do meio). Isto despolariza o potencial de membrana do segmento interno (SI) e desencadeia a liberação de glutamato (Glu) das sinapses neurais (painel inferior). B. Na luz. O cromóforo *11-cis-retinal* é fotoisomerizado à *all-trans*, seguido por uma alteração conformacional da opsina, ativação da transducina (T) e subsequentemente do PDE (painel superior). Fechamento dos canais de cátions pela redução de GMPc (painel do meio). Assim, o SI é hiperpolarizado e a exocitose de glutamato é interrompida (painel inferior) (Adaptado de KLAPPER et al., 2016).

No caso do mecanismo de fototransdução nos fotorreceptores rabinômicos de vertebrados. A via envolve uma proteína Gq/11, essa proteína G ativa uma fosfolipase C (PLC), que hidrolisa os fosfoinosítídeos (PIP₂) produzindo dois segundos mensageiros principais, diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃). Esses mensageiros ativam os canais TRP (canais iônicos) e aumentam a corrente iônica através da membrana, produzindo uma despolarização celular (DÍAZ; MORERA; GUIDO, 2016). Isto pode ser observado em pigmentos não-visuais, como a melanopsina, presente nas células ganglionares da retina fotossensível (CG) de vertebrados (HANKINS; PEIRSON; FOSTER, 2008).

De acordo com os mecanismos de fototransdução discutidos acima, os fotopigmentos podem ser monoestáveis (fotorreceptores ciliares) ou biestáveis (fotorreceptores rabdoméricos). O fotopigmento monoestável, como os pigmentos visuais, é termicamente instável e libera seu cromóforo retiniano. No entanto, o fotopigmento biestável, como alguns pigmentos não visuais, gera um fotoproduto estável ao absorver a luz e retornar ao seu estado original após uma subsequente absorção de luz, ou seja, possui dois estados estáveis e fotoconvertíveis (KOYANAGI et al., 2015; KOYANAGI; TERAKITA, 2014).

Os fotopigmentos biestáveis podem ser desvantajosos para os organismos que se movem de um ambiente com luminosidade a um com luz fraca, devido à necessidade de se adaptar de forma rápida à escuridão. Enquanto, os fotorreceptores ciliares poderiam fornecer uma vantagem em tais condições (LAMB, 2013).

1.2.2. Cromóforo do fotopigmento: O *retinal*

Os carotenóides de vegetais, bem como os ésteres de retinil de origem animal, servem como precursores dietéticos do retinol, enquanto, o retinol serve como substrato para a biossíntese do *11-cis-retinal* (NAPOLI, 1996). O *11-cis-retinal* ou retinal (A1) é o cromóforo mais comum em vertebrados e invertebrados. Outro cromóforo conhecido é o *3, 4-dehydroretinal* (A2), habitualmente encontrado em vertebrados, como peixes, anfíbios e répteis. O complexo A1/opsina é geralmente nomeado como rodopsina (derivado de rosa), enquanto A2/opsina é por vezes designado como *porphyropsin* (derivado de roxo) (BOWMAKER, 1995; SHICHIDA; MATSUYAMA, 2009). A1 tem uma absorvância máxima (λ_{max}) próxima a 380 nm, enquanto A2 de 400 nm (BOWMAKER, 1995).

O cromóforo é o componente chave do sensor de luz; isso não apenas absorve a luz, mas também altera sua conformação com a absorção da luz (Figura 4) (SHICHIDA; MATSUYAMA, 2009).

1.2.3. Opsinas é a porção proteica do fotopigmento

A proteína da opsina contém resíduos de aminoácidos conservados (motivos ou *motifs*) importantes para a função de fotopigmento, como o resíduo de lisina (K296) no qual liga-se o cromóforo por uma ligação de base de Schiff a qual é estabilizada com o contra-íon de

glutamato (E113), e ligações de dissulfeto de duas cisteínas (C110 e C187) que contribuem na estabilização da proteína (Figura 4) (KARNIK et al., 1988; TERAOKA, 2005).

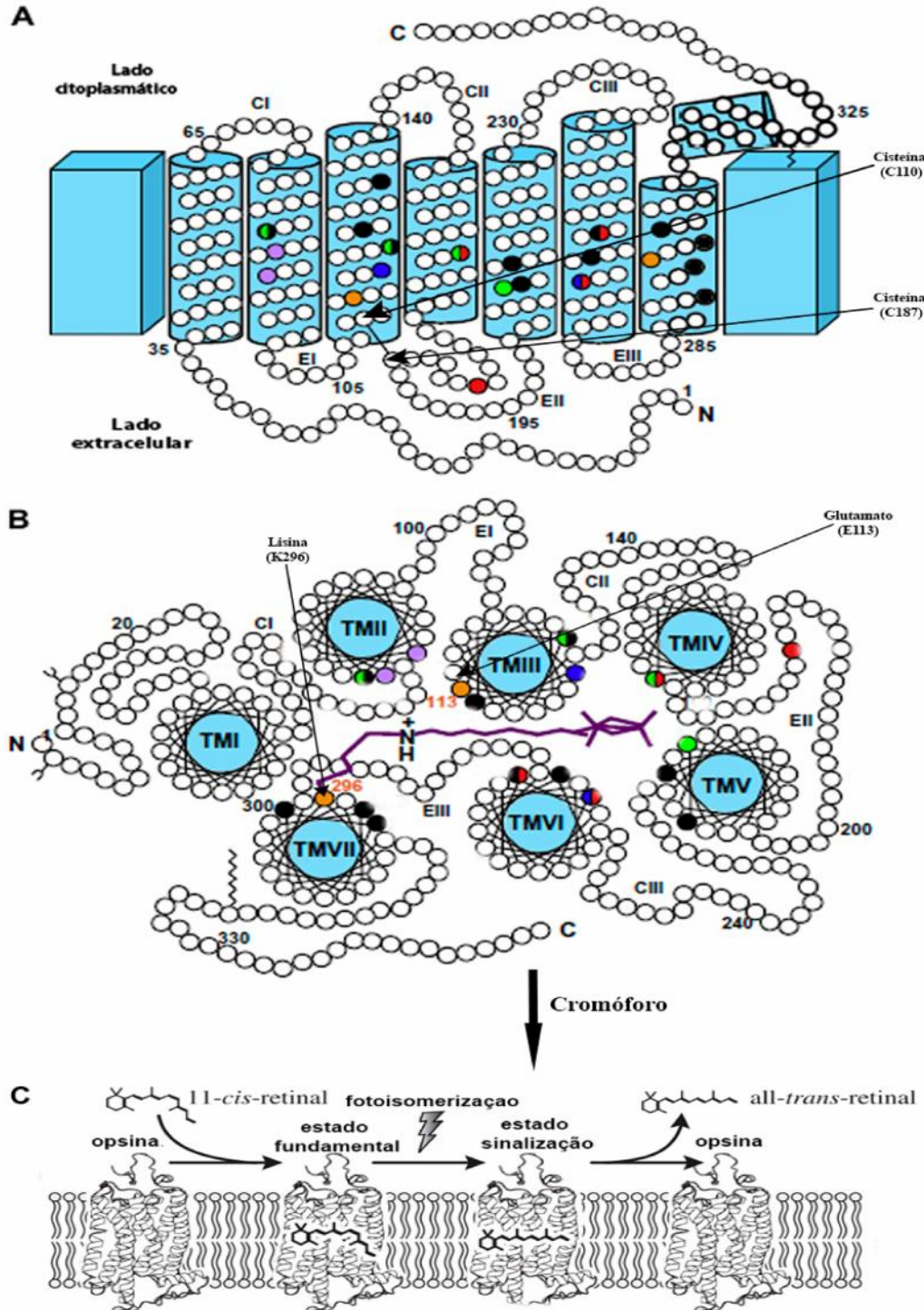


Figura 4 - Estrutura das opsinas e do cromóforo retinal. A. diagrama bidimensional de uma opsina ilustrando as sete hélices α -transmembrana. Resíduos de aminoácidos conservados, ligações de dissulfeto de duas cisteínas (C110 e C187), a lisina 296 (K296) e o glutamato 113 (E113). O sítio de ligação do retinal (K296) e a posição de contra-íon (E113) estão marcados com círculos em laranja. B. Vista mostrando o arranjo das hélices em torno do cromóforo, retinal, mostrado em roxo. C. O cromóforo e seus estados na fotoisomerização (Adaptado de BOWMAKER & HUNT, 2006; SHICHITA & MATSUYAMA, 2009).

Com base na análise de eventos de inserção/deleção (INDELS) e arranjo de íntrons, as opsinas (pigmentos) são classificadas em quatro linhagens (PORTER et al., 2012): tipo C (opsinas encontradas nos fotorreceptores ciliares), tipo R (opsinas dos fotorreceptores rabdoméricos), Cnidops (opsinas cnidárias) e Grupo 4 (Gr4) (Figura 5). No entanto, na literatura científica, a classificação da opsina visual e não visual é mantida de acordo com a sua presença ou ausência no olho, respectivamente (MAX et al., 1995; OKANO; YOSHIZAWA; FUKADA, 1994). Entretanto, estudos recentes relatam a presença de opsinas não visuais nos olhos (PEIRSON; HAIFORD; FOSTER, 2009), e opsinas visuais fora dele (BLACKSHAW; SNYDER, 1997).

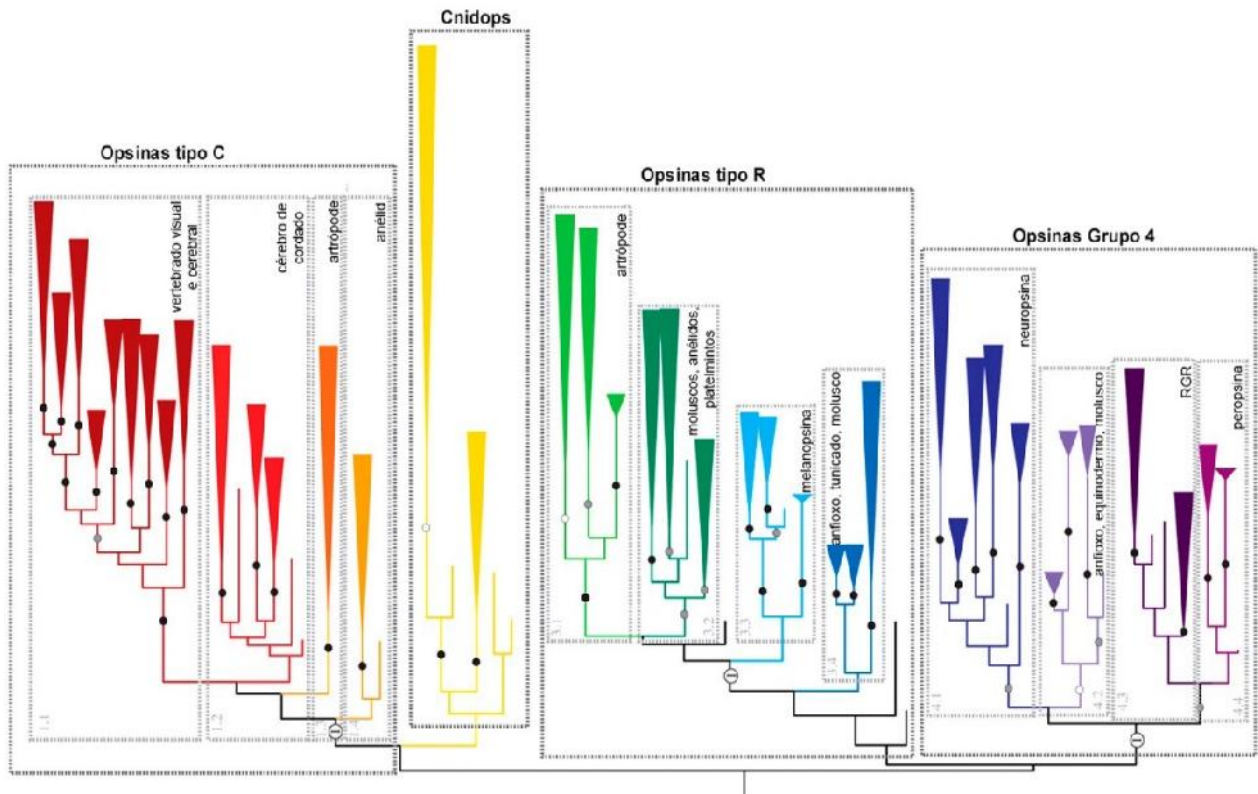


Figura 5 – Classificação das opsinas. Quatro principais linhagens: tipo C, tipo R, Cnidops e Grupo 4 (Adaptado de PORTER et al., 2012).

Outra maneira de classificar as opsinas baseia-se na proteína G com a qual interage. Em função disso, as opsinas podem acoplar-se a diferentes tipos de proteínas G, por exemplo, opsinas acopladas a Gt (opsinas Gt), acopladas a Gq (opsinas Gq), acopladas a Gs (opsinas Gs), acopladas a Go (opsinas Go), acopladas ao Gi (opsinas Gi) e acoplados ao Gi/Go (opsinas Gi/Go). Isto sugere a existência de uma grande diversidade de cascatas de

sinalização mediadas pelo GPCR (KOYANAGI; TERAKITA, 2014; LAMB, 2013; RAMIREZ et al., 2011).

1.2.3.1. Opsinas visuais são pigmentos fotossensíveis

As opsinas visuais (pigmentos visuais) são expressas nas células fotorreceptoras da retina, e estão envolvidas na visão (TERAKITA, 2005). Mas também, elas são expressas fora do olho, como nos cromóforos da pele (BAN et al., 2005; PROVENCIO et al., 1998). Sua presença nesse nível poderia ajudar a regular a cor dinâmica e o padrão do corpo (MATHGER; ROBERTS; HANLON, 2010). São classificadas em opsinas cones (opn1) e opsinas de bastonetes (opn2), as primeiras são responsáveis pela visão de cor e as seguintes pela visão em ambientes escuros (PEIRSON; HAIFORD; FOSTER, 2009; SHICHIDA; MATSUYAMA, 2009). Com base em sua composição de aminoácidos e λ_{max} (Comprimento de onda da sensibilidade máxima) estas opsinas apresentam cinco classes espectrais distintas (Tabela 1) (YOKOYAMA, 2000).

Tabela 1. Sensibilidade espectral de pigmentos visuais em vertebrados

Pigmento Visual		λ_{max} (nm)
Opsina cone	SWS1	360–430
	SWS2	430-460
	RH2	465–520
	LWS/MWS	500–570
Opsina bastonete	RH1	500

1.2.3.2. Opsinas não visuais um novo tipo de fotopigmentos

As opsinas não visuais estão relatadas em tecidos oculares e não oculares (Figura 6). Sua expressão em tecidos oculares, especificamente na camada de células ganglionares, medeia processos envolvidos no ritmo circadiano, intervém no controle da dilatação pupilar em respostas a luz, assim como na formação de imagem (SCHMIDT et al., 2011). Enquanto, sua expressão em tecidos não oculares sugere funções atribuídas a atividades fisiológicas e do comportamento (PEIRSON; HALFORD; FOSTER, 2009), como a regulação fótica dos ritmos circadianos, a fotoperiodicidade e a mudança de cor do corpo (SHICHIDA;

MATSUYAMA, 2009). Esse amplo espectro de expressão provavelmente confere uma série de vantagens adaptativas para a sobrevivência dos teleósteos (DAVIES et al., 2015).

O surgimento das técnicas de Sequenciamento de Nova Geração (NGS, *Next-Generation Sequencing*) permitiu a identificação de um grande número de ortólogos de genes das opsinas não visuais em bancos de dados de genomas e transcriptomas de peixes ósseos (KINGSTON; CRONIN, 2016; PICCIANI et al., 2018). Mais recentemente, abordagens de bioinformática e técnicas de biologia molecular combinadas são utilizadas na identificação de opsinas não visuais (DAVIES et al., 2011, 2015).

A opsina não visual tecido múltiplo de teleósteos (*Teleost multiple tissue opsin, tmt-opsin*) apresenta amplo padrão de expressão em tecidos neurais e não neurais (MOUTSAKI et al., 2003, BELLINGHAM; FOSTER, 2002). As análises de sequência proteica predita de vários genomas de vertebrados revelaram que a opsina *tmt* possui três grupos distintos conservados: *tmt1*, *tmt2* e *tmt3*, e subdividindo-se por sua vez em *tmt1a* e *tmt1b* (FISCHER et al., 2013, SHIRAKI; KOJIMA; FUKADA, 2010). A expressão tecidual do gene *tmt* avaliado por PCR e pelo ensaio de proteção da ribonuclease (RPA) confirmaram a expressão deste gene em olhos de fugu (*Fugu rubripes*) e zebrafish (*Danio rerio*), além de cérebro, fígado, rins e coração (MOUTSAKI et al., 2003). Através de hibridização *in situ*, o cérebro e olho de larvas e adultos de medaka (*Oryzias latipes*) mostraram expressões de *tmt1b*, *tmt3a* e *tmt2*. Além disso, co-expressão de *tmt1b* e *va* (opsina antiga de vertebrado) foi observada em cérebro de *Danio rerio* e *Oryzias latipes* (FISCHER et al., 2013).

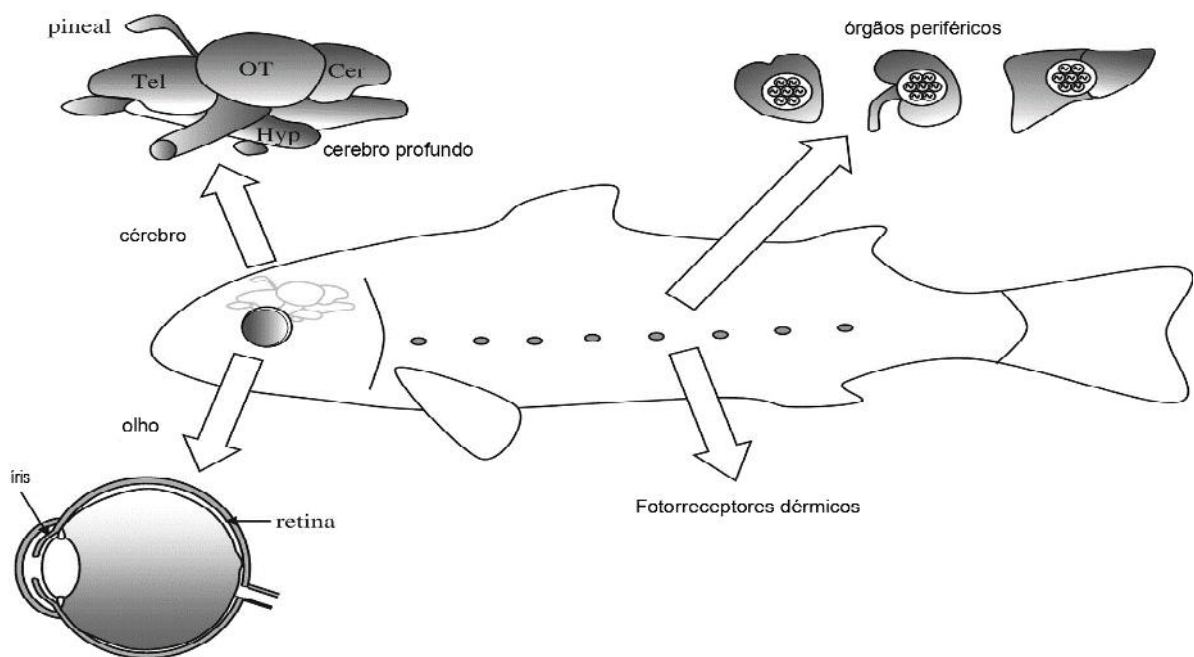


Figura 6 - Sítios fotoreceptivos em peixes. As opsinas não visuais são relatadas em tecidos oculares e não oculares (Adaptado de PEIRSON; HALFORD; FOSTER, 2009).

A expressão de parapinopsina foi relatada pela primeira vez no órgão parapineal da espécie (*Ictalurus punctatus*) conhecido como bagre-americano. Através das análises de HIS (hibridização *in situ*) e Reação da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), a parapinopsina foi expressa em todo o tecido cerebral, incluindo os órgãos pineal e parapineal, assim como na pele e retina (BLACKSHAW; SNYDER, 1997). Além disso, a HIS revelou expressão gênica de *parapinopsina*, opsina *lws* e rodopsina nas papilas gustativas da pele (BLACKSHAW; SNYDER, 1997). No caso do complexo pineal da lampréia do rio (*Lethenteron japonica*), a HIS mostrou que *parapinopsina* e rodopsina estão expressas no órgão pineal e parapineal. A análise de espectroscopia revelou que as células que expressaram *parapinopsina* deram max de ~380 nm (KOYANAGI et al., 2004). Em zebrafish, torafugu (*Takifugu rubripes*) e gar manchado (*Lepisosteus oculatus*) apresentam expressão de *parapinopsina-1* e *parapinopsina-2* no órgão pineal (KOYANAGI et al., 2015). A análise espectroscópica revelou para *parapinopsina-1* uma absorção máxima de 360-370 nm na região UV, indicando que é um pigmento sensível aos raios UV semelhante à *parapinopsina* da lampréia (KOYANAGI et al., 2004, 2015). Enquanto o *parapinopsina-2* de zebrafish, torafugu e a truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) exibiu uma absorção máxima de 460 a 480 nm na região visível (KOYANAGI et al., 2015). Estes resultados mostram a diversificação da *parapinopsina* em relação à sensibilidade espectral.

A opsina antiga de vertebrado (*vertebrate ancient opsin, va-opsin*) foi primeiramente identificada nos olhos de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (SONI; FOSTER, 1997). Estudos de hibridização *in situ* revelaram que *va* é expressa nas células retiniais horizontais e amácrinas em salmão do Atlântico (Figura 7) (PHILP et al., 2000a; SONI; PHILIP; FOSTER, 1998). Além disso, há expressão gênica na retina e na glândula pineal da carpa comum (*Cyprinus carpio*) (MOUTSAKI et al., 2000). Através de HIS a expressão dos genes opsina *va* e melanopsina foram detectadas nas células horizontais da retina de pardelha-dos-alpes (*Rutilus rutilus*) (Figura 8) (JENKINS et al., 2003). HIS e imunocoloração detectaram dois genes parálogos da opsina *va* (*valopa* e *valopb*) no cérebro e olho de zebrafish (KOJIMA et al., 2008). O gene parálogo *valopa* foi expresso no cérebro e olhos de peixes adultos, e apenas na íris em espécimes juvenis, enquanto *valopb* foi expresso somente nas células amácrinas dos juvenis (Figura 9). A análise espectroscópica estimou um max a 505 nm para *valopb*, enquanto *valopa* mostrou um significativo deslocamento al vermelho (510 nm). Tais diferentes padrões de expressão e max sugerem que os genes parálogos da opsina *va* poderiam estar envolvidos na fotossensibilidade e na regulação do desenvolvimento da retina nesta espécie (KOJIMA et al., 2008).

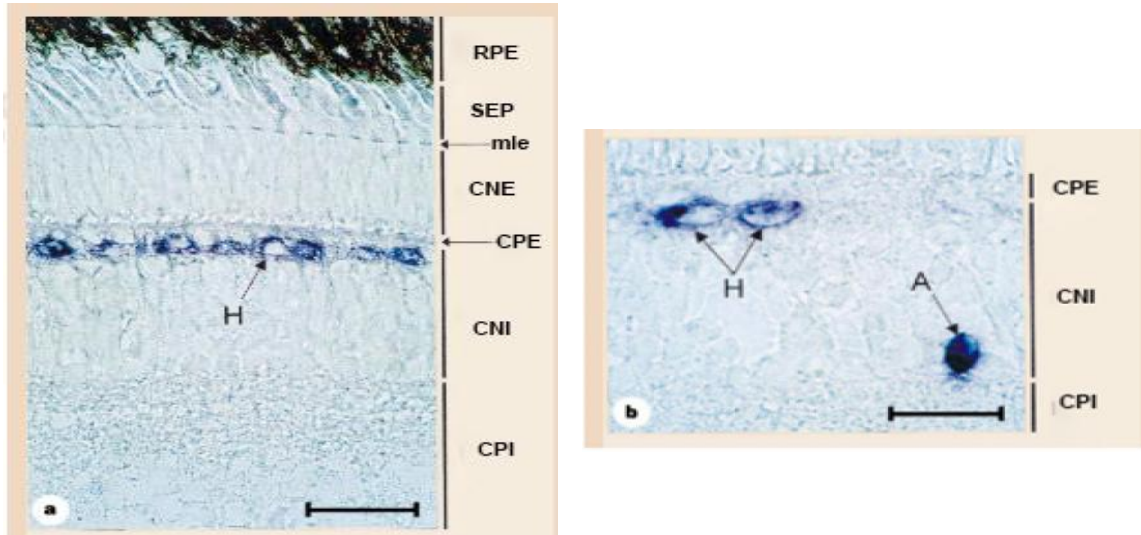


Figura 7 - Hibridização *in situ* da opsina *va* na retina de *Salmo salar*. a, expressão da opsina *va* em células horizontais (H). Escala: 40 μm . b, expressão da opsina *va* em células horizontais (H) e amácrinas (A). Escala: 30 μm . RPE, epitélio pigmentado da retina; mle, membrana limitante externa; SEP, segmentos externos do fotorreceptor (Adaptado de SONI; PHILIP; FOSTER, 1998).

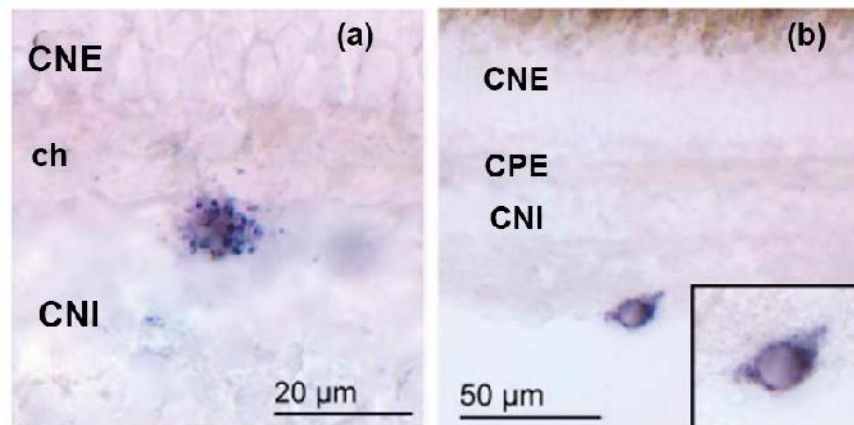


Figura 8 - Hibridização *in situ* da opsina *va* na retina de *Rutilus rutilus*. (a) expressão da opsina *va* na camada de célula horizontal. (b) expressão de opsina *va* dentro de um neurônio localizado na camada de células ganglionares. Camada nuclear externa (CNE), camada celular horizontal (ch); camada nuclear interna (CNI), camada plexiforme externa (CPE) (Adaptado de JENKINS et al., 2003).

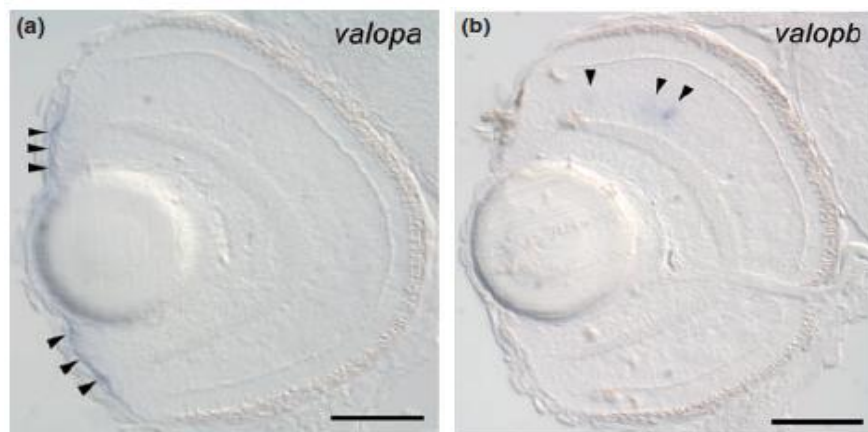


Figura 9 - Distribuição da expressão da opsina *va* no olho de zebrafish. As seções transversais oculares mostram (a) células que expressam um parálogo *va* (*valopa*) na íris, (b) células na retina interna expressam o outro parálogo *va* (*valopb*). Escala: 50 μm . (Adaptado de KOJIMA et al., 2008).

O gene encefalopsina ou panopsina (*opn3*) tem forte expressão no cérebro, (HALFORD et al., 2001). Pela análise de *Northern Blot*, *opn3* foi identificada em diferentes tipos de tecidos de mamíferos, como por exemplo, a retina, cérebro, coração, placenta, pulmão, fígado, músculo esquelético, rim, pâncreas e testículos (BLACKSHAW; SNYDER, 1999; HALFORD et al., 2001).

O gene da melanopsina (*opn4*) é um dos genes das opsinas não visuais mais estudados (DÍAZ; MORERA; GUIDO, 2016; PEIRSON; HAIFORD; FOSTER, 2009; VAN GELDER; BUHR, 2016). Mamíferos apresentam um gene de melanopsina, *opn4m* - “mammalian-like”, enquanto que peixes apresentam dois genes parálogos, *opn4m* e *opn4x* (para “*Xenopus-like*”) (BELLINGHAM et al., 2006). Através da análise filogenética e de expressão gênica, foram identificados genes parálogos *opn4m* e *opn4x* na retina de zebrafish e de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (DAVIES et al., 2011, SANDBAKKEN et al., 2012).

Em zebrafish, foram identificados cinco genes de *opn4*. Nas células horizontais, nas células bipolares, e nas células amácrinas, baixos níveis de expressão foram observados para *opn4m1*, *opn4m3* e *opn4x1*. Um pequeno subgrupo de células ganglionares da retina (CG) apresentou expressão dos genes *opn4x1* e *opn4m3*. No RPE, *opn4m3* foi a única melanopsina expressa, e *opn4m2* foi detectado na camada de células fotorreceptora (DAVIES et al., 2011) (Figura 10). Similarmente na retina de *Salmão salar* foram expressos cinco genes de *opn4*, dois subgrupos do gene *opn4x* (*Opn4x1a* e *Opn4x1b*) e três subgrupos de *opn4m* (*Opn4m1a1*, *Opn4m1a2* e *Opn4m2*) (Figura 11) (SANDBAKKEN et al., 2012).

A neuropsina (*opn5*) foi identificada pela primeira vez, utilizando abordagens bioinformáticas e a técnica RT-PCR no olho, cérebro, testículos e medula espinhal de camundongos e humanos (TARTTELIN et al., 2003). Trabalhos de hibridização *in situ* feitos nos peixes medaka (*Oryzias latipes*) e zebrafish identificaram a presença dos parálogos, a *opn5m* (tipo de mamífero) e a *opn5m2* no olho destes peixes. Sendo a expressão de *opn5m* mais proeminente na retina ventral do que na retina dorsal nesses peixes (Figura 12). Adicionalmente, o gene *opn5m* foi distribuído predominantemente no lado interno da CNI e na CG, que é geralmente consistente com o padrão de expressão de *opn5m* nas retinas de aves e de mamíferos. Além disso, o gene *opn5m2* foi mais abundante na retina dorsal do zebrafish, o que contrasta com o padrão de expressão de *opn5m*. A expressão foi detectada predominantemente no lado externo do CNI, que também está em contraste com do *opn5m* (SATO et al., 2016).

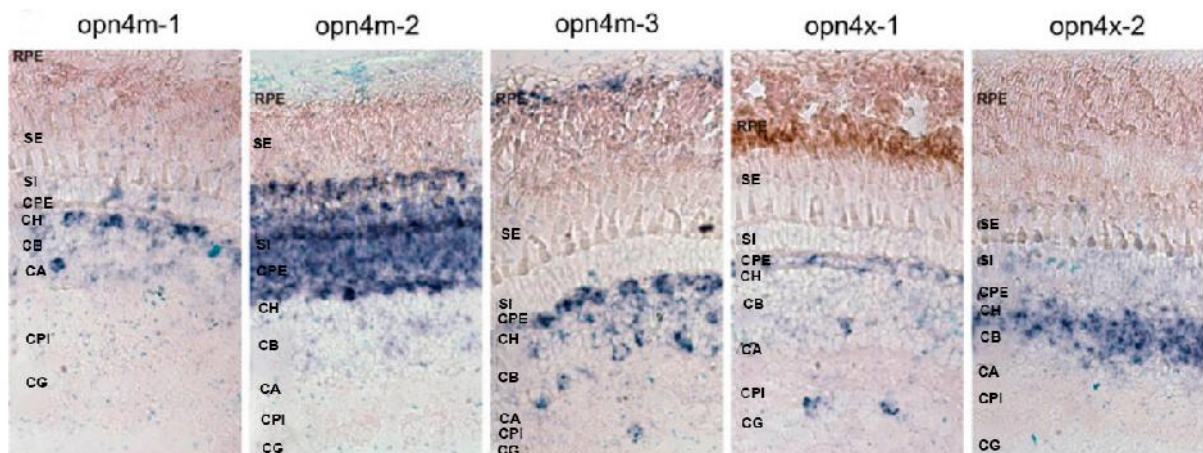


Figura 10 - Hibridização *in situ* dos cinco genes de melanopsina (*opn4m1*, *opn4m2*, *opn4m3*, *opn4x1*, *opn4x2*) na retina de zebrafish. Epitélio pigmentado da retina (RPE); segmento externo, SE; segmento interno, SI; camada plexiforme externa, CPE; célula horizontal, CH; célula bipolar, CB; célula amácrina, CA; camada plexiforme interna, CPI; célula ganglionar, CG (Adaptado de DAVIES et al., 2011).

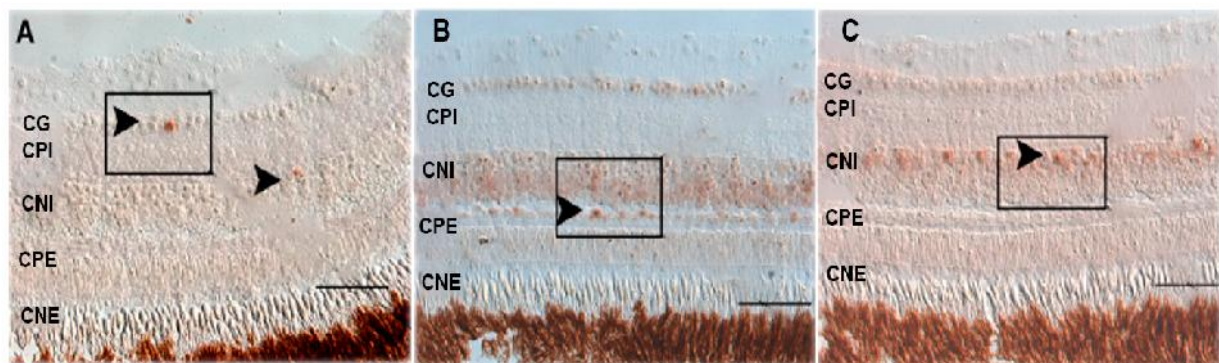


Figura 11 - A expressão de melanopsina na retina de *Salmo salar*. CNE, camada nuclear externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CG, camada de células ganglionares. Escala: 200 μ m. (Adaptado de SANDBAKKEN et al, 2012).

As opsinas *opn6*, *opn7*, *opn8* e *opn9* foram originalmente encontradas por meio de abordagem de bioinformática no genoma de zebrafish. As opsinas descobertas foram *opn6* (*opn6a* e *opn6b*), *opn7* (*opn7a*, *opn7b*, *opn7c* e *opn7d*), *opn8* (*opn8a*, *opn8b* e *opn8c*) e *opn9*, respectivamente. Além disso, da amplificação de RT-PCR, clonagem e sequenciamento de regiões codificantes e hibridização *in situ* confirmaram sua presença no olho do zebrafish (DAVIES et al., 2015). As opsinas *opn6a*, *opn6b* e *opn7a* foram mais expressos na CNE que as outras opsinas, enquanto as opsinas *opn7b*, *opn7c*, *opn8a* e *opn8b*, *opn8c* e *opn9* foram detectados na CNI. Além disso, *opn7d* foi expresso no RPE, e *opn8b* na camada de CG (Figura 13) (DAVIES et al., 2015).

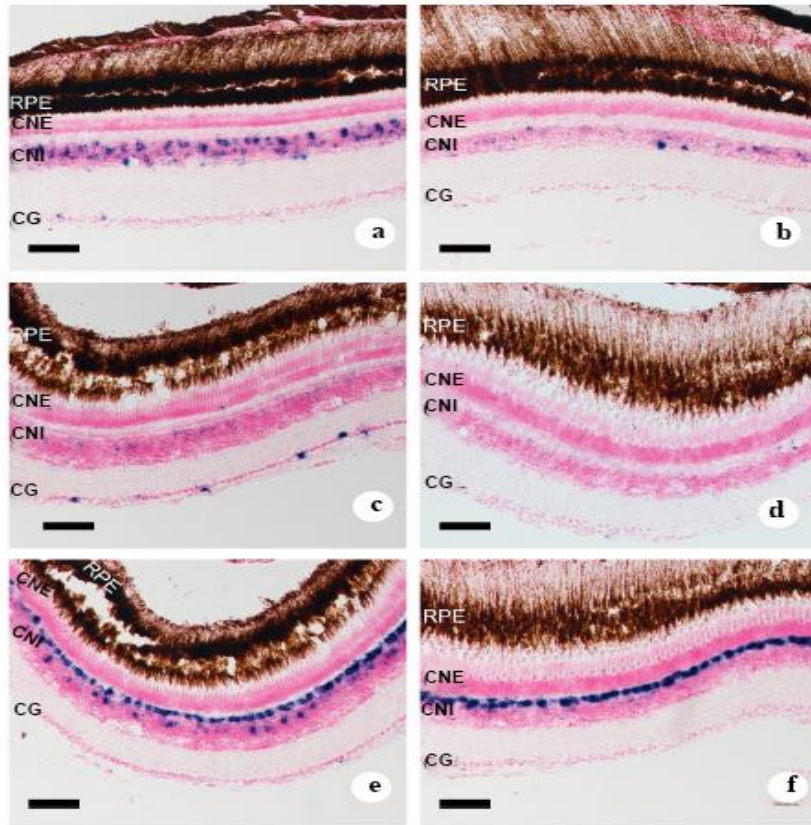


Figura 12 - Hibridização *in situ* de *opn5m* e *opn5m2* na retina de medaka e zebrafish. a - b, vista das áreas laterais ventral e dorsal da retina de medaka com a detecção de *opn5m*, respectivamente; c - d, detecção de *opn5m* na retina de zebrafish. Vistas das áreas laterais ventral e dorsal retina, respectivamente. e - f, detecção de zebrafish *opn5m2* dentro da retina. Vistas ampliadas das áreas ventral e dorsal, respectivamente. Escala: 50 μm . (Adaptado de SATO et al., 2016).

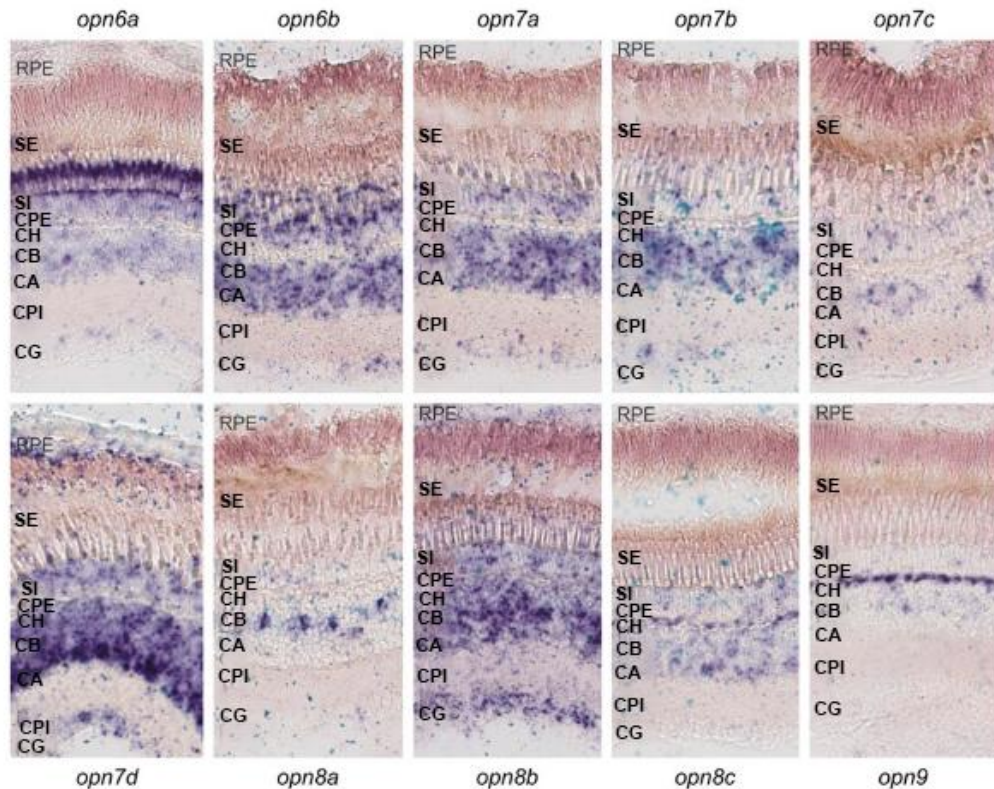


Figura 13 - Localização dos genes das opsinas *opn6*, *opn7*, *opn8* e *opn9* na retina de zebrafish por hibridização *in situ*. RPE, epitélio pigmentado da retina; SE, segmento externo; SI, segmentos internos; CPE, camada plexiforme externa; CH, camada celular horizontal; CB, camada celular bipolar; CA, camada celular amácrinas; CPI, camada plexiforme interna, e CG, camada de célula ganglionar (Adaptado de DAVIES et al., 2015).

As opsinas exorodopsina (*exo-rod*) e *parietopsina* relatam uma expressão extra-retinal. A *exo-rod* compartilha 74% de identidade de nucleotídeos e aminoácidos com a rodopsina, daí seu nome (MANO; KOJIMA; FUKADA, 1999; PHILP et al., 2000b). Esta opsina é expressa na glândula pineal de peixes (HANKINS; DAVIES; FOSTER, 2014; MANO; KOJIMA; FUKADA, 1999). A análise pela espectrofotometria de *exo-rod* de *Takifugu rubripes* revelou uma sensibilidade espectral (max = 498 nm) semelhante à da rodopsina (max = 501 nm) (TARTTELIN et al., 2011). Por outro lado, a *parietopsina* é expressa nos fotorreceptores do olho parietal do lagarto (SU et al., 2006) e na glândula pineal do zebrafish (SHIRAKI; KOJIMA; FUKADA, 2010). A *parietopsina* é sensível à luz verde (SU et al., 2006).

Finalmente, algumas opsinas não visuais funcionam como fotoisomerases (CHEN et al., 2001; TSUKAMOTO; TERAOKA, 2010). Ou seja, são isomerases que se ligam a *all-trans* retinal e geram *11-cis* retinal. Sua função não está relacionada à ativação da cascata de sinalização da proteína G (SHICHIDA; MATSUYAMA, 2009). As opsinas não visuais relacionadas com atividade de fotoisomerase são opsina *rgr* e peropsina (*rrh*). No caso da opsina *rgr* (*RPE-retinal G protein-coupled receptor*), as análises de HIS e imuno-histoquímica revelaram sua expressão na camada nuclear interna (CNI), nas células ganglionares (CG), nas células de Muller da retina e RPE bovino (JIANG; PANDEY; FONG, 1993). Da mesma forma, a opsina *rgr* está envolvida na regeneração da rodopsina. Por causa disso, acredita-se que preservando os níveis de rodopsina e a sensibilidade da retina, esta opsina ajudaria a prevenir a cegueira noturna e forneceria uma vantagem adaptativa em espécies que estão sujeitas a grande variação na iluminação do ambiente (CHEN et al., 2001). Enquanto que a opsina peropsina (*RPE-derived rhodopsin homologue, rrh*) foi identificada no RPE de rato, por análises HIS e imuno-histoquímica. Além disso, a peropsina é expressa na membrana externa do RPE, enquanto a opsina *rgr* é manifestada nas membranas internas do epitélio pigmentado da retina. Esta localização na superfície sugere que a peropsina poderia desempenhar um papel na detecção de luz ou como sensores do retinal liberado pela fotodegradação (*photobleaching*) dos pigmentos visuais (SUN et al., 1997).

As opsinas não visuais formam a base para um maior entendimento sobre fotorrecepção tecidual direta, o que é um passo importante, devido a limitação de estudos com uma avaliação completa da amplitude e da importância de respostas não-visuais à luz (DAVIES et al., 2015). Da mesma forma, poucos estudos relatam a absorvância espectral em pigmentos não visuais (Tabela 2).

Tabela 2. Sensibilidade espectral de pigmentos não visuais em peixes

Pigmento não visuais	max (nm)	Referencia
<i>parapinopsina-1</i>	360-370	KOYANAGI et al., 2015, 2004.
<i>parapinopsina-2</i>	460 - 480	KOYANAGI et al., 2015
<i>opn4x1</i>	470	DAVIES et al., 2011
<i>opn4m2</i>	484	DAVIES et al., 2011
<i>tmt</i>	460	KOYANAGI et al., 2013
<i>va-A</i>	510	KOJIMA et al., 2008
<i>va-B</i>	505	KOJIMA et al., 2008
<i>opn5m2</i>	360, 462	SATO et al., 2016
<i>opn6</i>	510	DAVIES et al., 2015
<i>opn7d</i>	369, 508	DAVIES et al., 2015
<i>opn8c</i>	375	DAVIES et al., 2015

Dessa forma, poderíamos dizer *a priori* que opsinas não visuais podem ter papel no processo visual devido a sua presença e diversidade nas diferentes camadas da retina. Embora existam poucos estudos *in vitro* relatando opsinas não visuais que codificam fotopigmentos funcionais (Tabela 2) (DAVIES et al., 2015).

Os peixes são organismos que se adaptaram a uma diversidade de habitats fóticos e afóticos através da modificação de seu sistema visual, sendo chave para entender essas notáveis adaptações a diferentes ambientes fóticos a variabilidade encontrada na sensibilidade espectral, na expressão e no número de pigmentos na retina e no cérebro de diferentes espécies (DRIVENES et al., 2003; YOKOYAMA, 2000).

1.3 FOTOPIGMENTOS E O AMBIENTE FOTICO

Os peixes usam diferentes estratégias de mecanismos moleculares em seus pigmentos visuais para se adaptarem a ambientes fóticos diversos, como as substituições na sequência de aminoácidos das opsinas, o uso de um cromóforo alternativo (A2), alterações nos padrões de expressão de opsinas (espacial e temporal) e alterações no tamanho do repertório de opsinas que podem acontecer devido à duplicação e pseudogeneização das opsinas (MINAMOTO; SHIMIZU, 2005, HAUSER; CHANG, 2017) (Figura 14).

Alterações adaptativas na sequência de opsina podem ocorrer devido a substituições não-sinônimas (substituições que alteram os aminoácidos) e podem afetar a função e a atividade da proteína (DHAR et al., 2014; CHOI; CHAN, 2015). Essas substituições de aminoácidos que causam diferenças estruturais nas opsinas podem alterar drasticamente a sensibilidade do fotopigmento já que a sensibilidade espectral do pigmento depende das

interações entre os aminoácidos presentes na bolsa de ligação à opsinina e seu cromóforo; esse processo é conhecido como ajuste espectral. (Figura 14a) (HAUSER; CHANG, 2017; HAZEL et al., 2006).

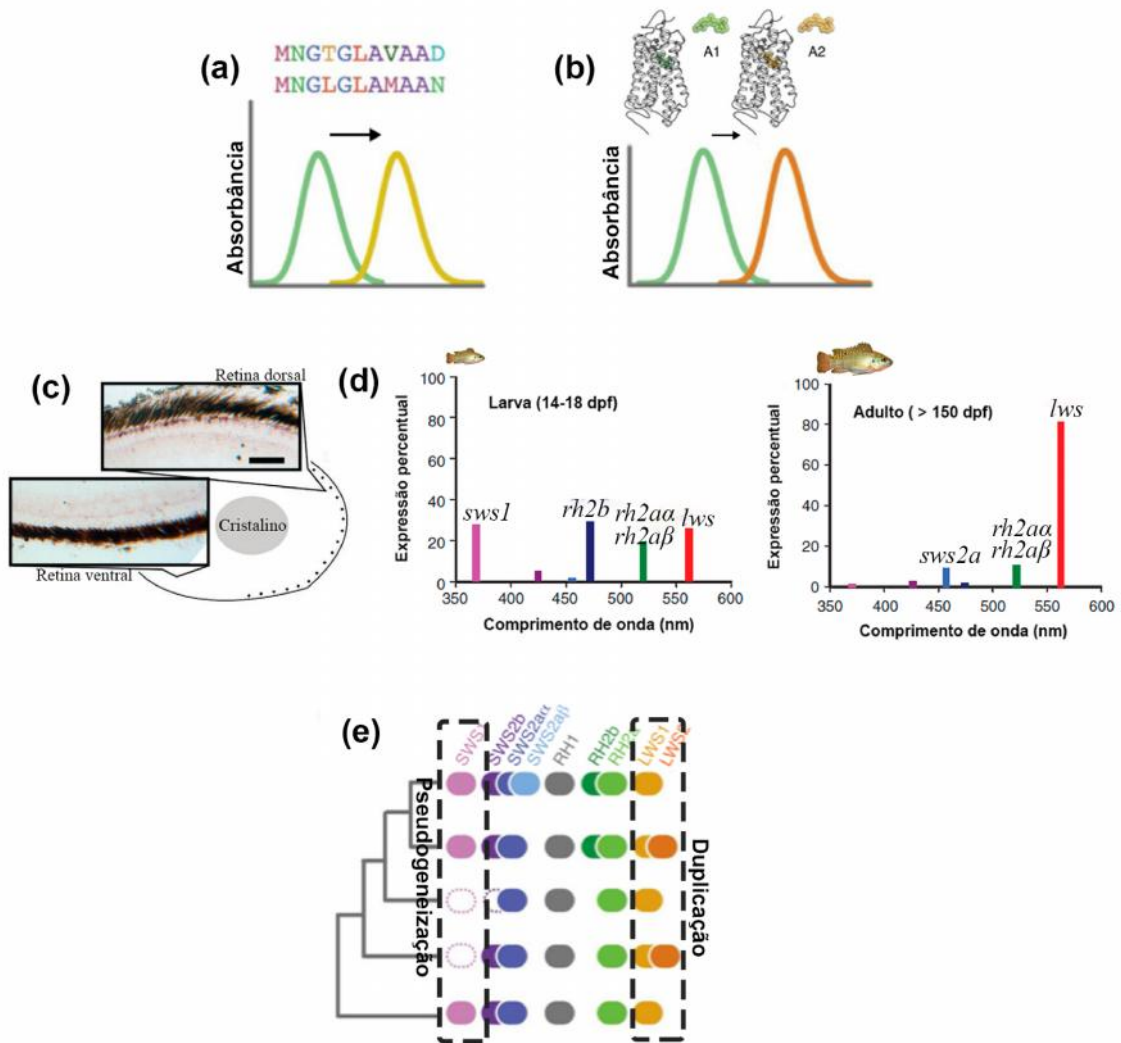


Figura 14 - Estratégias de mecanismos moleculares no pigmento visual de vertebrados na adaptação a ambientes foticos diversos. (a) Substituições na sequência de aminoácidos das opsinas. (b) O uso de um cromóforo alternativo (A2). (c) Alterações nos padrões de expressão espacial do gene das opsinas *lws* na retina de *Poecilia reticulata*. Esses genes *lws* são mais expressos na região dorsal do que na região ventral da retina. Escala: 100 μ m. (d) Alterações nos padrões de expressão dos genes das opsinas cones durante o desenvolvimento da tilápia-do-nylo. Níveis de expressão relativamente semelhantes das opsinas *lws*, *rh2a*, *rh2b* e *sws1* no estágio larval de 14-18 dias após a fertilização (dpf). Enquanto a expressão é dominada pela opsinina *lws* com menores níveis de expressão de *rh2a* e *sws2a* no estágio adulto. (e) Alterações no tamanho do repertório da opsinina devido à duplicação e pseudogeneização das opsinas (Adaptado de HAUSER & CHANG, 2017; RENNISON et al., 2011; BOWMAKER, 2011).

Ajustes espectrais para substituições de aminoácidos em pigmentos visuais são amplamente estudados (CARLETON, 2009; LIN et al., 2017, 1998; STIEB et al., 2017; YOKOYAMA, 2000, 2008, HOFMANN; CARLETON, 2009; WEADICK; CHANG, 2007).

As substituições na opsina *lws* levam a um deslocamento para azul (*blueshift*), outro exemplo deste fenômeno são substituições em rodopsina (*rh1*), que podem levar ao deslocamento para azul ou vermelho. Dependendo do habitat (LIN et al., 2017; YOKOYAMA, 2000; YOKOYAMA; KNOX; YOKOYAMA, 1995).

Do mesmo modo, em relação a mudança do cromóforo A1/A2, pigmentos podem alterar seu ajuste espectral, substituindo o cromóforo A1 (*11-cis-retinal*) pelo cromóforo alternativo A2 (*3, 4-dehydroretinal*), ou vice-versa (Figura 14b) (YOKOYAMA, 2000). Os pigmentos que exibem A2 têm um max substancialmente deslocado para o vermelho (ENRIGHT et al., 2015; HAUSER; CHANG, 2017; TERAJ et al., 2017).

A expressão gênica assimétrica dos parálogos das opsinas é outro meio adicional de modulação da sensibilidade. Isso desempenha um papel importante na diversificação de pigmentos visuais em peixes, produzindo grandes ou pequenas alterações na sensibilidade dos fotorreceptores (HAUSER; CHANG, 2017; HOFMANN; CARLETON, 2009). Também pode ocorrer como parte de uma resposta plástica de curto prazo às mudanças ambientais. Além disso, essas mudanças na sensibilidade são maiores do que as resultantes de substituições de aminoácidos nas sequências das opsinas (HOFMANN; CARLETON, 2009; CARLETON, 2009).

A maioria dos fotorreceptores contém um único fotopigmento, uma proteína ligada a um cromóforo, que juntos determinam a sensibilidade espectral. Mas algumas exceções são relatadas em que um fotorreceptor coexpressa opsinas que formam pigmentos visuais espectralmente distintos. Este caso é característico na retina de ciclídeos como a espécie *Metriaclima zebra*. Os fotorreceptores coexpressam genes de opsina de *rh2a* (com *rh2b*) e *lws* (com *rh2a*) em regiões particulares da retina, com *rh2a* concentrado na região nasal e *lws* na região ventral (Figura 15). Essa coexpressão aumenta a sensibilidade a comprimentos de onda maiores e provavelmente afetará a visão das cores de diferentes maneiras. Portanto, a co-expressão da opsina pode ser um novo mecanismo de ajuste espectral que pode ser útil para detectar presas, predadores e companheiros (DALTON et al., 2014). Por outro lado, gotas de óleos são relatadas nos cones, principalmente em aves, répteis e alguns peixes (PRICE, 2017). Essas gotas atuam como filtros de cor, possuem altas concentrações de carotenóides e são suficientemente densas para alterar fortemente a distribuição espectral da luz que afeta os pigmentos visuais (BOWMAKER, 2008; LIEBMAN; GRANDA, 1975).

A expressão espacial (ou expressão intra-retinal, veja-se RENNISON et al., 2011) pode variar ao longo da retina ou em partes da retina relacionadas a diferentes regiões espaciais do ambiente. Isso ocorre porque a luz incidente na retina dorsal é de uma composição espectral diferente daquela da retina ventral, como resultado das propriedades de filtração da água e partículas suspensas nela que alteram as propriedades espectrais da luz. Como é o caso do gene da opsina *lws* na retina de *Poecilia reticulata*. Esses genes *lws* são mais expressos na região dorsal do que na região ventral da retina (Figura 14c) (RENNISON et al., 2011). Por causa disso, essa variação espacial poderia ser vantajosa para os peixes (HOFMANN; CARLETON, 2009; CARLETON, 2009; CARLETON; KOCHER, 2001; DRIVENES et al., 2003; PARRY et al., 2005; RENNISON et al., 2011).

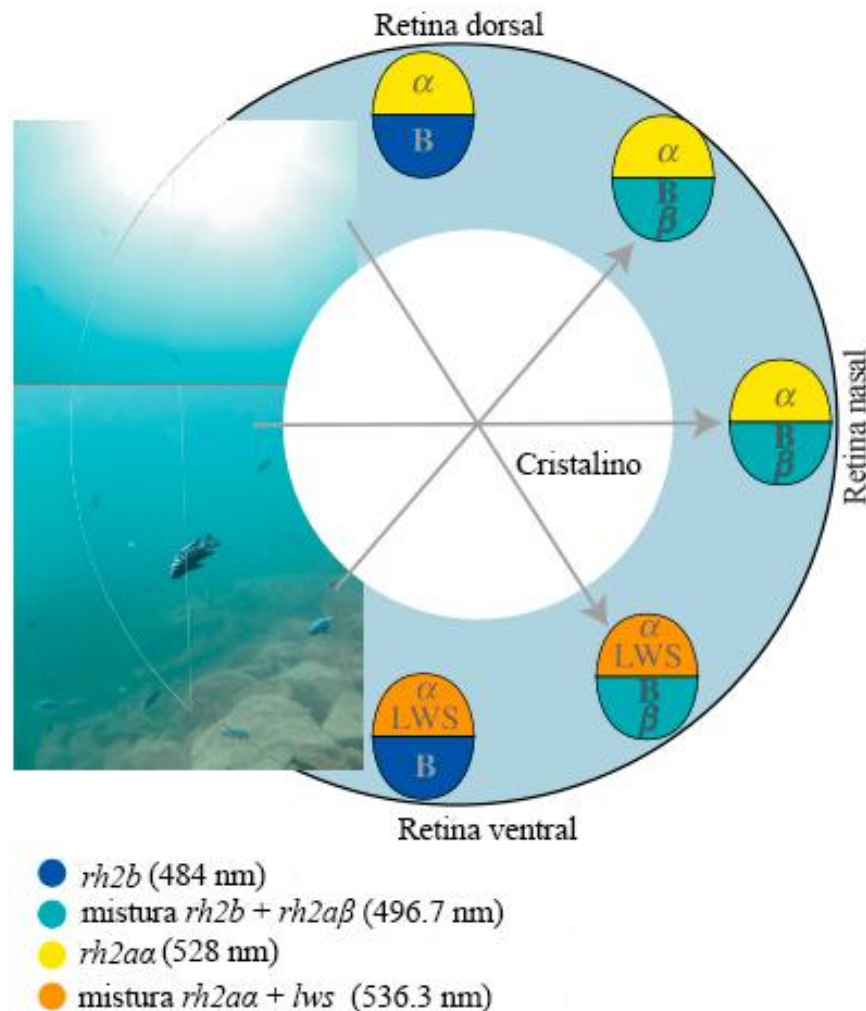


Figura 15 - Cones duplos na retina de *Metriaclima zebra* expressam constantemente *rh2b* e *rh2a* em diferentes regiões da retina. Além disso, o *rh2a* foi coexpresso com *rh2b* e o *lws* foi coexpresso com *rh2a* em regiões particulares da retina (Adaptado de DALTON et al., 2014).

Por outro lado, a expressão temporal pode resultar de mudanças temporais na sequência do desenvolvimento da expressão de opsina (O'QUIN et al., 2011; SPADY et al.,

2006) também conhecida como mudanças heterocrônicas (CARLETON et al., 2008). A expressão da opsina pode ser dinâmica, com uma progressão de diferentes combinações de genes de opsina dos estágios larvais para adultos (CARLETON et al., 2008). Como é o caso das espécies migratórias salmão-rosa *Oncorhynchus gorbuscha* (CHENG; FLAMARIQUE, 2004) e tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus*. Na tilápia-do-nilo, os níveis de expressão são relativamente semelhantes das opsinas *lws*, *rh2a*, *rh2b* e *sws1* no estágio larval de 14-18 dias após a fertilização (dpf). Enquanto a expressão é dominada pela opsina *lws* com menores níveis de expressão de *rh2a* e *sws2a*, e com a perda de sensibilidade UV (*sws1*) no estágio adulto (Figura 14d) (BOWMAKER, 2011). Enquanto espécies que passam a vida inteira em ambientes fóticos constantes podem usar um repertório de pigmentos para essas condições, e podem não requerer mudanças no desenvolvimento da sensibilidade visual (CARLETON et al., 2008).

Dessa forma, a expressão espacial ou temporal das opsinas permite uma grande plasticidade na sensibilidade visual dos peixes (CARLETON, 2009; CARLETON et al., 2016; HAUSER; CHANG, 2017).

As alterações no tamanho do repertório da opsina podem acontecer devido à duplicação e pseudogeneização das opsinas (Figura 14e). Em teleostes, cada gene de opsina foi duplicado pelo menos uma vez e vários sofreram múltiplos ciclos de duplicação (HOFMANN; CARLETON, 2009). Mutações em genes duplicados podem gerar dois ou mais pigmentos espectralmente diferentes dentro de uma classe de opsina (BOWMAKER; HUNT, 2006) e sua expressão pode gerar grandes mudanças na sensibilidade visual (HOFMANN; CARLETON, 2009). A heterogeneidade ambiental impulsiona a duplicação e divergência das opsinas no sistema visual (DAVIES et al., 2015; RENNISON; OWENS; TAYLOR, 2012).

No caso de pseudogenes, nas últimas décadas, estes foram identificados em diversos organismos com o surgimento e aplicação de NGS (EMERLING; SPRINGER, 2014; FANG et al., 2014; LIN et al., 2017). Pseudogenes () são genes que apresentam um códon de parada prematuro em sua região codificante (LIN et al., 2017). Inicialmente, estes foram rotulados como DNA lixo (PINK et al., 2011), porque a maioria tem múltiplas características que confirmam seu status não funcional (MIGHELL et al., 2000). No entanto, alguns pseudogenes podem ser transcritos (YAMADA et al., 2003; ZOU et al., 2009) e apresentam atividades biológicas (FEENSTRA et al., 2000; HIROTSUNE et al., 2003; KANDOUZ et al., 2004; MURO; MAH; ANDRADE-NAVARRO, 2011). Organismos subterrâneos relatam pseudogenes envolvidos no sistema visual (EMERLING; SPRINGER, 2014; FANG et al., 2014).

As espécies que serão abordadas neste estudo são *Anableps anableps* e *Phreatobius cisternarum*, não há evidência disponível na literatura acerca da identificação de opsinas não visuais ou da relação destas as adaptações a diferentes ambientes fóticos. O estudo das adaptações nessas espécies com ênfase nas opsinas não visuais irá melhorar compreensão dos mecanismos moleculares e de suas relações com as adaptações visuais em seus entornos atípicos, e segundo, possibilitar informações basais para estudos futuros que investigam a compreensão das doenças visuais, para os quais estas espécies podem servir como um poderoso sistema de modelo natural. Esta tese tem como, nosso objetivo principal avaliar a base molecular das adaptações visuais nos genes das opsinas de *Anableps anableps* e *Phreatobius cisternarum* através da análise de transcriptoma.

O **primeiro capítulo**, concentra-se na espécie *Anableps anableps*, que vive em um ambiente aéreo-aquático. As opsinas não visuais foram analisadas *in silico* e por hibridização *in situ*, para um maior entendimento de como esses animais se adaptam para aumentar a probabilidade de detectar e reconhecer estímulos de luminosidade em ambientes diferentes. Já o **segundo capítulo**, utiliza a espécie *Phreatobius cisternarum*, de ambiente subterrâneo. O capítulo se concentra na expressão dos genes de opsinas e genes das estruturas oculares, analisados *in silico* e por histologia, e como eles podem coordenar adaptações a esse ambiente com escassa luminosidade. Além disso, foram estudadas as estruturas sensórias, conhecida como os neuromastos, os quais poderiam contribuir para sua adaptação em um ambiente subterrâneo.

2. CAPÍTULO I. ADAPTAÇÕES VISUAIS A AMBIENTES AÉREO-AQUÁTICOS EM ANABLEPS ANABLEPS

2.1. RESUMO

Espécies de ambientes aquáticos, especialmente aquelas que vivem no limite aéreo-aquático, desenvolveram modificações no nível ocular que contribuíram para as adaptações a esses ambientes. *Anableps anableps* é uma espécie que vive na superfície da água e está exposto a um ambiente de heterogeneidade espectral. Seus grandes olhos lhe proporcionam visão aérea e aquática simultânea. Neste estudo, combinamos as análises de RNA-Seq e de hibridização *in situ* para caracterizar o padrão de expressão gênica de opsinas não visuais tipos C e Grupo 4 na retina de *A. anableps* adultos e larvas para entender as adaptações moleculares dos pigmentos ao seu habitat particular. A análise do transcriptoma do olho revelou 20 genes de opsinas não visuais. Este repertório com um grande número de genes da opsina reflete a heterogeneidade ambiental em que a espécie vive. Da mesma forma, as análises comparativas nas sequências codificantes da proteína das opsinas permitiram a identificação de seis opsinas apresentando os típicos motivos de aminoácidos do tipo C e nove do Grupo 4, conservadas entre si. Os estudos por hibridização *in situ* na retina mostraram expressão assimétrica das opsinas não visuais no estágio larval e adulto, bem como uma expressão dessas opsinas durante o desenvolvimento ocular da espécie. Assim, sugerindo que esses padrões de expressão dos genes das opsinas poderiam contribuir para a mudança da sensibilidade espectral e, finalmente, na adaptação visual dessa espécie ao seu peculiar ambiente aéreo-aquático. A expressão das opsinas não-visuais varia na retina de *A. anableps* o que motiva experimentos de microespectrofotometria para validar seu efeito sobre a adaptação visual dessa espécie.

Palavras-chave: Peixe. Opsinas. Padrão de expressão. Repertório de opsina. Transcriptoma.

2.2. ABSTRACT

Species from aquatic environments, especially those that live in the aerial-aquatic limit, developed modifications at the ocular level that contributed to the adaptations to those environments. *Anableps anableps* is a surface-dwelling fish that is exposed to a heterogeneous spectral environment. Its large eyes provide them with a simultaneous vision from above and below the water. In this study, we combined RNA-Seq and *in situ* hybridization analyses to characterize the gene expression pattern of C-type and Group 4 non-visual opsins in the retina from *A. anableps* adults and larvae to understand the molecular adaptations of pigments to its particular habitat. The transcriptome analysis revealed 20 non-visual opsin genes. This repertoire with a large number of opsin genes reflects the environmental heterogeneity in which the species lives. Likewise, comparative analyzes in protein coding sequences of the opsins allowed the identification of six opsins presenting the typical amino acid motifs of C-type and nine of Group4, conserved among themselves. *In situ* hybridization studies in the retina showed asymmetric expression of non-visual opsins in the larval and adult stages, as well as temporal expression of these opsins during the ocular development of the species. Therefore, suggesting that these expression patterns of opsin genes could contribute to the change of spectral sensitivity and, finally, in the visual adaptation of this species to its peculiar aerial-aquatic environment. The expression of non-visual opsins varies in the *A. anableps* retina, which motivates microspectrophotometry experiments to validate its effect on the visual adaptation of this species.

Keywords: Fish. Opsins. Expression pattern. Opsin repertoire. Transcriptome.

2.3. INTRODUÇÃO

2.3.1. Adaptações oculares a um ambiente aéreo-aquático

As variações significativas nos olhos de animais aquáticos são um reflexo de variações na incidência de luz em ambientes aquáticos em diferentes profundidades (WARRANT; JOHNSEN, 2013). Espécies de peixes distribuem-se em diversos habitats, desde a superfície até aquelas que habitam as regiões abissais, apresentando adaptações visuais relacionadas ao ambiente onde eles se estabeleceram ao longo da evolução. Espécies de ambientes superficiais, especialmente aquelas que vivem no limite aéreo-aquático, desenvolveram modificações a nível ocular que contribuem para as adaptações a esses ambientes (Figura 16) (HELFMAN et al., 2009). Os peixes anfíbios saltadores-do-lodo (*mudskippers*) (Perciformes: Gobiidae) representados pelas espécies *Boleophthalmus* spp. e *Periophthalmodon* spp., podem viver fora da água (Figura 16A) (YOU et al., 2014). Estas espécies tem cabeças ou pelo menos olhos projetados no ar (TYTLER; VAUGHAN, 1983). As análises dos genomas dessas espécies relatam genes das opsinas *lws*, *rh1*, *rh2* e *sws2*, mas ausência de opsina *sws1* possivelmente como consequência da maior exposição dos *mudskippers* à luz ultravioleta durante suas incursões fora da água. Além disso, substituições de aminoácidos nas opsinas *lws1* e *lws2* poderiam contribuir à visão aérea e para melhorar a visão das cores. Provavelmente, essas alterações genéticas estão associadas à adaptação ao meio terrestre nesses peixes anfíbios (YOU et al., 2014; LIN et al., 2017). O blenny de quatro olhos *Dialommus fuscus* (Perciformes: Labrisomidae), uma espécie com comportamento anfíbio na zona intermaré, onde vivem e procuram alimento apresenta olhos no topo da cabeça, com uma córnea dividida (ântero-posteriormente), além de uma única pupila e uma retina dividida (Figura 16B). A córnea dividida permite que o peixe consiga enxergar nos dois ambientes quando permanece na posição vertical com uma córnea no ar (córnea anterior ligeiramente maior) e uma córnea na água (córnea posterior) (NIEDER, 1999, 2001; SCHWAB et al., 2001). Outras espécies de peixe com visão aérea-aquática é o peixe-arqueiro (*Toxotes chatareus*) (Perciformes: Toxotidae) que tem olhos com especializações para uma visão na interface entre o ar e a água (Figura 16C). Eles atingem uma presa aérea com um jato de água para prendê-la e devorá-la na superfície da água (SCHUSTER; MACHNIK; SCHULZE, 2011). No peixe-arqueiro, através da análise com microespectrofotometria foi relatada que o ajuste espectral na retina se deve ao uso do cromóforo alternativo (A1/A2) e a expressão

gênica assimétrica das opsinas cones y bastonetes nas diferentes regiões da retina (região dorsal, *ventro-nasal* e *ventro-temporal*) associado a três eixos visuais diferentes, cada um sintonizado em um ambiente de luz espectral ou tarefa visual diferente. Como é o caso da região *ventro-temporal* da retina, que possui três tipos de cones, isso daria ao peixe-arqueiro uma visão tricromática no eixo visual que eles usam para detectar presas na folhagem terrestre (TEMPLE et al., 2010). *Anableps anableps* é um peixe que nada na superfície e está exposto a um ambiente de heterogeneidade espectral (Figura 16D), os olhos lhe proporcionam uma vigilância simultânea acima e abaixo da água, permitindo a exploração eficiente de habitats superficiais e costeiros, e mantendo o resto do corpo debaixo da água (MILLER, 1979; OLIVEIRA et al., 2006; OWENS et al., 2012).

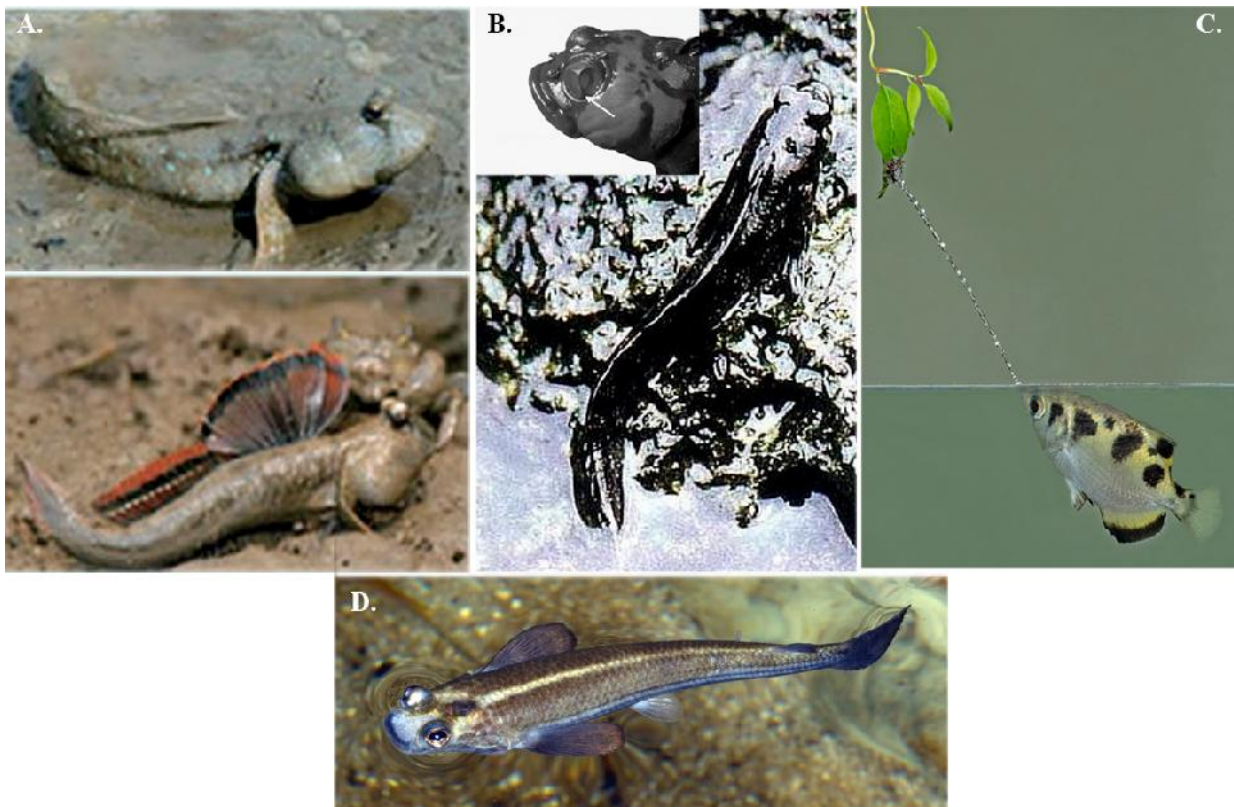


Figura 16 - Espécies de ambientes aéreo-aquático. A. Peixes anfíbios saltadores-do-lodo (*mudskippers*). B. O blenny de quatro olhos (*Dialommus fuscus*). C. O peixe-arqueiro (*Toxotes chatareus*). D. O peixe de quatro olhos (*Anableps anableps*) (Adaptado de NIEDER 2001; SCHUSTER; MACHNIK; SCHULZE, 2011; YOU et al., 2014; PEREZ et al., 2017). ([Http://www.stevegettle.com/2016/10/31/archerfish-hunting/](http://www.stevegettle.com/2016/10/31/archerfish-hunting/); https://www.fishbase.se/images/species/Difus_u2.jpg; <http://www.ryanphotographic.com/ablepidae.htm>).

2.3.2. *Anableps anableps*: visão anfíbia

Os peixes que vivem na superfície da água ou que ocasionalmente se encontram totalmente fora da água, possuem visão aérea (HELFMAN et al., 2009). *A. anableps*

apresenta olhos esféricos (Figura 17a) e possui a córnea dividida horizontalmente, paralelamente ao eixo ântero-posterior do animal. A íris exibe uma projeção semelhante a uma faixa que divide a abertura pupilar na região central (Figura 17b). A divisão da íris corresponde à faixa pigmentada na córnea (FP, figura 17c), criando uma abertura pupilar para a entrada de estímulos luminosos aéreos e outra abertura pupilar para a luz proveniente do ambiente aquático (SCHWAB et al., 2001). O cristalino é piriforme, está mais próximo da córnea dorsal e apresenta movimentos ântero-posterior ao longo do eixo da pupila (SIVAK, 1976; SWAMYNATHAN et al., 2003). A região dorsal da retina recebe a luz do ambiente aquático em decorrência das partículas dissolvidas na água que alteram o conteúdo espectral. Enquanto que, a retina ventral recebe diretamente a luz aérea não filtrada pela água. Assim, ambas regiões do olho recebem comprimentos de onda espectrais diferentes (Figura 17c) (OWENS et al., 2012).

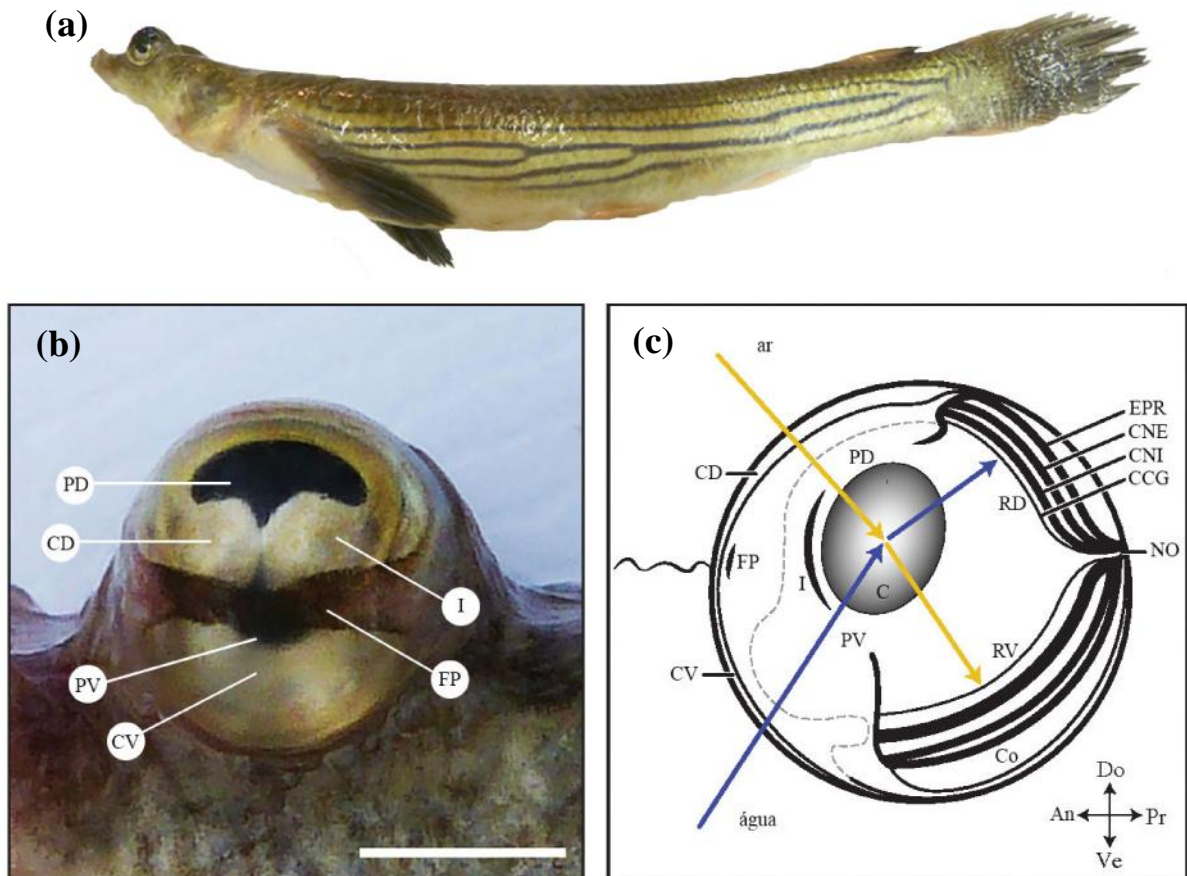


Figura 17 - Morfologia do olho de *Anableps anableps*. (a) Espécime de *A. anableps*. (b) O olho de *A. anableps*. As córneas dorsal e ventral e as pupilas são visíveis. (c) Esquema das entradas fóticas aéreas e aquáticas (visão sagital do olho). RPE, epitélio pigmentado da retina; CNE, camada nuclear externa; CNI, camada nuclear interna; CCG, camada de células ganglionares; NO, nervo óptico; RD, retina dorsal; PD, pupila dorsal; RV, retina ventral; PV, pupila ventral; Co, coróide; C, cristalino; I, íris; FP, faixa pigmentada; CD, córnea dorsal; CV, córnea ventral; Do, dorsal; Ve, ventral; Di, distal; Pr, proximal. Escala: 1 cm (a), 0,5 cm (b) (Adaptado de PEREZ et al, 2017).

2.3.2.1 *Anableps anableps*: ecologia e distribuição populacional da espécie

O gênero *Anableps* (Anablepidae: Cyprinodontiformes) abrange três espécies: *A. anableps* (Linnaeus, 1758), *A. dowi* Gill 1861, e *A. microlepis* Müller & Troschel, 1844. *A. dowi* é restrito ao oceano Pacífico, mas *A. anableps* e *A. microlepis* podem ser encontrados desde a América Central até ao norte da América do Sul (MILLER, 1979). Estes peixes epipelágicos são especialistas intertidais e podem ser encontrados em águas frescas, salobras ou mesmo oceânicas; dependendo da espécie e da situação individual, embora todos eles sejam principalmente peixes secundários de água doce (SCHWAB et al., 2001). Alimentam-se de insetos e pequenos crustáceos primariamente na linha fluvial de rios e estuários salobros onde habitam (OLIVEIRA et al., 2006; SCHWAB et al., 2001; SCHWASSMAN; KRUGER, 1965; WATANABE et al., 2014).

Anableps anableps ou “peixe de quatro olhos” é uma espécie que reside em habitats superficiais e costeiros (MILLER, 1979; OLIVEIRA et al., 2006). No Brasil, esta espécie é relatada em estuários dos estados Amapá, Pará, Maranhão e Piauí (Figura 18) (WATANABE et al., 2014). A espécie se reproduz o ano todo, tendo picos reprodutivos no inverno, quando a água está doce. Depois da primeira reprodução, uma nova fertilização ocorre em fêmeas com ovários recém esvaziados (NASCIMENTO; ASSUNÇÃO, 2008). Todo o ciclo biológico de *A. anableps* – reprodução, crescimento e alimentação- ocorre dentro de habitats estuarinos. A fertilização desta espécie é interna, ou seja os embriões permanecem na cavidade ovariana até o nascimento (CARVALHO-NETA; CASTRO, 2008; OLIVEIRA; FONTOURA; MONTAG, 2011; NASCIMENTO; ASSUNÇÃO, 2008; TURNER, 1938).

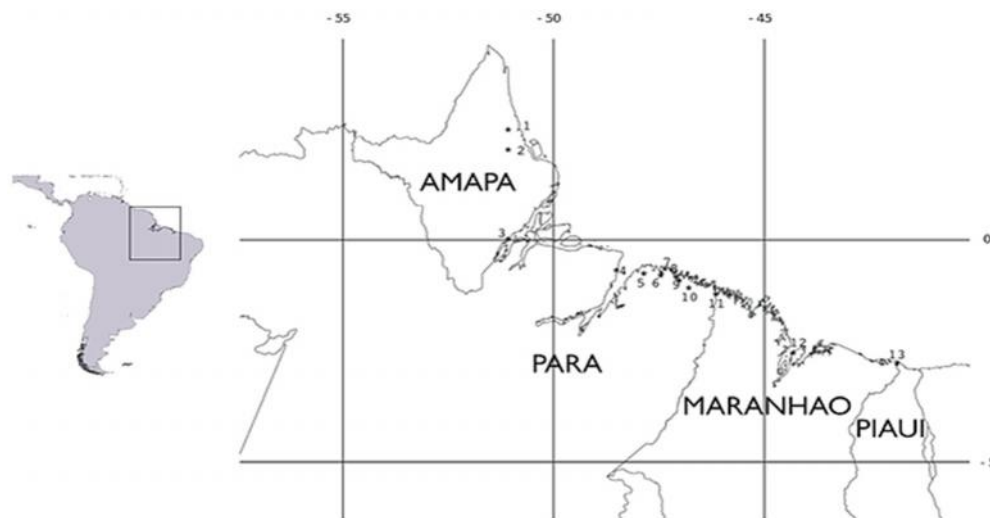


Figura 18 - Distribuição de *Anableps anableps* em estados de Brasil. Amapá, Pará e Maranhão são estados do Norte e Piauí do Nordeste do Brasil (Adaptado de WATANABE et al., 2014).

A descrição do desenvolvimento com base no processo de duplicação das estruturas do olho e morfometria do corpo e cabeça foi reportada em 2017 por nosso grupo (Figura 19) (PEREZ et al., 2017).

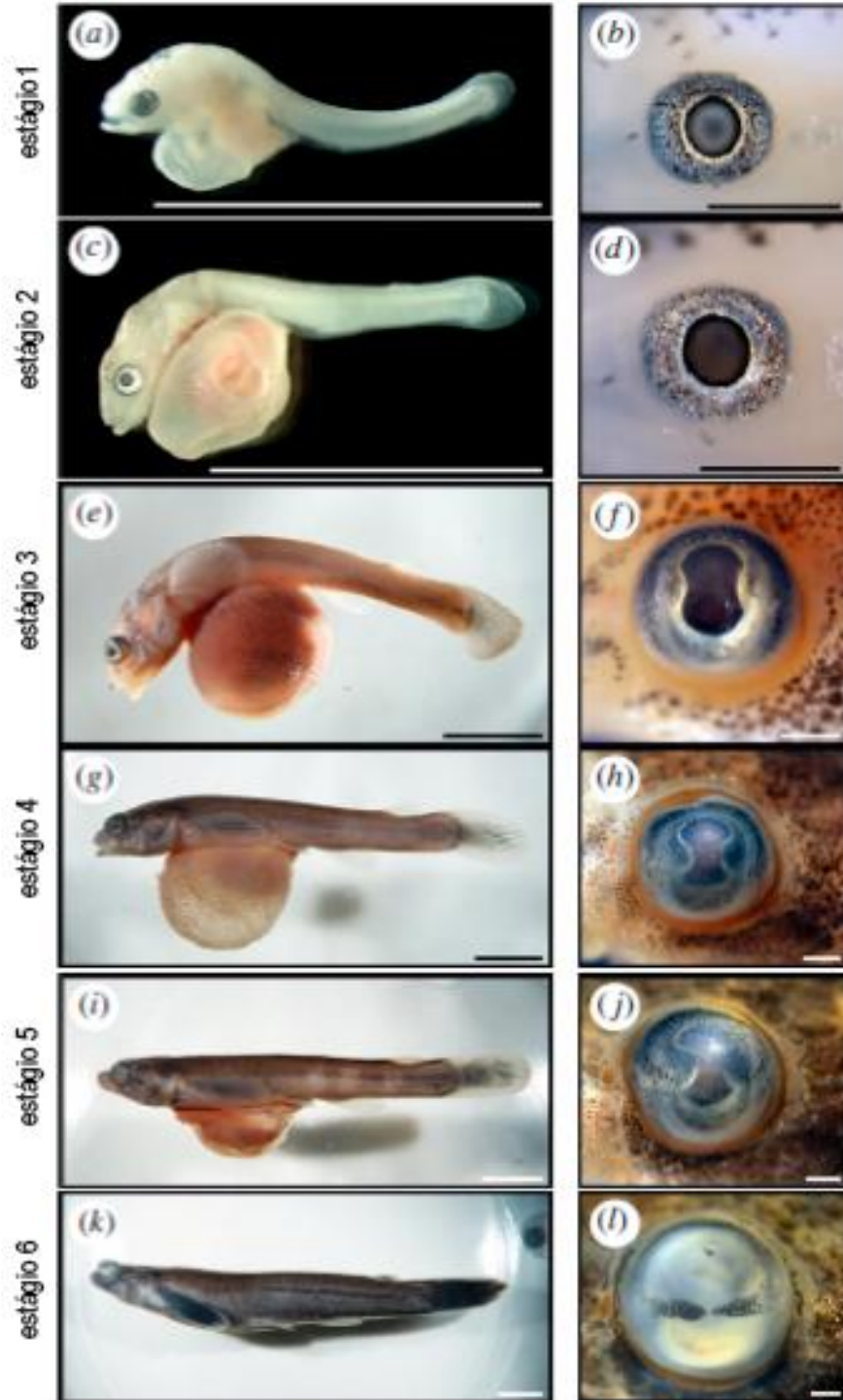


Figura 19 - Desenvolvimento dos olhos durante os estágios larvais de *Anableps anableps*. Larva no estágio 1 (a, b), estágio 2 (c, d), estágio 3 (e, f), estágio 4 (g, h), estágio 5 (i, j) e estágio 6 (k, l). Figuras a direita são imagens de ampliação maiores da região ocular. Escala: 5 mm (a, c, e, g, i, k), 500 μ m (b, d, f, h, j, l) (Adaptado de PEREZ et al., 2017).

2.3.2.2. *Anableps anableps*: caracterização morfológica e molecular dos olhos

A duplicação das estruturas do olho de *Anableps anableps* ocorre durante seu desenvolvimento larval. No estágio 3 se dá o início da duplicação da córnea e da pupila com o advento de uma constrição longitudinal da pupila (Figura 19, estágio 3), que avança até o estágio 6, onde a córnea e a pupila estão completamente duplicadas (Figura 19, estágio 6) (PEREZ et al., 2017).

O globo ocular de *A. anableps* apresenta projeções das faixas da íris (SCHWAB et al., 2001), e a faixa pigmentada (FP, Figura 17) que está presente horizontalmente através da córnea, ao longo da interface ar-água (SWAMYNATHAN et al., 2003). Estas estruturas poderiam prevenir a formação de imagem dupla resultante da refração da luz na linha da água (SCHWAB et al., 2001; SWAMYNATHAN et al., 2003).

Outra característica relacionada aos olhos de *A. anableps* é a presença do osso frontal expandido dorsalmente, que acomoda os olhos proeminentes (PEREZ et al., 2017). Trabalhos desenvolvidos na ontogenia do neurocrânio desta espécie mostram que o início da divisão transversal da pupila coincide com o início da expansão dorsolateral do osso frontal (Figura 19, estágio 3) sugerindo que alterações no neurocrânio e na morfologia do olho estão relacionadas ao desenvolvimento. Além disso, a ossificação do septo interorbital ajudaria a delimitar o espaço da cavidade separando os grandes olhos de *A. anableps* (PEREZ et al., 2017).

A córnea dorsal é mais espessa, plana, e contém 5 vezes mais glicogênio e maior porcentagem de gelsolina (proteína solúvel na água) que o epitélio ventral da córnea em *A. anableps*. Sugerindo restrições seletivas na especialização da córnea dorsal para a proteção da irradiação UV e desidratação no ar (SWAMYNATHAN et al., 2003).

A retina por sua vez exibe duplicação funcional (Figura 20a), sendo a retina ventral associada ao campo visual aéreo é mais espessa do que a retina dorsal. Vários trabalhos indicam que a retina ventral tem uma camada nuclear interna (CNI) mais ampla que a retina dorsal (BORWEIN; HOLLENBERG, 1973; SCHWAB et al., 2001). Trabalhos recentes desenvolvidos na retina de larvas no estágio 6 de desenvolvimento relatam que a CNI ventral (Figura 20c) é duas vezes mais espessa que a CNI dorsal (Figura 20b); e esta diferença também se correlaciona com a proliferação celular na zona marginal ciliar (CMZ) (PEREZ et al., 2017), região formadora das células da retina (FISCHER; BOSSE; EL-HODIRI, 2013); isso sugere que a atividade neurogênica e proliferativa pode ser maior na porção ventral da

retina durante o desenvolvimento (PEREZ et al., 2017). Possivelmente a presença destas estruturas na retina ventral contribui para a estimulação do campo visual aéreo.

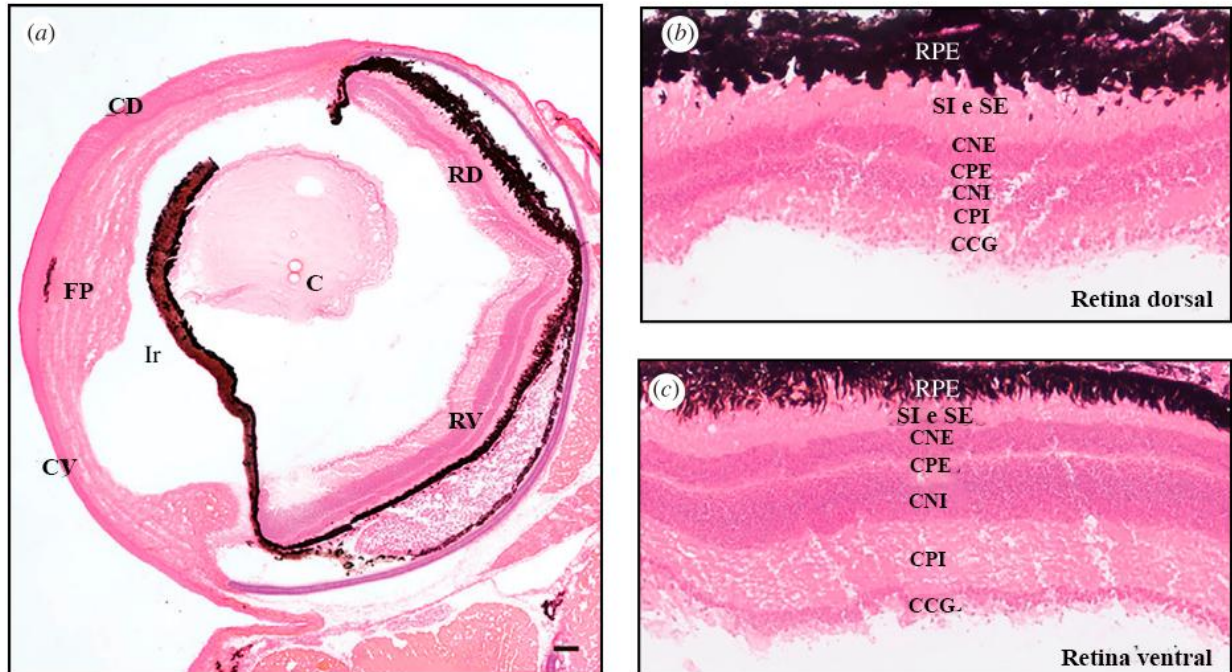


Figura 20 - Caracterização morfológica do olho de *Anableps anableps*, coloração por Hematoxilina e Eosina. (a) retina de *A. anableps* no estágio 6. (b) região dorsal da retina (c) região ventral. (b-c) A camada nuclear interna ventral (CNI) é duas vezes mais espessa que a CNI dorsal. RD, retina dorsal; RV, retina ventral; C, cristalino; Ir, íris; FP, faixa pigmentada; CD, córnea dorsal; CV, córnea ventral; RPE, epitélio pigmentado da retina; SI, segmento interno; SE, segmento externo, CNE, camada nuclear externo, CPE, camada plexiforme externo, CNI, camada nuclear interno; CPI, camada plexiforme interno; CCG, camada de células ganglionares. Escala: 200 μ m (Adaptado de PEREZ et al., 2017).

2.3.2.3. Repertório dos genes de opsinas em *Anableps anableps*

A. anableps apresenta um repertório de 10 genes de opsinas visuais (Tabela 3) (OWENS et al., 2009). Valores de sensibilidade máxima das opsinas visuais de *A. anableps* foram estimados usando os valores max das opsinas de cinco espécies filogeneticamente relacionada com *A. anableps* (Figura 21) (OWENS et al., 2012). Estudos por hibridização *in situ* em indivíduos adultos (Figura 21) mostraram expressão das opsinas *sws1*, *sws2a*, *sws2b*, e *rh2-2* ao longo de toda a retina, em contrapartida, as opsinas *rh2-1* e *lws* exibiram expressão gênica assimétrica estando presentes especialmente na retina ventral ou dorsal do olho, respectivamente (OWENS et al., 2012). Este padrão assimétrico de expressão sugere que a sensibilidade à comprimentos de ondas difere entre as regiões dorsal e ventral da retina

(SMITH et al., 2012). Entretanto, pelas análises qPCR (Figura 22a) e HIS (Figura 22b-k) esse padrão de expressão gênica assimétrico das opsinas *rh2-1* e *lws* também foi observado em espécimes larvais (estágio 6), indicando que a expressão assimétrica é estabelecida antes do nascimento, independente dos estímulos de luminosidade presente no habitat entre o ambiente aéreo e aquático (PEREZ et al., 2017).

Tabela 3. Repertório e medida de absorbância espectral para os genes das opsinas visuais de *Anableps anableps*

Nome de gene da opsina visual¹	Comprimento de onda (nm)²
<i>sws1</i>	356-365
<i>sws2a</i>	439-465
<i>sws2b</i>	405-425
<i>rh2-1</i>	492-539
<i>rh2-2</i>	452-472
<i>lws s180</i>	543-576
<i>lws s180</i>	
<i>lws s180</i>	
<i>lws s180</i>	
<i>rh1</i>	---

¹ Adaptado de OWENS et al., 2009.

² Adaptado de OWENS et al., 2012.

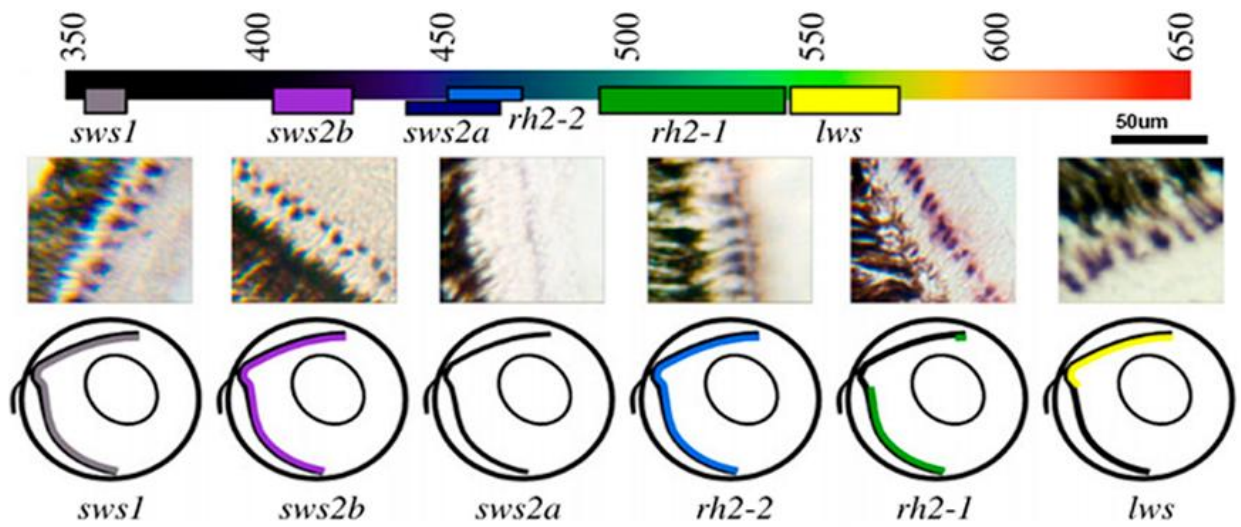


Figura 21 - Expressão assimétrica dos genes das opsinas visuais na retina de indivíduos adultos de *Anableps anableps*. A retina expressou, pelo HIS, seis genes de opsinas visuais, dos quais *rh2-1* e *lws* apresentaram uma expressão assimétrica. Escala: 50 μm (Adaptada de OWENS et al., 2012).

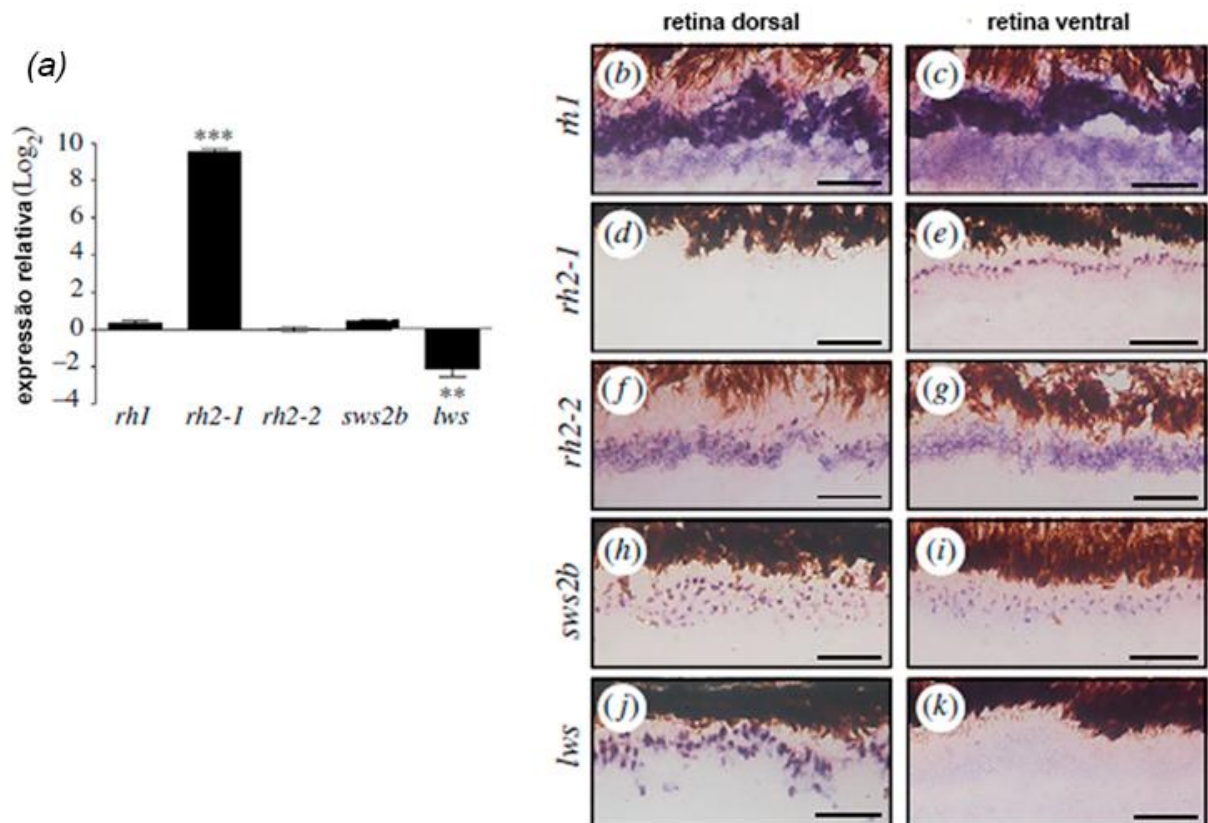


Figura 22 - Expressão assimétrica dos genes das opsinas visuais na retina de indivíduos larvais (estágio 6) de *Anableps anableps*. A retina de indivíduos larvais exibiu, pelas análises de qPCR (a) e hibridização *in situ* (b-k), cinco genes das opsinas visuais, dos quais os genes das opsinas *rh2-1* e *lws* apresentaram uma expressão assimétrica. Escala: 50 μm (Adaptado de PEREZ et al., 2017).

Opsinas não visuais apresentam também assimetria de expressão gênica ao longo da retina de *Anableps anableps* (Figura 23). Esta caracterização do padrão de expressão destes genes do grupo das melanopsinas, fornece informações essenciais para o início de análises que visam o entendimento da expressão destes genes e como eles possam contribuir no processo visual em *A. anableps*, uma espécie que recebe estímulos de dois ambientes diferentes de forma simultânea (ARAUJO, 2018).

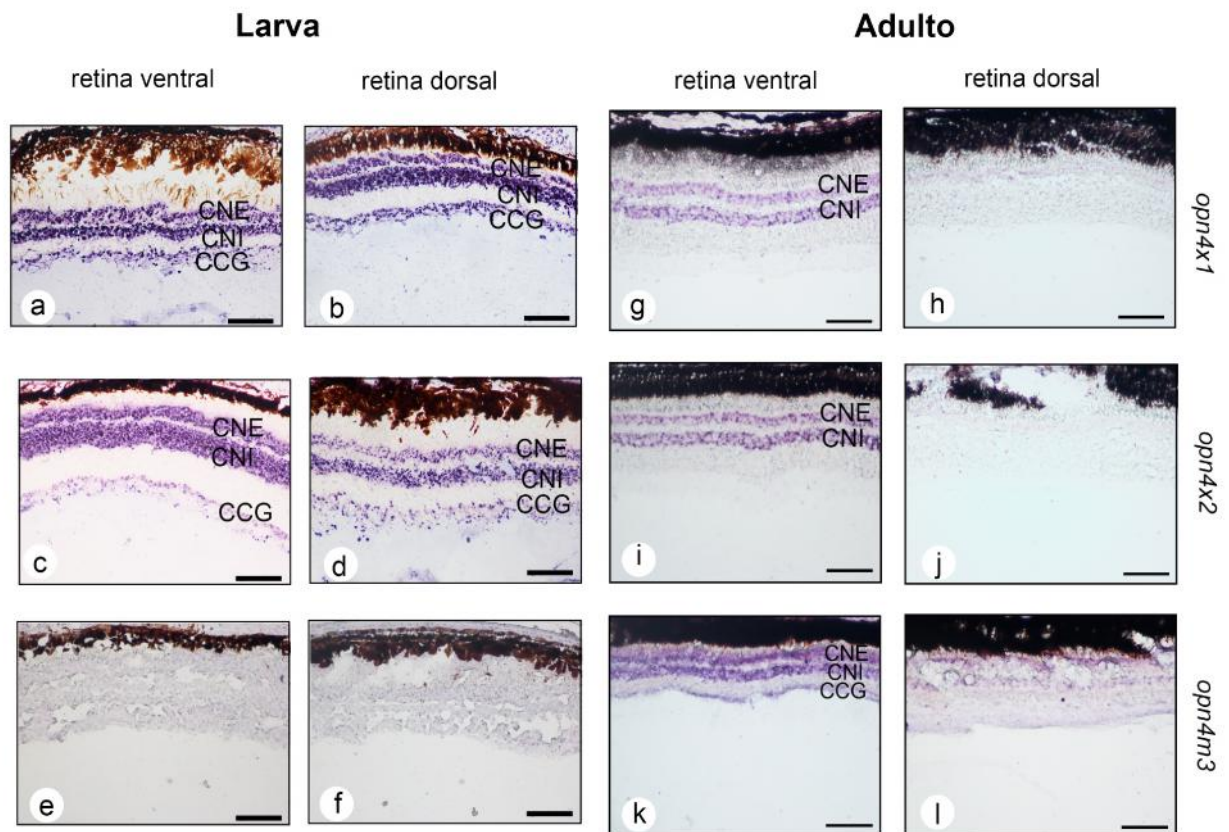


Figura 23 - Expressão assimétrica dos genes das melanopsinas na retina de *Anableps anableps*. A retina de *A. anableps* expressou, pelas análises de HIS, os genes das opsinas *opn4x1*, *opn4x2* e *opn4m3* na CNE, CNI e CCG dos indivíduos larvais (a - f) e adultos (g - l) CNE: camada nuclear externa; CNI: camada nuclear interna; CCG: camada das células ganglionares. Escala: 0,5 mm. (Adaptado do ARAUJO, 2018).

O objetivo deste capítulo visa identificar, através da análise da RNA-Seq e hibridização *in situ*, o padrão de expressão das opsinas não visuais tipos C e grupo Gr4 na retina de larvas e adultos de *Anableps anableps* e que podem ter relação com as adaptações visuais em *A. anableps*.

2.4. OBJETIVOS

2.4.1. Objetivo Geral

Analisar o padrão de expressão gênica de opsinas não visuais na retina de larvas e adultos de *Anableps anableps*.

2.4.2. Objetivos Específicos

- I. Identificar o repertório dos genes de opsinas não visuais no transcriptoma do olho de *A. anableps*;
- II. Identificar, pela análise comparativa, os padrões conservados nas sequências codificantes da proteína das opsinas não visuais de tipo C e grupo Gr4;
- III. Analisar o padrão de expressão dos genes das opsinas não visuais na retina de *A. anableps* através de hibridização *in situ*.

2.5. MATERIAIS E MÉTODOS

2.5.1. Coleta de espécimes

Vinte e cinco indivíduos de *Anableps anableps* foram coletados no Furo da Ostra, em Bragança, Pará, Brasil (Figura 24A), utilizando-se redes de arrasto (40mm x 40mm) (Figura 24B). Para este estudo foram utilizadas larvas (estágio 5) e adultos de *A. anableps*. Os animais foram transportados em recipientes com oxigênio dissolvido na água até o Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Estudos Costeiros-UFPA (campus Bragança) onde os espécimes foram processados seguindo os procedimentos de rotina do laboratório.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios de cuidado e uso de animais adotados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Pará, UFPA (Número de protocolo: 037-2015).

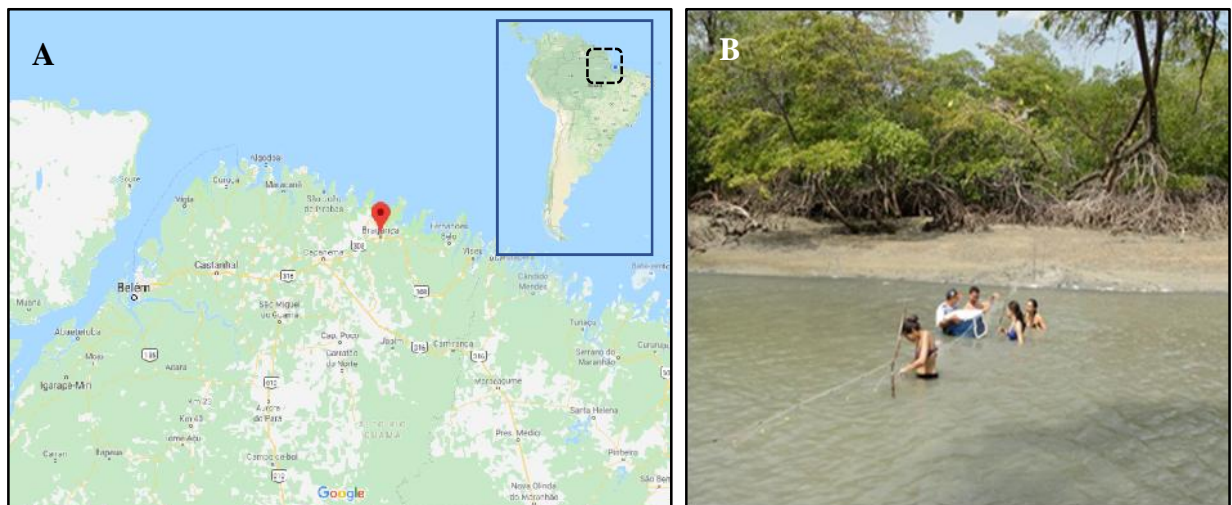


Figura 24 - Coleta de *Anableps anableps*. (A) Mapa da região de coleta no município de Bragança, Pará, Brasil (@google maps). (B) Coleta de *A. anableps* sendo realizada com rede de arrasto.

2.5.2. Preparo de biblioteca e sequenciamento no Illumina

Os olhos de *Anableps anableps* em três estágios de desenvolvimento larval (antes, durante e após a duplicação de córneas e pupilas) foram coletados e agrupados em *pools* de aproximadamente 20 olhos por estágio, em RNAlater (Sigma-Aldrich) e mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para extração de RNA. O RNA total foi obtido utilizando o reagente TRIzol (Life

Technologies) de acordo com o protocolo do fabricante. Esta amostra de RNA dos três estágios (Figura 25) foi utilizada na confecção de bibliotecas e sequenciamento de RNA (RNA-Seq). O sequenciamento foi realizado através da plataforma HiSeq Illumina.

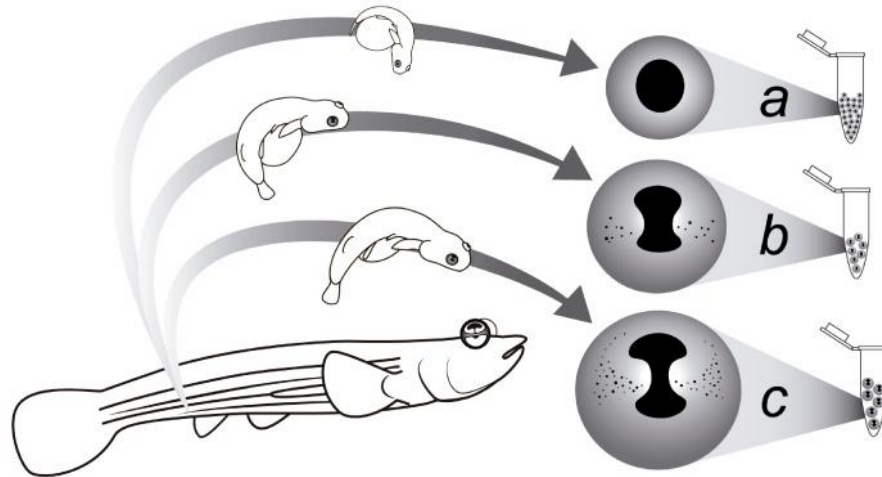


Figura 25 - Desenho esquemático da coleta de olhos de indivíduos larvais de *Anableps anableps*. (a) olhos de larvas em estágio inicial do desenvolvimento (antes do início da duplicação de estruturas oculares). (b) olhos de larvas durante a duplicação de córnea e pupilas. (c) olhos de larvas após a duplicação de córneas e pupilas, embora antes do nascimento (Cedido por JAMILE DE LIMA, 2019).

2.5.3. Montagem do transcriptoma

A montagem de supercontigs foi realizada juntando os contigs dos três RNA-Seq (Figura 25) usando a ferramenta de montagem Trinity e parâmetros padrões do programa (HAAS et al., 2013). Para a remoção de transcritos redundantes, um passo adicional de agrupamentos foi realizado usando CD-hit-Est com *cut-off* de 98% de identidade de sequências (FU et al., 2012).

2.5.4. Busca por genes e análise filogenética

A busca das sequências dos genes das opsinas não visuais no transcriptoma de *Anableps anableps* foi feita utilizando o tBlastx (ALTSCHUL et al., 1997) com e-value de e^{-5} (MENG et al., 2013a; ZHANG et al., 2012) e representantes ortólogos de zebrafish (*Danio rerio*) (número de acesso no GenBank: KT008391:KT008432[pacc]). Posteriormente, estas

sequências obtidas foram analisadas na plataforma de TransDecoder 2.1.0 (*Find Coding Regions Within Transcripts*) e através desta análise obteve-se regiões codificantes candidatas.

Para as análises filogenéticas, as sequências de aminoácidos deduzidas foram alinhadas manualmente e utilizando o Programa CLUSTAL (THOMPSON et al., 1997) no BioEdit (HALL, 1999). As sequências de opsinas foram alinhadas com representantes ortólogos de zebrafish (número de acesso no GenBank: KT008391:KT008432[pacc]), e foram excluídos os terminais variáveis C e N (C-terminal ou carboxi-terminal e N-terminal ou amino-terminal) das sequências de aminoácidos. As árvores filogenéticas foram construídas usando o método de Neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987), no programa MEGA versão 6 (TAMURA et al., 2013) e aplicando o modelo algoritmo Jones-Taylor-Thornton, JTT (JONES; TAYLOR; THORNTON, 1992) com valores de *bootstrap* baseados em 1000 iterações (FELSENSTEIN, 1985) para avaliar o grau de suporte da ramificação interna (expressado em porcentagem). A árvore filogenética das opsinas não visuais de *A. anableps* foi editada com a ferramenta *on-line* ITOL (*Interactive tree of life*) (LETUNIC; BORK, 2016).

2.5.5. Identificação dos típicos motivos de aminoácidos nas sequências codificantes das opsinas não visuais de tipo C e grupo Gr4

Para a identificação de padrões conservados (motivos, *motifs*) nas sequências codificantes da proteína das opsinas não visuais de tipo C e grupo Gr4, as sequências codificantes foram alinhadas com seus ortólogos de zebrafish (número de acesso no GenBank: KT008391:KT008432[pacc]). Desta mesma maneira, foram alinhadas com a rodopsina bovina (*rho*) (número de acesso no GenBank: NP_001014890.1) para fornecer uma referência para as posições de aminoácidos nas opsinas. Assim mesmo, os motivos são codificados por cores para destacar a conservação da sequência de aminoácidos.

2.5.6. Preparação de cortes histológicos para hibridização *in situ*

No caso de estágio larvais, as fêmeas grávidas foram sacrificadas usando MS-222 (*Tricaine*, Sigma) seguida de decapitação. Os ovários foram explantados sob um microscópio de dissecação e as larvas foram coletadas. A identificação dos estágios de desenvolvimento

larval de *A. anableps* foi baseada em Perez *et al.* (2017). Em seguida, as cabeças das larvas foram congeladas em meio de *Tissue-Tek OCT (Optimum Cutting Temperature, Sakura)*. Enquanto que os indivíduos adultos foram anestesiados na solução de óleo de cravo (43,94 mg/L), somente os olhos foram removidos e incorporados em meio de *Tissue-Tek OCT (Sakura)*. Todas as amostras incorporadas em *Tissue-tek OCT (Sakura)* foram armazenados a -80°C. Secções sagitais de 20 µm foram obtidas com o criostato Leica CM 1850 UV, por meio das coletas realizadas em lâminas de *ColorFrost Plus Microscope (Thermo)*. Em seguida, as seções de tecido da cabeça dos espécimes larvais e dos olhos de indivíduos adultos foram fixadas em 3% paraformaldeído, e armazenados à -80 °C, até serem utilizadas na HIS. Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica e técnica.

2.5.7. Hibridização *in situ* (HIS)

As sequências para sondas das opsinas não visuais *rgr2* e *tmt3b* foram sintetizadas em *pBlueScript II SK (+)* pelo BioCat GmbH (Heidelberg, Germany), com promotores T7 e T3 flanqueando cada sequência. Além disso, houve a extração de RNA, síntese de cDNA e clonagem em *pCRII-TOPO* (Invitrogen) para as opsinas não visuais *opn5*, *tmt1b*, e *parapinopsina-2*. A extração de RNA total de tecido do olho foi realizada com *TRizol* (Invitrogen) e a purificação com o *Mini kit RNeasy* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Para a síntese de cDNA, foi usado o kit de *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix*, seguindo o protocolo do fabricante (Invitrogen). O produto de PCR foi clonado com *pCRII-TOPO*. A Miniprep foi realizada com o *kit Miniprep* (Qiagen).

Sondas *antisense* de RNA com sequências complementar aos genes de interesse foram sintetizadas usando RNA polimerase T7 ou T3 e *DIG-labeling mix* (marcador digoxigenina-dUTP) (Roche). A síntese de cada sonda de RNA foi feita em volume de 20 µL (0.5 µL de inibidor de *RNAse*, 2 µL de DTT, 2 µL de DIG, 2 µL de 10x tampão, 5 µL de produto da PCR, 2 µL da RNA polimerase, e 6.5 µL de água livre de nucleasas). As reações foram deixadas por 3 horas em banho maria à 37°C, em seguida foi adicionada 1uL de *Turbo DNase* e permaneceu à 37°C por mais 15 minutos. Depois, 30uL de água livre de nucleasas e 30uL de cloreto de lítio foram adicionados e a reação estocada à -20°C por 48 horas. As amostras foram então centrifugação à 4°C por 30 min, e o pellet ressuspendido em 30 uL de água livre de endonucleases. A concentração da sonda foi obtida por nanodrop e eletroforese. As sondas foram mantidas a -80°C até serem utilizadas na HIS.

Para a técnica de hibridização *in situ* foi utilizado o protocolo padrão (DE LIMA et al., 2015) com modificações e em triplicata técnica e biológica. Os cortes histológicos foram incubados na solução dietilpirocarbonato-anidrido acético, depois lavados com 2X SSPE, e submetidos a lavagens graduais de a 75%, 95% e 100% etanol livre de RNase. Em seguida a sonda (na solução de hibridização) foi adicionada e a hibridização ocorreu um dia para outro a 65 °C. No dia seguinte, os cortes foram lavados múltiplas vezes com clorofórmio e 2X SSPE. Pós-hibridização, os cortes foram lavados com soluções de 2X SSPE (50% formamida) e 0.1XSSPE. Logo depois com a solução TNT (1M Tris, pH=7,5, 5M NaCl, Triton X-100, água DEPC). Incubação com o anticorpo para digoxigenina (na solução TNB) a 4°C durante 12 horas. Depois as lâminas foram lavadas em TMN e incubadas, e a reação cromogênica feita com *nitro-blue tetrazolium chloride* (NBT) e *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate p-toluidine salt* (BCIP). As lâminas foram fixadas com 4% de PFA. Finalmente, o *coverslipping* foi feito com *Cytoseal TM60*. As fotografias foram registradas com uma câmera digital Nikon Digital Sight DS-Ri1/K12887 acoplada ao Estereomicroscópio Nikon Modelo C-DSD115, usando o aplicativo *NIS Elements D 4.10.01* para aquisição de imagens.

2.6. RESULTADOS

Para a identificação de genes de opsina não visuais no transcriptoma do olho de *A. anableps*, foram utilizados os genes ortólogos de zebrafish. As sequências codificantes destes transcritos foram alinhadas com os seus ortólogos do zebrafish em BioEdit, e padrões conservados (*motifs*) de aminoácidos foram inferidos para cada tipo de opsina não visual. Estudos por hibridização *in situ* mostraram expressão assimétrica destas opsinas não visuais na retina de indivíduos larvais e adultos.

2.6.1. A análise estatística da montagem do transcriptoma

A montagem do transcriptoma de *A. anableps*, exibiu um total de 253,750 sequências, com um comprimento da sequência de 2,096, e um % CG de 45.06% (Tabela 4).

Tabela 4. A análise estatística da montagem do transcriptoma*

Codificação	Illumina NEXSeq 500
Total de sequências	253,750
Comprimento de sequências:	2,096
% GC	45.06

* Prof. Dr. Sylvain Darnet (ICB-UFPA).

2.6.2. Um repertório diversificado dos genes das opsinas não visuais no transcriptoma do olho de *Anableps anableps*

No transcriptoma do olho de *Anableps anableps* foram identificados um repertório de 20 genes de opsinas não visuais (Tabela 5), cuja relação evolutiva foi confirmada com a construção da árvore filogenética (Figura 26). Estes foram um gene da opsina *va-1*, um gene da *parapinopsina-2*, um gene da opsina *opn3*, um gene da opsina *tmt1b*, dois genes da opsina *tmt3* (*tmt3a* e *tmt3b*), três de genes da opsina *opn4m* (*opn4m1*, *opn4m2* e *opn4m3*), dois de genes da opsina *opn4x* (*opn4x1* e *opn4x2*), um gene da opsina *opn5*, dois genes da opsina *pn6a* (*opn6a1* e *opn6a2*), dois genes da opsina *opn7* (*opn7b* e *opn7b-c*), um gene da opsina *opn8*, um gene da peropsina (*rrh*) e dois genes da opsina *rgr* (*rgr1* e *rgr2*).

Tabela 5. Repertório dos genes das opsinas não visuais no transcriptoma do olho de *Anableps anableps*

Nome da opsina	Nome de gene da opsina	Número de gene
Opsina tmt	<i>tmt1b</i>	1
	<i>tmt3a</i>	1
	<i>tmt3b</i>	1
Encefalopsina	<i>opn3</i>	1
Neuroopsina	<i>opn5</i>	1
Opsina opn6	<i>opn6a1</i>	1
	<i>opn6a2</i>	1
Opsina opn7	<i>opn7b</i>	1
	<i>opn7c-d</i>	1
Opsina opn8	<i>opn8b</i>	1
Peropsina	<i>rrh</i>	1
Opsina rgr	<i>rgr1</i>	1
	<i>rgr2</i>	1
Opsina va	<i>va-1</i>	1
Parapinopsina	<i>parapinopsina-2</i>	1
Melanopsina	<i>opn4m1</i>	1
	<i>opn4m2</i>	1
	<i>opn4m3</i>	1
	<i>opn4x1</i>	1
	<i>opn4x2</i>	1
Total		20

Todas as sequências das opsinas não visuais (ONV) de *A. anableps* foram alinhadas com representantes dos genes ortólogos de zebrafish, e foram excluídos os terminais variáveis C e N. As sequências codificantes das opsinas foram de 287 a 4922 pb de comprimento. A opsina *tmt3a* apresentou um transcrito curto, devido a códon de parada prematura. Finalmente, estas sequências foram empregadas para gerar a árvore filogenética das opsinas não visuais no programa MEGA 6, e foi editada com a ferramenta *on-line Itol* (Figura 26).

As sequências de cada ONV formaram grupos monofiléticos bem suportados, com altos valores nos nós no teste de *bootstrap* (1000 iterações). As relações entre cada grupo de ONV foi consistente com os seus ortólogos de zebrafish. As diferentes opsinas não visuais de *A. anableps* obtidas pertencem à tipo C, tipo R e opsina Gr4, respectivamente (Figura 26). Este trabalho de pesquisa compreende opsinas do grupo C e Gr4.

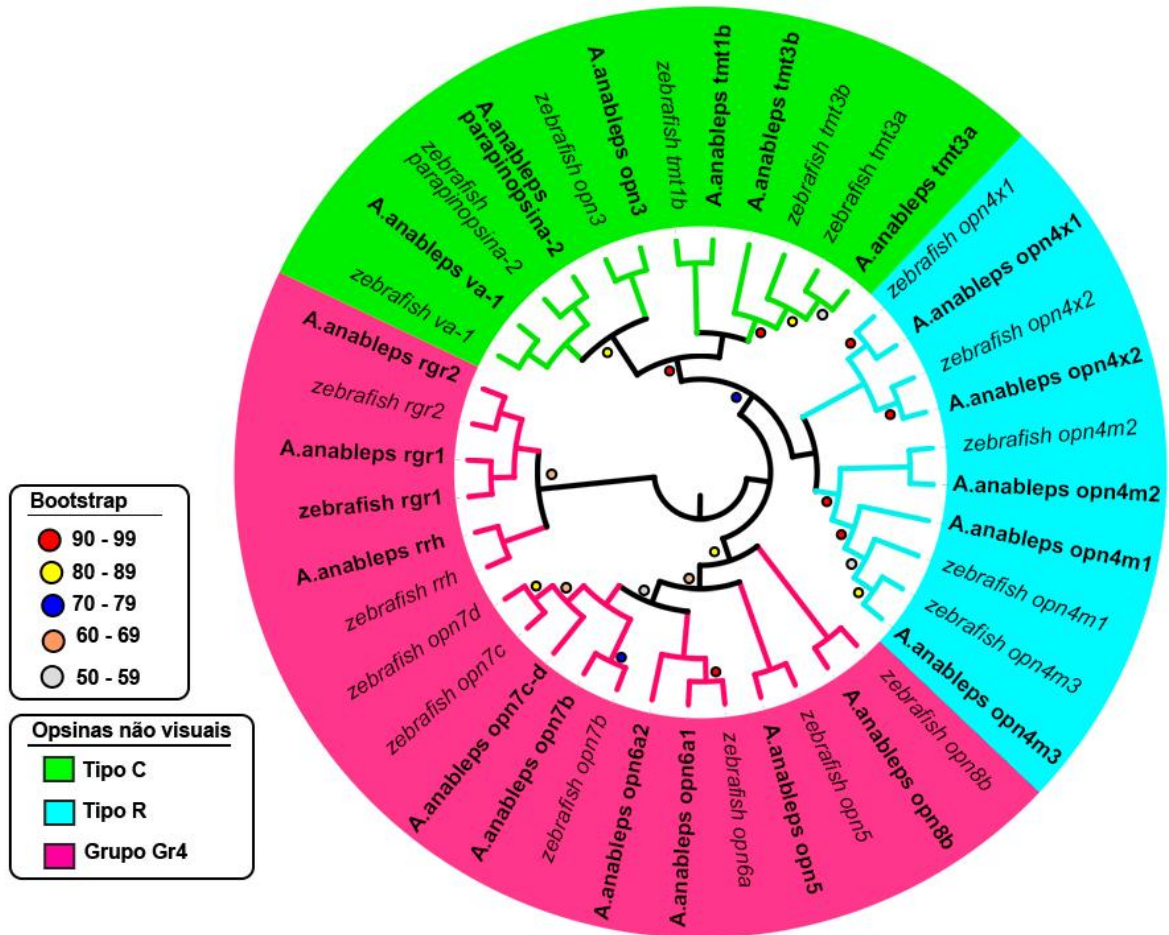


Figura 26 - Árvore filogenética das três classes de opsinas não visuais de *Anableps anableps*. Porcentagens de *bootstrap* menores a 99% são mostradas e estão baseadas em 1000 iterações. A árvore foi editada utilizando *ItoI* (LENIC et al., 2016) e não está editada a escala.

2.6.3. Típicos motivos de aminoácidos nas seqüências codificantes da proteína das opsinas tipo C e Grupo 4

As seqüências codificantes da proteína das opsinas foram analisadas e identificaram padrões conservados (motivos) para as opsinas não visuais, tipo C e Grupo 4. Se observaram que opsinas não visuais, tipo C e grupo Gr4, apresentaram motivos de aminoácidos comuns da opsina visual rodopsina bovina (a rodopsina foi referência para determinar as posições dos aminoácidos) nas posições C110, C187 e K296 (Figura 27). O par de resíduos de aminoácidos cisteínas (C) na posição C110 e C187 (no primeiro e segunda alças extracelular, E1 e E2) são requeridos para a estabilidade conformacional da proteína (KARNIK et al., 1988), enquanto que o resíduo da lisina (K) na posição K296, onde liga-se o cromóforo retinal (BOWNDS, 1967), é importante para a absorção da luz (TERAKITA, 2005). Assim mesmos, foram identificados motivos típicos na posição 113, o motivo de tripeptídeo (134-136), na posição

181, na posição 185 e nas posições (302-313) entre as opsinas não visuais do tipo C e grupo Gr4.

As opsinas não visuais do tipo C. O motivo tripeptido, (E/D)**R**(F/M/Y), na posição 134-136, é altamente conservado entre as opsinas tipo C (Figura 27). Da mesma forma, outros motivos típicos foram identificados dentro das famílias das opsinas tipo C. Na posição 113, as opsinas *va1* e *parapinopsina2* mantem o resíduo de glutamato (E113) igual que a opsina visual (rho), mas este é substituído pelo aspartato nas opsinas *opn3* (D113) ou tirosina (Y113) nas opsinas *tmt* (*tmt1b* e *tmt3b*). Na posição 181, o glutamato é comum entre as opsinas *opn3*, *parapinopsina2* e *tmt3b* com a opsina visual (rho), mas está substituído pelo serina (S181) na opsina *va1* e pela cisteína (C181) na opsina *tmt1b*. Na posição 185, a cisteína (C185) presente na opsina visual é substituído pela treonina (T185) nas opsinas *va1*, *parapinopsina2*, *tmt1b* e *tmt3b*, ou pelo resíduo de aminoácidos leucina (L185) na opsina *opn3* (Figura 27). Nas posições 302-313, o motivo conservado [NPxIY(x)₆F] (x= qualquer aminoácido, veja-se Figura 27) entre as opsinas tipo C. Com base nesses resultados, opsinas não visuais do tipo C apresentam padrões conservados (motivos) de aminoácidos em suas sequencias codificantes.

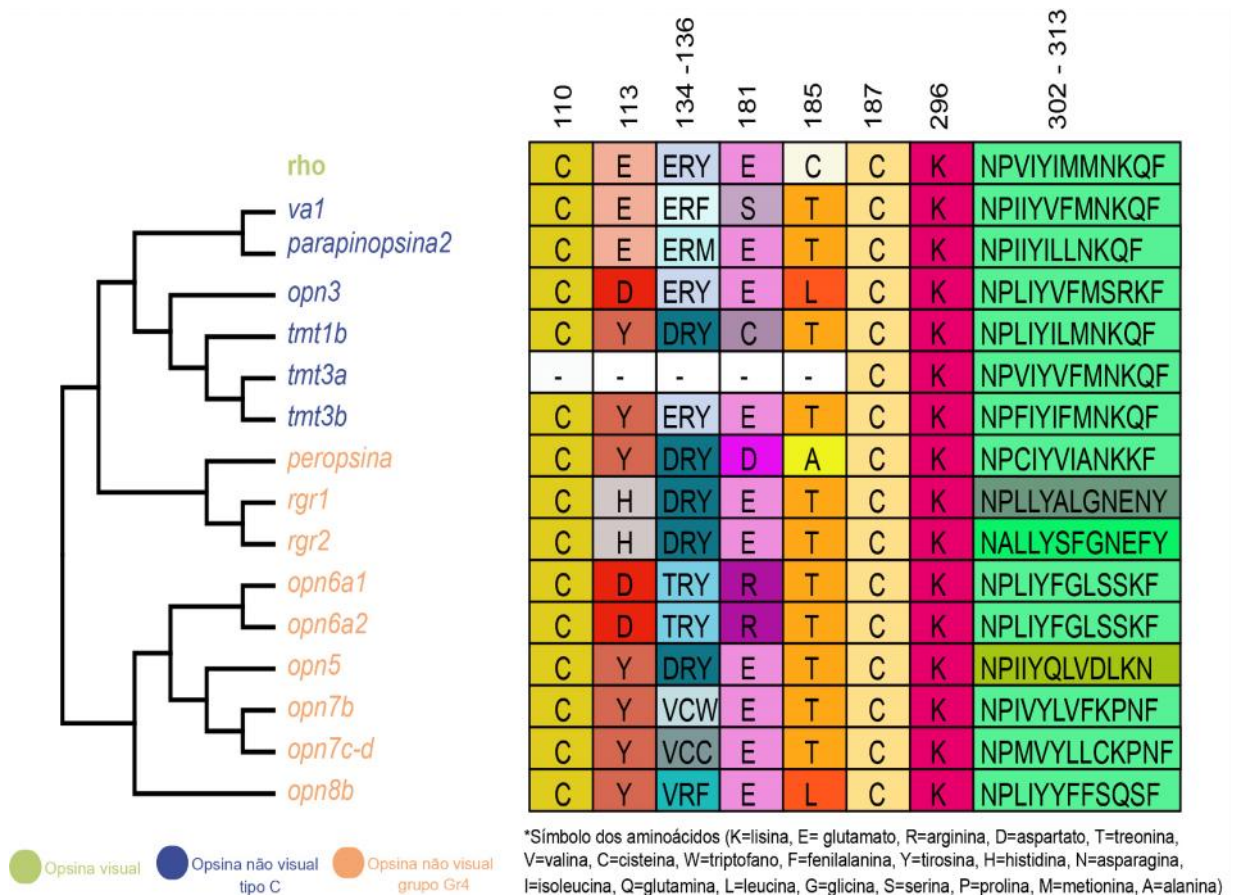


Figura 27 - Caracterização das opsinas não visuais de *Anableps anableps*. Painel esquerdo: diagrama esquemático mostra a relação filogenética dos tipos de opsinas não visual tipo C (azul) e grupo Gr4 (laranja). Painel direito: tabela mostra motivos associados à estrutura e função nas opsinas. Os motivos são codificados por cores para destacar a conservação da sequência de aminoácidos. A opsina visual rodopsina bovina rho foi incluído para fornecer uma referência para as posições dos aminoácidos.

As opsinas não visuais do grupo Gr4. Os motivos tripeptidos, (T/D)RY, VC(W/C) e VRF, na posição 134-136, são conservadas entre e as famílias das opsinas não visuais do grupo Gr4 (Figura 27). Da mesma forma, outros motivos típicos foram identificados dentro das famílias das opsinas do grupo Gr4. Na posição 113, as opsinas peropsina, *opn5*, *opn7b*, *opn7c-d* e *opn8b* apresentam o resíduo de tirosina (Y113) em vez do glutamato (E113) característico nas opsinas visuais (*rh1*) (Figura 27). Na posição 181, o glutamato é comum entre as opsinas *rgr* (*rgr1* e *rgr2*), *opn5*, *opn7b*, *opn7c-d* e *opn8b* com as opsinas visuais (*rh1*), mas está substituído pelo aspartato (D181) na peropsina e pela arginina (R181) na opsina *opn6a* (*opn6a1* e *opn6a2*). Na posição 185, a cisteína (C185) presente na opsina visual é substituído pela treonina (T185) nas opsinas *rgr* (*rgr1* e *rgr2*), *opn6a* (*opn6a1* e *opn6a2*), *opn5*, *opn7b*, *opn7c-d*, e *opn8b*, mas está substituído alanina na peropsina (A185) e pela leucina (L185) na *opn8b* (Figura 27). O motivo na posição 302-313, é mais diversos que nas opsina tipo C, sendo [NPxIY(x)₆F], [NPxxY(x)₆F], [NPxxY(x)₅NY], [NPxxY(x)₅KN], e [NAxxY(x)₅FY] (x= qualquer aminoácido, veja-se Figura 27) entre as famílias deste tipo de opsina Gr4. Com base nesses resultados, opsinas não visuais do grupo Gr4 apresentam padrões conservados (motivos) de aminoácidos em suas sequencias codificantes.

2.6.4. Expressão assimétrica dos genes das opsinas não visuais na retina de *A. anableps*

Para a análise da hibridização *in situ*, trabalhamos com os genes das opsinas não visuais *tmt1b*, *tmt3b*, *opn5*, *parapinopsina-2* e *rgr2*. Isto foi devido a uma expressão assimétrica destes genes pelo qPCR, relatados em populações anteriores de *A. anableps* pelo nosso grupo de pesquisa. Assim mesmo, esses genes também foram expressos, através de HIS, nesta população de estudo de *A. anableps*, mas sua expressão foi diferente da relatada em qPCR, e será detalhada abaixo.

Os genes das opsinas não visuais *tmt1b*, *tmt3b* e *rgr2*, através da hibridização *in situ*, foram expressos na retina de larvas (estágio 5) de *A. anableps*. Nessa fase do desenvolvimento, os indivíduos são protegidos de estímulos de luz ambiental dentro do sistema reprodutivo das fêmeas, até o nascimento. Nossos resultados de hibridização *in situ* mostraram que os genes das opsinas *tmt1b* e *tmt3b* foram expressas na retina dorsal (RD) e ventral (RV) de *A. anableps* (Figura 28). Enquanto o gene da opsina *rgr2* foi expressa apenas na retina dorsal. Isto é, o gene *rgr2* apresentou uma expressão assimétrica na retina de *A.*

anableps (Figura 28). Esta descrição é inédita para esta espécie, e o motivo da assimetria de expressão destes genes permanece obscuro.

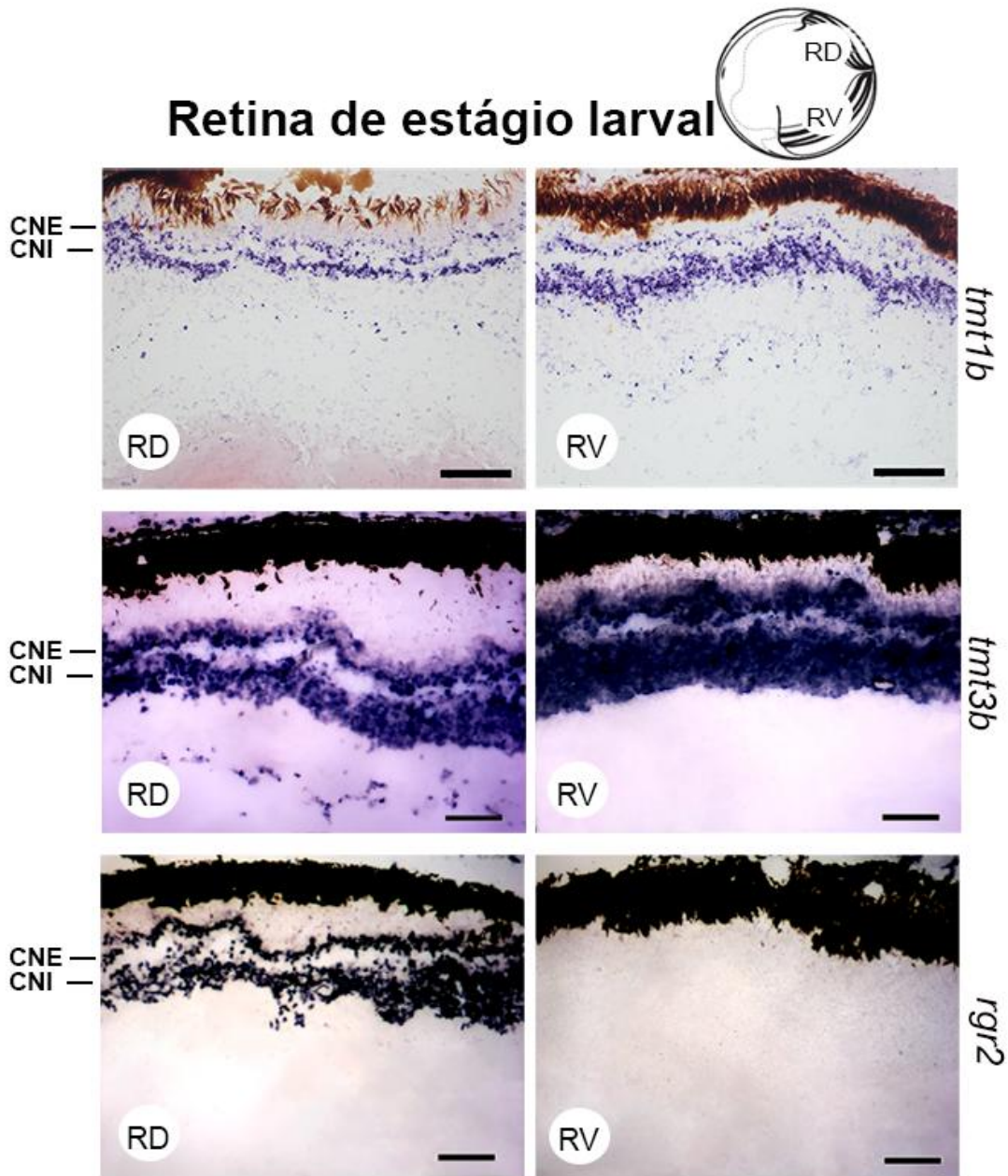


Figura 28 - Distribuição da expressão dos genes das opsinas não visuais *tmt1b*, *tmt3b* e *rgr2* na retina da larva (estágio 5) de *Anableps anableps*. Pela hibridização *in situ* os genes das opsinas *tmt1b* e *tmt3b* estão expressas na retina dorsal (RD) e ventral (RV) das camadas nuclear externa (CNE) e camada nuclear interna (CNI). Enquanto o gene *rgr2* é expressa apenas na RD das camadas CNE e CNI. Criosecções: 20 μ m de espessura. Escala: 150 μ m.

No caso da retina de **indivíduos adultos**, foram avaliadas pela hibridização *in situ* a expressão dos genes das opsinas não visuais *tmt1b*, *tmt3b*, *parapinopsina-2*, *opn5* e *rgr2*. Neste estágio, os indivíduos estão em seu habitat natural e interagem com os estímulos da luz ambiente. Os resultados da hibridização *in situ* mostraram que os cinco genes das opsinas não

visuais (*tmt1b*, *tmt3b*, *parapinopsina-2*, *opn5* e *rgr2*) apresentaram expressão exclusivamente na CNE e CNI da retina ventral de *A. anableps* (Figura 29).

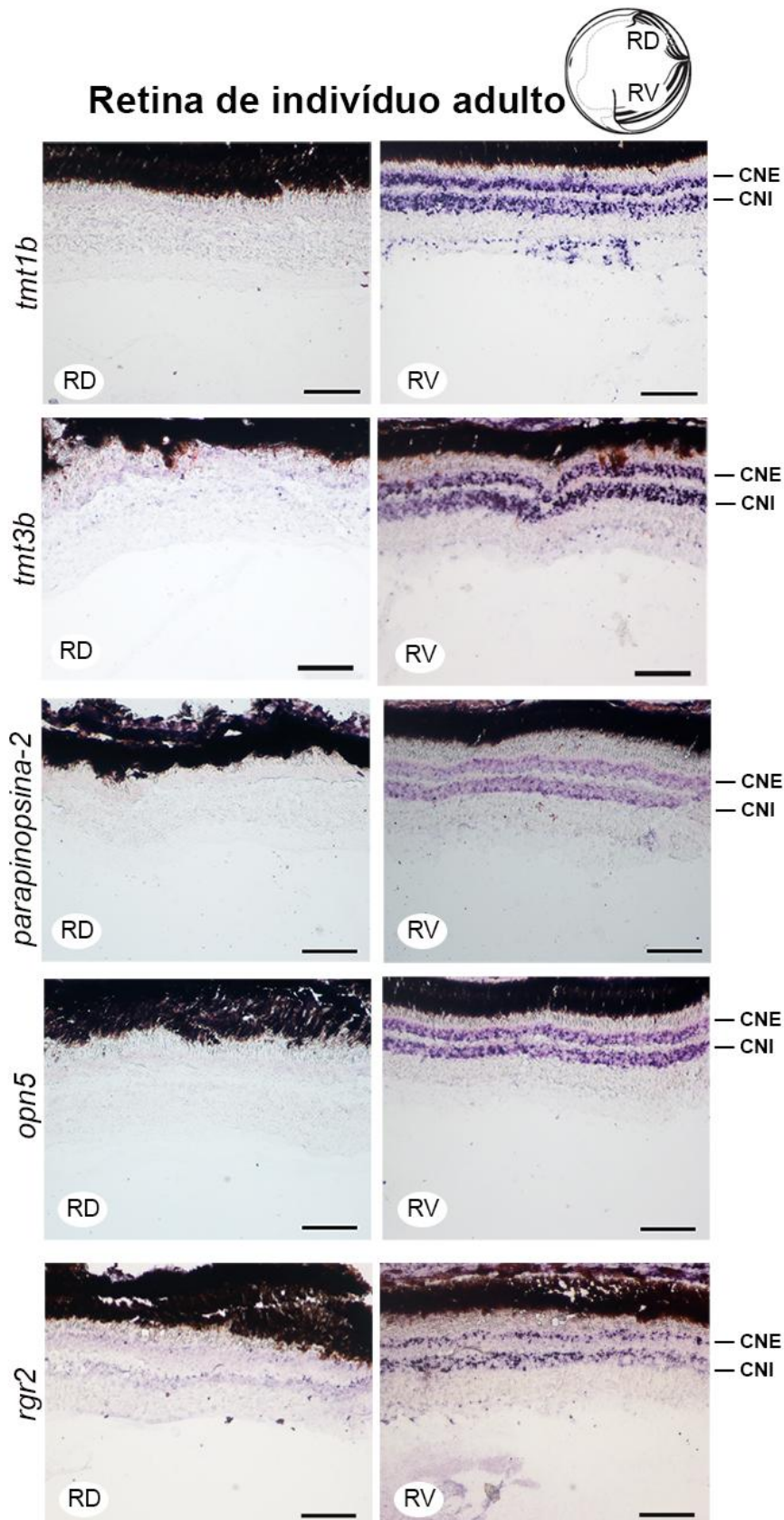


Figura 29 - Distribuição da expressão dos genes das opsinas não visuais *tmt1b*, *tmt3b*, *parapinopsina-2*, *opn5* e *rgr2* na retina de adultos de *Anableps anableps*. Hibridização *in situ* mostrou que os genes das opsinas *tmt1b*, *tmt3b*, *parapinopsina-2*, *opn5* e *rgr2* são expressas só na retina ventral (RV) das camadas nuclear externa (CNE) e camada nuclear interna (CNI). Criosecções: 20µm de espessura. Escala: 100 µm.

Por outro lado, através da hibridização *in situ* em tecidos da retina de larvas e adultos, mudanças temporais da expressão dos genes *tmt1b*, *tmt3b* e *rgr2* foram observadas ao longo da ontogenia ocular em *Anableps anableps*. A expressão dessas opsinas de estágio larval para adulto, mostrou uma expressão assimétrica destes genes na retina de *A. anableps* (Figura 30).

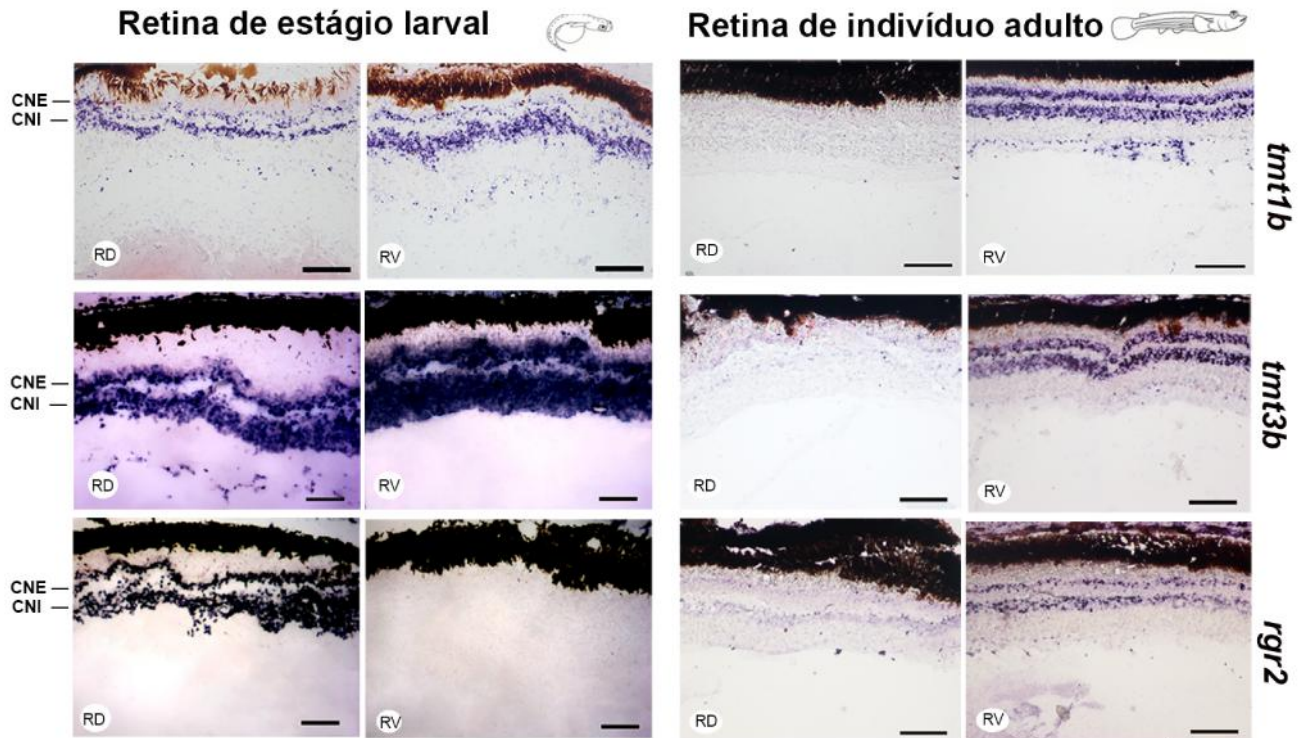


Figura 30 - Distribuição da expressão dos genes das opsinas não visuais *tmt1b*, *tmt3b* e *rgr2* ao longo da ontogenia ocular de *Anableps anableps*. Hibridização *in situ* mostrou que os genes das opsinas *tmt1b*, *tmt3b*, e *rgr2* apresentam expressão na camada nuclear externa (CNE) e camada nuclear interna (CNI) da retina de *A. anableps*. Criosecções: 20 μ m de espessura. Escala: 100 μ m.

A expressão extrarretinal do gene *tmt3b* foi observada, através de hibridização *in situ*, na pele e na córnea. Nos espécimes da fase larval, o gene da opsina *tmt3b* foi expressa na pele e na córnea toda. No entanto, em indivíduos adultos o gene da opsina *tmt3b* foi expresso apenas na região central e ventral da córnea (Figura 31). Sugerindo um *shift* de expressão que transiciona entre pre e pós nascimento.

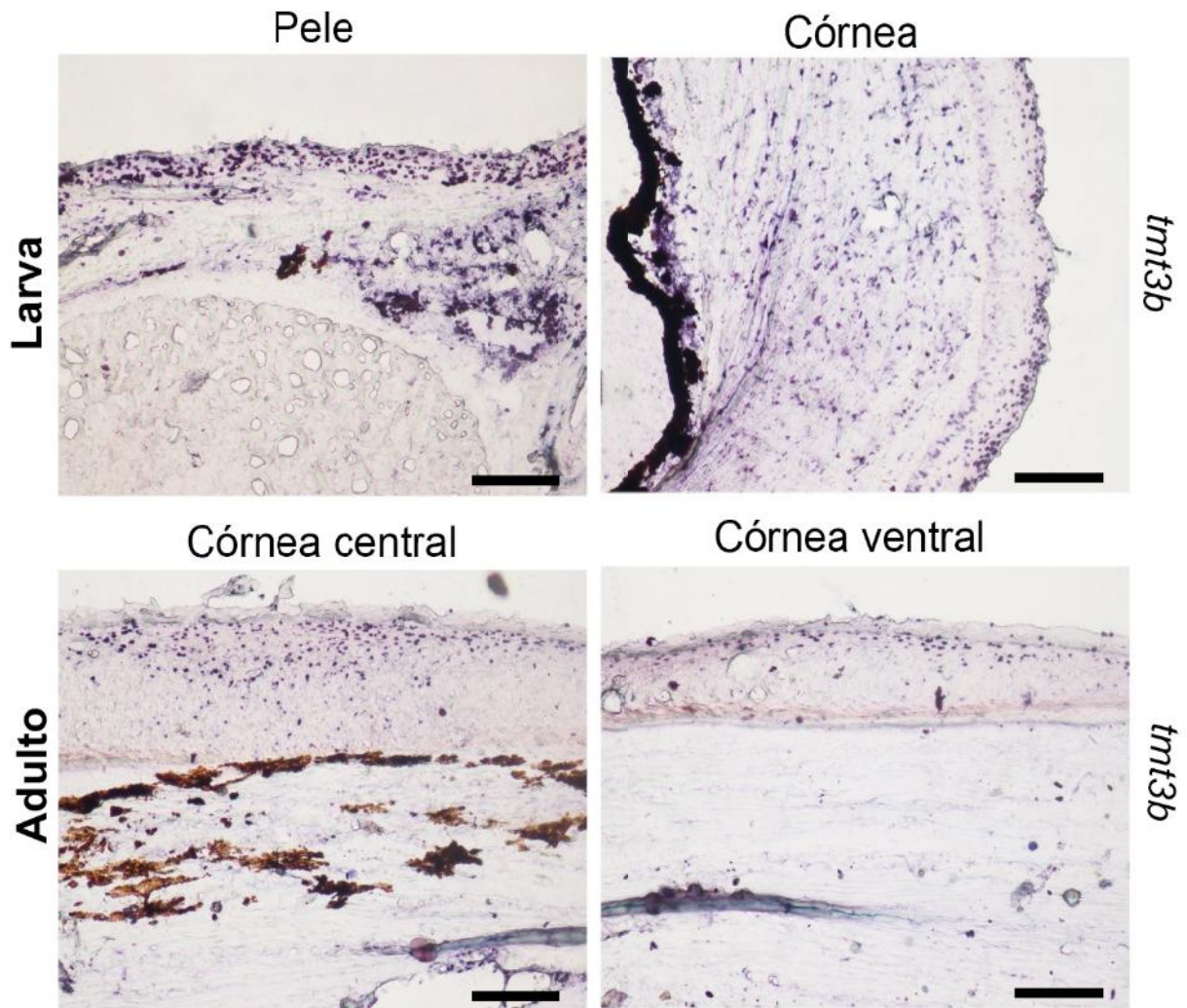


Figura 31 - Distribuição da expressão dos genes das opsina *tmt3b* na córnea e pele de indivíduos larvais e adultos de *Anableps anableps*. Hibridização *in situ* do gene da opsina *tmt3b* no estágio larval, o gene é expresso na pele e na córnea toda dos indivíduos. No indivíduo adulto: o gene *tmt3b* é expressão na região central e ventral da córnea. Criosecções: 20 μ m de espessura. Escala: 100 μ m.

2.7. DISCUSSÃO

A combinação de técnicas *in silico* e hibridização *in situ* foi empregada para a identificação de genes das opsinas não visuais na retina de *Anableps anableps*. O transcriptoma exibiu um repertório muito diversificado de genes de opsinas não visuais (20 genes expressos). As sequências codificantes da proteína das opsinas não visuais exibiram típicos motivos (*motifs*) de aminoácidos para cada tipo de opsina não visual. Estudos por hibridização *in situ* mostraram expressão assimétrica espacial e temporal dos genes das opsinas não visuais na retina de *A. anableps*. Isso sugere mudanças na sensibilidade espectral dos fotopigmentos que podem estar relacionadas às adaptações visuais ao ambiente aéreo e aquático.

Produto de duplicação, genes das opsinas produziram uma diversidade de classes e subclasses de opsinas (Figura 26, Tabela 5) (HOFMANN; CARLETON, 2009; LIN et al., 2017; RENNISON; OWENS; TAYLOR, 2012). Em *A. anableps*, a diversidade de opsinas não visuais estaria relacionada à heterogeneidade ambiental em que vive, um ambiente aéreo-aquático (RENNISON; OWENS; TAYLOR, 2012). Da mesma forma, a pseudogeneização produz genes com códons de parada prematura, como o gene da opsina *tmt3a* (Figura 27). Isto genes curtos podem surgir, porque eles não são necessários no processo adaptativo naquele habitat (DAVID-GRAY et al., 2002; YOKOYAMA et al., 2014).

As sequências codificantes das opsinas não visuais exibem típicos motivos (*motifs*) de aminoácidos para cada tipo de opsina. As análises comparativas nas sequencias codificantes das opsinas não visuais de tipos C e Gr4 com a opsina visual rodopsina confirmaram a presença de motivos críticos necessários na estabilidade conformacional da proteína (resíduos de aminoácidos cisteínas na posição 110 e 187) (KARNIK et al., 1988), bem como sua função na absorção da luz (resíduo da lisina na posição 296) (TERAKITA, 2005). Da mesma forma, foram identificados típicos motivos de aminoácidos entre as classes das opsinas não visuais, especialmente aquelas que são conservadas entre as opsinas do grupo Gr4 e aquelas que são mantidas entre as opsinas do tipo C (Figura 27). Estes motivos conservados estão presentes nas posições 113, motivo tripeptido (134-136), posições 181, 185 e o motivo nas posições (302-313) (Figura 27). Com base nesses resultados, podemos dizer que as sequencias codificantes da proteína das opsinas não visuais permitiram a identificação de padrões conservados, 6 opsinas apresentavam motivos típicos do tipo C e 9 do grupo Gr4, conservadas entre si.

Os genes das opsinas não visuais exibem expressão assimétrica espacial e temporal na retina de *A. anableps*. Na retina de estágios larvais foram avaliados os genes das opsinas *tmt1b*, *tmt3b* e *rgr2*. Nossos resultados de hibridização *in situ* mostraram que os genes das opsinas *tmt1b* e *tmt3b* foram expressas na retina dorsal (RD) e ventral (RV) de *A. anableps* (Figura 28). Enquanto, o gene da opsina *rgr2* foi expresso apenas na RD (Figura 28), possivelmente, cumprem uma função similar as opsinas *tmt* naquela região da retina. Esses resultados *in situ* indicam que genes da opsina *rgr2* são expressas assimetricamente na retina, mesmo antes do nascimento, ou seja, antes da interação de seu sistema visual com estímulos luminosos do ambiente.

Foram avaliados os genes das opsinas não visuais *tmt1b*, *tmt3b*, *parapinopsina-2*, *opn5* e *rgr2* em *A. anableps* adultos. Os resultados da hibridização *in situ* mostraram que os cinco genes das opsinas não visuais apresentaram expressão na região ventral da retina (Figura 29). Neste estágio, os indivíduos estão em seu habitat natural e interagem com os estímulos da luz ambiente. Os resultados da hibridização *in situ* mostraram que os cinco genes das opsinas não visuais (*tmt1b*, *tmt3b*, *parapinopsina-2*, *opn5* e *rgr2*) apresentaram expressão exclusivamente na CNE e CNI da retina ventral de *A. anableps* (Figura 29). A expressão destes genes (*tmt*, *parapinopsina-2* e *opn5*) não visuais na retina ventral pode estar relacionada à captação de luz procedente do meio atmosférico (Tabela 2) (KOYANAGI et al., 2013, 2015b; SATO et al., 2016) e nos processos de fotoisomerização (gene *rgr2*) (CHEN et al., 2001).

Por outro lado, mudanças temporais da expressão dos genes das opsinas *tmt1b*, *tmt3b* e *rgr2* foram observadas ao longo da ontogenia ocular em *Anableps anableps* (Figura 30). A expressão destas opsinas de estágio larval para adulto, mostrou uma progressão de diferentes combinações destes genes de opsinas (CARLETON et al., 2008) (Figura 30). A expressão assimétrica desses genes de opsinas durante o desenvolvimento ocular, deve-se ao fato de que *A. anableps* possivelmente apresentam diferentes requisitos de fotopigmentos durante seu desenvolvimento ocular e, portanto, expressam diferentes genes de opsina (CARLETON, 2009). Assim mesmo, as mudanças temporais permitem que peixes adquiram sensibilidades pigmentares visuais diferentes (CARLETON, 2009), isto possivelmente contribuía no desenvolvimento ocular em *A. anableps*. Bem como, a expressão temporal das opsinas é um mecanismo chave na alteração da morfologia do organismo (CARLETON, 2009).

A expressão extra-retiniana do gene da opsina *tmt3b* foi observada, através de hibridização *in situ*, na pele e córnea nos diferentes estágios de desenvolvimento de *A. anableps*. O gene da opsina *tmt3b* é expresso em toda a córnea e na pele de indivíduos larvais, estágio no qual estão localizados dentro do sistema reprodutivo da fêmea e protegidos de

estímulos da luz do ambiente. A expressão do gene da opsina *tmt3b* na pele poderia estar relacionado a uma participação na regulação do relógio periférico (MOUTSAKI et al., 2003) (Figura 31). Enquanto que em adultos, o gene da opsina *tmt3b* é expressa apenas na região central e ventral da córnea. Sua expressão limitada a essas regiões da córnea possivelmente contribui para a filtragem de luz para proteger a retina de uma luz muito brilhante nas águas superficiais e eliminar o efeito de dispersão da luz (KONDRASIV et al., 1986) que ocorrem no limite do ambiente aéreo-aquático.

Isto parece representar o primeiro caso registrado, em *Anableps anableps*, de mudanças de expressão espacial e temporal das opsinas não visuais nos diferentes estágios na retina nesta espécie.

Estudos adicionais devem ser realizados para complementar os resultados obtidos. Como a avaliação de microespectrofotometria (CARLETON et al., 2008) para estimar a sensibilidade espectral dos comprimentos de onda (λ_{max}) destes pigmentos não visuais. Além disso, estudos complementares comparativos de indivíduos capturados do ambiente natural com aqueles mantidos em cativeiro para validar a contribuição da expressão destas opsinas na adaptação visual desta espécie, uma relação pouco conhecida até hoje.

2.8. CONCLUSÕES

Através da análise *in silico* foram identificados no transcriptoma do olho de *Anableps anableps* 20 genes de opsinas não visuais o que refletem a heterogeneidade ambiental na qual a espécie vive. As análises comparativas nas sequencias codificantes da proteína das opsinas não visuais permitiram a identificação de padrões conservados, 6 opsinas apresentavam motivos típicos do tipo C e 9 do grupo Gr4, conservadas entre si. Por meio da hibridização *in situ*, os genes das opsinas não visuais *tmt1b*, *tmt3b*, *opn5*, *parapinopsina-2* e *rgr2* apresentam expressão espacial assimétrica nos adultos, enquanto apenas o gene *rgr2* é regulada assimetricamente nas larvas, assim como também os genes das opsinas *tmt1b*, *tmt3b* e *rgr2* exibem mudanças no padrão de expressão ao longo da ontogenia ocular, de estágio larval para adulto, em *A. anableps*.

3. CAPÍTULO II. ADAPTAÇÕES VISUAIS A AMBIENTES AQUÁTICOS SUBTERRÂNEOS EM *PHREATOBIUS CISTERNARUM*

3.1. RESUMO

Animais de ambientes subterrâneos se adaptaram à escuridão perpétua, desenvolvendo uma infinidade de características. A redução dos olhos e perda da visão, e o aumento de outras estruturas sensoriais são as características troglomórficas mais comuns nestes organismos. O “bagre subterrâneo” *Phreatobius cisternarum* vive em ambiente de lençol freático. Esta espécie apresenta adaptações anatômicas (miniaturização) e moleculares, especialmente ao nível de sua percepção visual. Neste trabalho, combinamos análises histológicas, moleculares e de RNA-Seq para entender as adaptações visuais e sensoriais ao ambiente subterrâneo. Análise de sequenciamento de RNA da região da cabeça de *P. cisternarum* revelou o repertório de onze genes de opsinas, três opsinas visuais e oito opsinas não visuais. Duas opsinas visuais, *rhl* e *lws*, apresentaram substituições de aminoácidos que contribuem para o deslocamento vermelho e azul, respectivamente. Neste trabalho, análises histológicas mostraram a presença de retina rudimentar e a análise de RNA-Seq identificou a expressão de 38 genes de cristalino e 51 genes relacionados ao epitélio pigmentado da retina (RPE), indicando que os olhos reduzidos de *P. cisternarum* retiveram algumas estruturas oculares. A expressão extra-retiniana de *opn4m3* está possivelmente associada à regulação do relógio periférico. Além disso, a presença de potenciais pseudogenes de opsinas seria regulada por uma pequena retina exposta a um ambiente de baixa luminosidade. Outras estruturas sensoriais, como os neuromastos foram identificadas nas regiões laterais da cabeça e do corpo. Com base nesses resultados, nosso estudo *in silico* fornece a primeira evidência de substituições de aminoácidos de opsinas visuais em *P. cisternarum*, que poderiam alterar a sensibilidade espectral dos pigmentos visuais. Além disso, essas mudanças de λ_{max} podem ser úteis para requisitos visuais em ambientes subterrâneos. O presente estudo fornece evidências para o entendimento da base molecular da adaptação a ambientes subterrâneos.

Palavras-chave: Peixe. Opsinas. Deslocamentos λ_{max} . Substituições de aminoácidos. Ambiente subterrâneo. Transcriptoma.

3.2. ABSTRACT

Animals from subterranean environments have adapted to perpetual darkness, developing a plethora of characteristics. The eye reduction and vision loss, and the increase of other sensorial structures are the most common troglomorphic characteristics in these organisms. The subterranean catfish *Phreatobius cisternarum* lives in a phreatic environment. This species exhibits anatomical (miniaturization) and molecular adaptations, especially at the level of its visual perception. In this study, we combine histological, molecular and RNA-Seq analysis to understand the visual and sensorial adaptations to the subterranean environment. RNA-Seq analysis of *P. cisternarum* head showed a repertoire of eleven opsins, three visual opsins and eight non-visual opsins. Two visual opsins, *rh1* and *lws*, exhibited amino acid substitutions that contribute to red and blue shift, respectively. In this work, histological analysis showed the presence of rudimentary retina and RNA-Seq analysis identified the expression of 38 lens genes and 51 genes related to the retinal pigmented epithelium (RPE), indicating that the reduced eyes of *P. cisternarum* retained some ocular structures. The extra-retinal expression of *opn4m3* is possibly associated with the peripheral clock regulation. Furthermore, the presence of potential opsin pseudogenes would be regulated by a small retina exposed to a low-light environment. Other sensory structures, such as neuromasts, were identified in the lateral regions of the head and body. Based on these results, our *in silico* study provides the first evidence of amino acid substitutions on the visual opsins in *P. cisternarum*, which could shift the spectral sensitivity of visual pigments. In addition, these max shifts may be useful for visual requirements in subterranean environments. The present study provides evidence for the understanding of the molecular basis of adaptation to subterranean environments.

Keywords: Fish. Opsins. max shifts. Amino acid substitutions. Phreatic groundwater. Transcriptome.

3.3. INTRODUÇÃO

3.3.1. Adaptações oculares a um ambiente subterrâneo

Os peixes que habitam ambientes subterrâneos são conhecidos como peixes hipógeos. Estas espécies quando procedem de ambientes exclusivamente subterrâneos são denominadas espécies troglóbias que podem ser de habitats freáticos ou de cavernas, sendo as populações de cavernas mais abundantes e diversas (TRAJANO, 2001; FERNÁNDEZ; PINNA, 2005). Esses ambientes representam um desafio para os animais que se adaptaram à escuridão perpétua, desenvolvendo uma multiplicidade de características. A redução e perda de olhos, e o aumento de estruturas sensoriais são as características troglomórficas mais comuns e conhecidas (JEFFERY, 2009; KIMCHI; TERKEL, 2002; MOHUN et al., 2010; PARTHA et al., 2017; PROTAS; JEFFERY, 2013). Essas características são resultado da evolução independente em táxons distantemente relacionados, mas que vivem em cavernas e habitats subterrâneos (Figura 32) (BERTI et al., 2001; KRISHNAN; ROHNER, 2017; MENG et al., 2013a; BOCKMANN; CASTRO, 2010; COOPER, H. M., HERBIN, M., & NEVO, 1993; EMERLING; SPRINGER, 2014; FERNÁNDEZ; PINNA, 2005; MOHUN et al., 2010; MURIEL-CUNHA; DE PINNA, 2005).

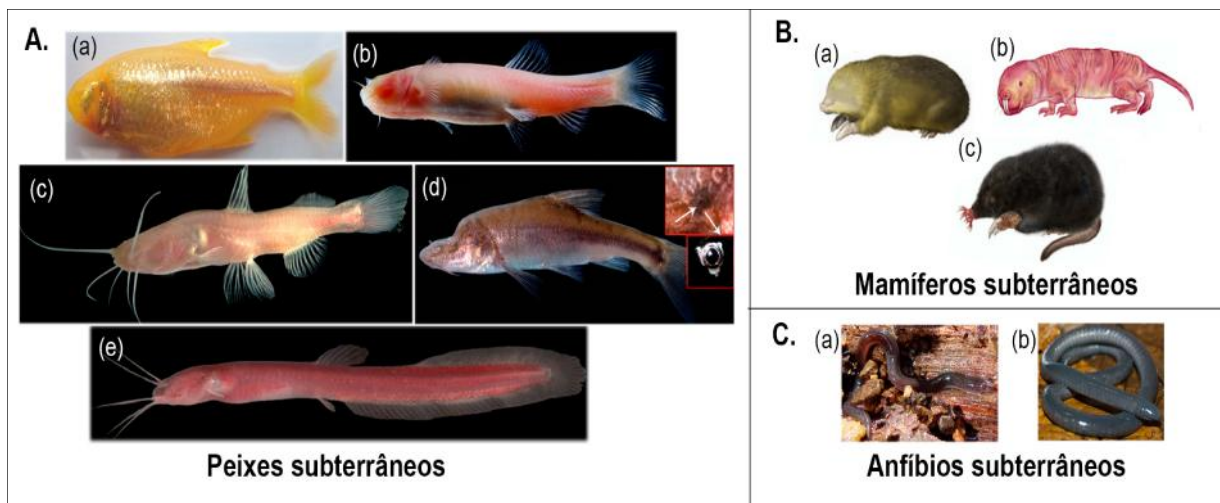


Figura 32 - Espécies de ambientes subterrâneos. A. **Peixes subterrâneos.** (a) Cavefish *Astyanax mexicanus*, (b) *Phreatichthys andruzzii*, (c) *Rhamdiopsis krugi*, (d) *Sinocyclocheilus anophthalmus*, (e) *Phreatobius cisternarum*. B. **Mamíferos subterrâneos.** (a) *Chrysochloris asiatica*, (b) *Heterocephalus glaber*, (c) *Condylura cristata*. C. **Anfíbios subterrâneos.** (a) *Rhinatrema bivittatum*, (b) *Typhlonectes natans* (Adaptado de KRISHNAN & ROHNER, 2017; BOCKMANN & CASTRO, 2010; MENG et al., 2013; MURIEL-CUNHA, 2008; EMERLING & SPRINGER, 2014). (<http://aquaria.palo-alto.ca.us/fish/more/cave/Phreatichthys/andruzzii/>; <https://www.bio-scene.org/media/rhinatrema-bivittatum-0>; <https://alchetron.com/Typhlonectes#->).

Em espécies de peixes subterrâneos (Figura 33), a degeneração ocular parece ser controlada por diferentes programas genéticos. Em *Astyanax mexicanus* (Characiformes) a degeneração é regulada pela superexpressão do gene *shh* que induz a apoptose do cristalino (YAMAMOTO; STOCK; JEFFERY, 2004) (Figura 33A). Em *Phreatichthys andruzzii* (Cypriniformes), a degeneração ocular é acompanhada pela expressão de *caspase-3* na retina o que conduz a apoptose (Figura 33B) (STEMMER et al., 2015). Duas opsinas não visuais são relatadas neste peixe de caverna: *tmt* e *opn4m2*, cujas sequências de codificação possuem um códon de parada prematuro. Assim mesmo estas opsinas mostraram ser candidatas a fotorreceptores para relógios periféricos (CAVALLARI et al., 2011). Em *Sinocyclocheilus anophthalmus* (Cypriniformes), análises de RNA-Seq mostraram que a degeneração da retina está relacionada com a subexpressão dos fatores de transcrição envolvidos na expressão das opsinas (Figura 33C) (MENG et al., 2013a). Ou seja, os mecanismos de degeneração ocular poderiam ocorrer devido à degeneração da retina pela subexpressão de opsinas, pela apoptose do cristalino ou pela apoptose da retina (YAMAMOTO; STOCK; JEFFERY, 2004; MENG et al., 2013a; STEMMER et al., 2015). Além disso, essas espécies desenvolveram outras estruturas sensoriais para adaptação a ambientes subterrâneos, como neuromastos, barbelas e papilas gustativas, que contribuem para relações inter e intraespecíficas, exploração do ambiente e detecção de recursos alimentares (SOARES; NIEMILLER, 2013).

3.3.2. *Phreatobius cisternarum*: adaptação visual em ambiente aquático subterrâneo

A redução ou perda de olhos ocorre repetidamente em peixes troglóbios (TRAJANO; REIS; BICHUETTE, 2004). O gênero *Phreatobius* (Heptapteridae: Siluriformes, *Incertae Sedis*) apresenta espécies com presença ou ausência de estruturas oculares. A espécie *Phreatobius cisternarum* tem olhos muito pequenos, localizados anteriormente na cabeça (MURIEL-CUNHA; DE PINNA, 2005) (Figura 34). Entretanto as espécies *Phreatobius sanguijuela* (FERNANDEZ et al., 2007) e *P. dracunculus* não apresentam olhos (SHIBATTA; MURIEL-CUNHA; DE PINNA, 2007). As espécies do gênero *Phreatobius* apresentam características morfológicas especiais que lhes permitem ser identificadas (Tabela 6).

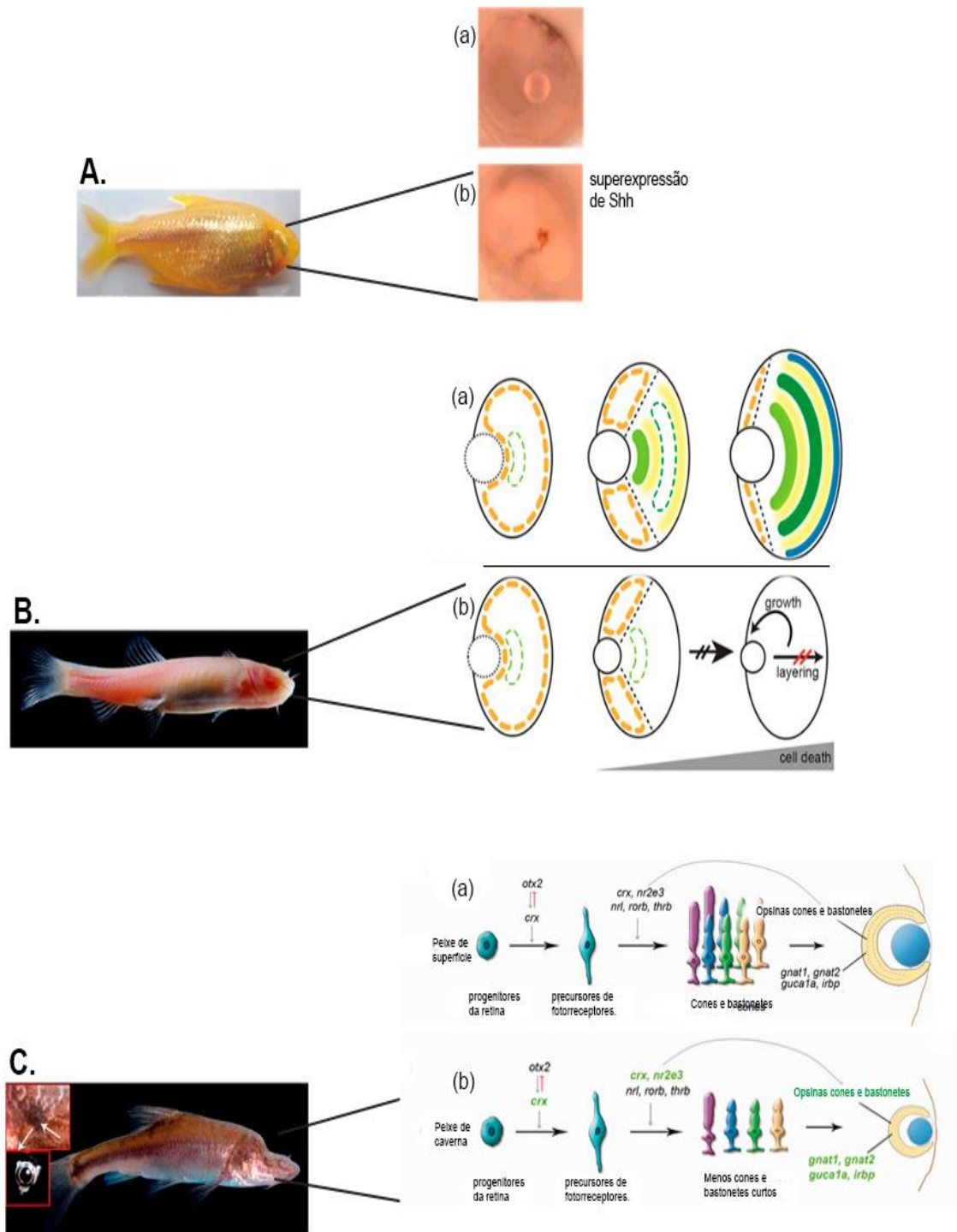


Figura 33 - Modelos propostos na degeneração ocular em espécies subterrâneas. A. *Astyanax mexicanus*. (a) População de superfície *A. mexicanus*, (b) População da caverna *A. mexicanus*. **B. *Phreatichthys andruzzii*.** (a) Desenvolvimento normal dos olhos em peixes de superfície, (b) Peixe de caverna *Phreatichthys andruzzii*. **C. *Sinocyclocheilus anophthalmus*.** (a) Olho normais de peixe de superfície, (b) Peixe de caverna *Sinocyclocheilus anophthalmus* (Adaptado de YAMAMOTO, STOCK & JEFFERY, 2004; MENG et al., 2013; STEMMER et al., 2015).

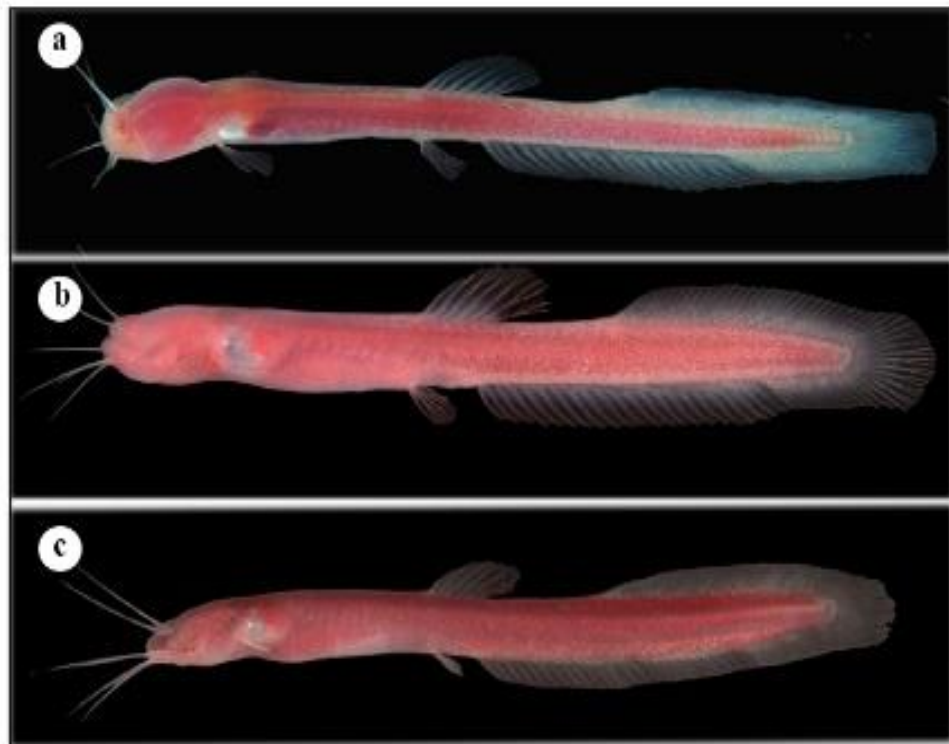


Figura 34 - Espécies do gênero *Phreatobius*. (a) *P. sanguiuela*, (b) *P. dracunculus*, (c) *P. cisternarum* (Adaptado do OHARA et al., 2016; SHIBATTA et al., 2007; MURIEL-CUNHA, 2008).

Tabela 6. Características morfológicas principais das espécies do gênero *Phreatobius*

Características	<i>P. dracunculus</i>¹	<i>P. cisternarum</i>²	<i>P. sanguiuela</i>^{3,4}
Olhos	Ausentes.	Pequenos, com cristalino bem formada e parecem funcionais.	Ausentes.
Pigmento tegumentar	Ausente.	Pigmento tegumentar escuro.	Ausente.
Pseudotímpano	Grande, visível nas vistas dorsal, lateral e ventral.	Pequeno, visível apenas em vista lateral.	Apresenta Pseudotímpano.

¹(SHIBATTA; MURIEL-CUNHA; DE PINNA, 2007); ²(MURIEL-CUNHA; DE PINNA, 2005);

³(FERNANDEZ et al., 2007), ⁴(OHARA; DA COSTA; FONSECA, 2016).

A ausência de qualquer vestígio ocular externo em espécimes adultos de *P. dracunculus*, assim como a presença de um poro infraorbitário posterior indica que a área de olho primitivo na espécie é pelo menos tão anterior quanto em *P. cisternarum*. Estudos de espécimes juvenis de *P. dracunculus*, atualmente desconhecidos, poderiam fornecer maiores informações (SHIBATTA; MURIEL-CUNHA; DE PINNA, 2007). Além disso, poderiam confirmar se este é um traço que degenera progressivamente durante seu desenvolvimento, como na espécie *Astyanax mexicanus* (YAMAMOTO; STOCK; JEFFERY, 2004) ou esta condição anoftálmica é estabelecida antes do nascimento, independentemente do seu desenvolvimento. No caso de *Phreatobius cisternarum*, a literatura até o momento não relata os possíveis mecanismos de degeneração relacionados à sua redução ocular.

3.3.2.1. *Phreatobius cisternarum*: ecologia e distribuição populacional da espécie

A classe Actinopterygii agrega ordens com espécies que vivem em ambientes exclusivamente subterrâneos (troglóbios), sendo estas as Cypriniformes, Characiformes, Gymnotiformes, Siluriformes, Percopsiformes, Ophidiaria, Gobiaria, Anabantaria, Ovalentaria e Eupercaria (ADAMS et al., 2013; BETANCUR-R et al., 2017; ROMERO; PAULSO, 2001). No caso, da ordem Siluriformes “bagres” contém 34 espécies troglóbias em 8 famílias (Ictaluridae, Siluridae, Clariidae, Pimelodidae, Heptapteridae, Trichomycteridae, Loricariidae, Astroblepidae) (ROMERO; PAULSO, 2001; SULLIVAN; LUNDBERG; HARDMAN, 2006) com características troglomórficas.

As espécies de *Phreatobius* são distribuídas em torno na bacia do rio Amazonas, no Brasil (MURIEL-CUNHA; DE PINNA, 2005; TRAJANO, 2007) e na bacia do rio Paraguai, Bolívia (FERNANDEZ et al., 2007). No Brasil, estas espécies são relatadas para os Estados de Rondônia, Amapá, Pará e Macapá (Figura 35) (MURIEL-CUNHA; DE PINNA, 2005; OHARA; DA COSTA; FONSECA, 2016; SHIBATTA; MURIEL-CUNHA; DE PINNA, 2007). Os peixes ocorrem na camada freática superficial, e surgem em poços artesanais, onde são capturados acidentalmente (MURIEL-CUNHA; DE PINNA, 2005).

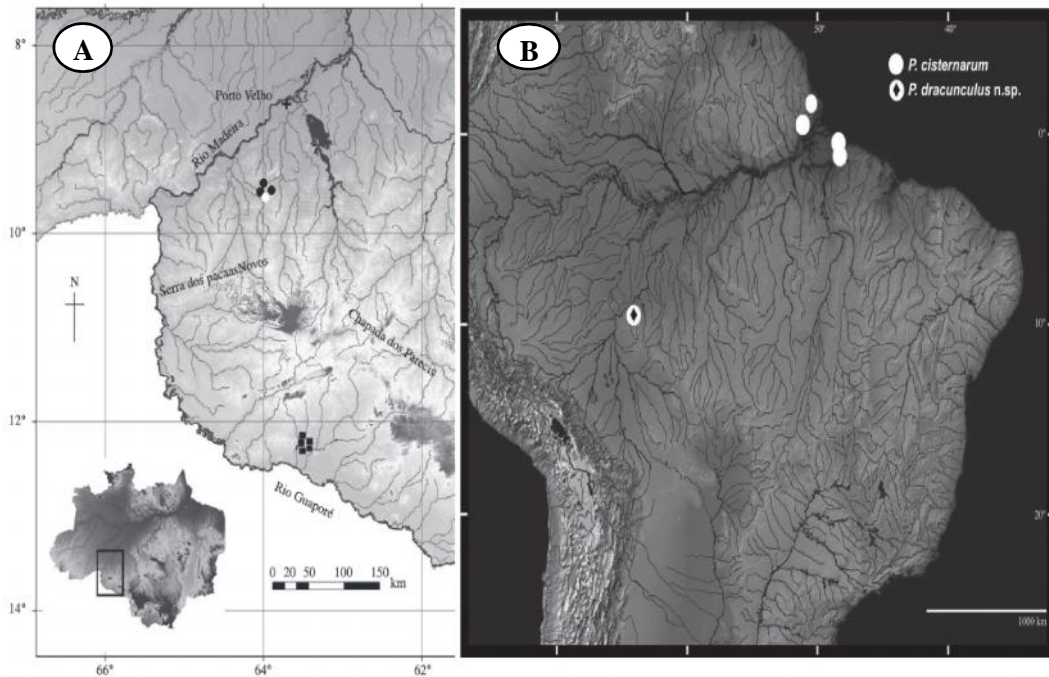


Figura 35 - Distribuição geográfica das espécies de *Phreatobius* em estados brasileiros. A. Rio Guaporé, *P. sanguijuela* (quadrados); Porto Velho, *P. dracunculus* (círculos), Estado de Rondônia. **B.** Estado de Amapá, Pará e Macapá, *P. cisternarum* e Estado de Rondônia, *P. dracunculus* (Adaptado de OHARA; DA COSTA; FONSECA, 2016; MURIEL-CUNHA; DE PINNA, 2005; SHIBATTA; MURIEL-CUNHA; DE PINNA, 2007).

Pouco se conhece sobre a biologia, distribuição, ecologia e fisiologia das espécies do gênero *Phreatobius* devido ao comportamento hipógeo (MURIEL-CUNHA; DE PINNA, 2005; OHARA; DA COSTA; FONSECA, 2016).

Neste contexto, *P. cisternarum* é um modelo ideal para a investigação da adaptação visual ao ambiente de lençol freático. Por esta razão, o objetivo deste estudo visa avaliar genes da retina e das estruturas oculares de *Phreatobius cisternarum* usando método *in silico* e análise histológica.

3.4. OBJETIVOS

3.4.1. Objetivo Geral

Avaliar o repertório dos genes das opsinas e das estruturas oculares no transcriptoma de *Phreatobius cisternarum*.

3.4.2. Objetivos Específicos

- I. Identificar no transcriptoma da cabeça de *P. cisternarum* o repertório dos genes das opsinas visuais e não visuais, e genes das estruturas oculares;
- II. Identificar, pela análise comparativa, sítios de ajuste spectral conhecidos nas sequências codificantes da proteína das opsinas visuais;
- III. Analisar morfologicamente as estruturas oculares de *P. cisternarum* através da técnica de Hematoxilina e Eosina;
- IV. Analisar a distribuição dos neuromastos de *P. cisternarum* através da coloração com DASPEI;
- V. Caracterizar o padrão de expressão dos genes das opsinas não visuais de *P. cisternarum* através de hibridização *in situ*.

3.5. MATERIAIS E MÉTODOS

3.5.1. Coleta de espécimes

Doze espécimes de *Phreatobius cisternarum* foram coletados em poços artificiais privados no bairro de Paricatuba, município de Benevides, Pará, Brasil (Figura 36). Espécimes foram mantidos em cativeiro, e colocados dois animais por tanque, com trocas de água regulares e alimentados com uma ração específica para peixes (enriquecida de proteínas e vitaminas), pelo menos duas vezes ao dia. Os peixes foram mantidos em ambiente de escuridão permanente nas instalações do Laboratório de Evolução e Desenvolvimento da Universidade Federal do Pará, Brasil.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios de cuidado e uso de animais adotados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Pará (Número Protocolo 037-2015).

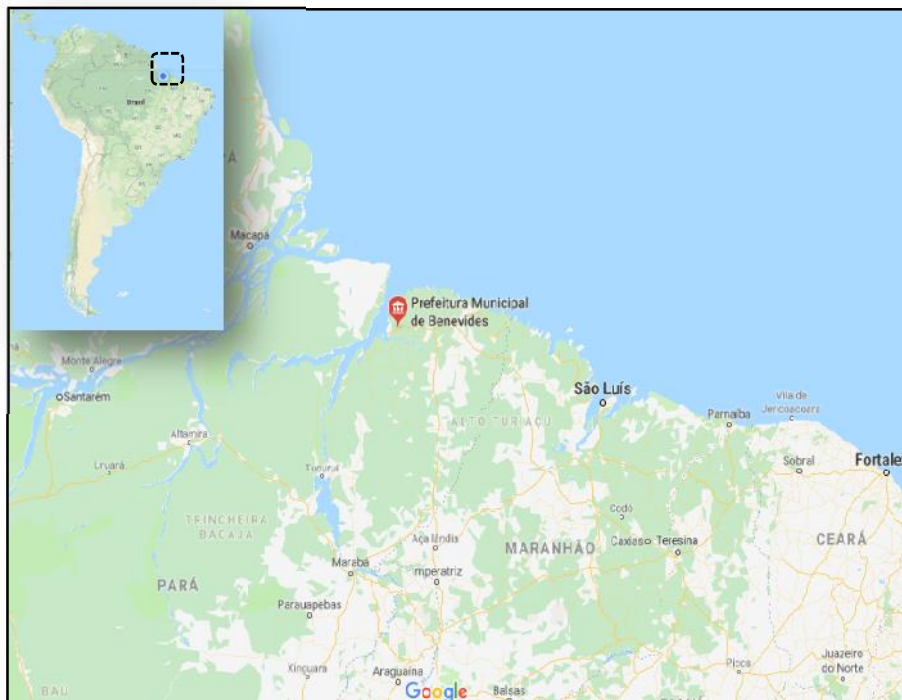


Figura 36 - Mapa da região de coleta de *Phreatobius cisternarum* no município de Benevides, Pará, Brasil (@google maps).

3.5.2. Preparo de biblioteca e sequenciamento no Illumina

A região anterior (cabeça) de *Phreatobius cisternarum* foi removida, armazenada em RNAlater (Sigma-Aldrich) e mantida a -80 °C para extração de RNA. O RNA total foi obtido utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies) de acordo com o protocolo do fabricante. Esta amostra de RNA foi utilizada na confecção de bibliotecas e sequenciamento de RNA (RNA-Seq). O sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina NEXTSeq 500 com leituras *paired-end* de 150bp, com o kit *NEXTSeq MidOutput* de acordo com o protocolo do fabricante (Illumina).

3.5.3. Montagem *de novo* do transcriptoma

A montagem do transcriptoma foi realizada na plataforma *Trans-AbySS*, com a estratégia *de novo* e a qualidade da montagem foi feita através do software *assemblystats*.

3.5.4. Busca por genes no transcriptoma

3.5.4.1. Repertório de genes das opsinas e análise filogenética

A etapa inicial consistiu na busca de sequências codificantes das opsinas visuais e não visuais no transcriptoma da cabeça de *Phreatobius cisternarum*, utilizando o tBlastx (ALTSCHUL et al., 1997) com e-value de e-5 (MENG et al., 2013a; ZHANG et al., 2012) e representantes ortólogos de zebrafish (*Danio rerio*) (número de acesso no GenBank: KT008391-KT008432). Posteriormente, estas sequências obtidas foram analisadas na plataforma de Transdecoder 2.1.0 (*Find Coding Regions Within Transcripts*) e através desta análise obteve-se regiões codificantes candidatas.

Para as análises filogenéticas, as sequências codificantes das proteínas deduzidas foram alinhadas manualmente e utilizando o programa CLUSTAL (THOMPSON et al., 1997) no BioEdit (HALL, 1999). As sequências codificantes das proteínas de opsinas foram alinhadas com representantes ortólogos de zebrafish (número de acesso no GenBank: KT008391-KT008432) e *Ictalurus punctatus*, e foram excluídas os terminais variáveis C e N (C-terminal ou carboxi-terminal e N-terminal ou amino-terminal) destas sequências. As árvores

filogenéticas foram construídas usando o método da Máxima Verossimilhança no programa MEGA versão 6 (TAMURA et al., 2013) e aplicando o algoritmo modelo Jones-Taylor-Thornton, JTT (JONES; TAYLOR; THORNTON, 1992) com valores de *bootstrap* baseados em 1000 iterações (FELSENSTEIN, 1985) para avaliar o grau de suporte da ramificação interna (expressado em porcentagem).

3.5.4.2. Genes envolvidos na estrutura ocular

A busca foi realizada através da ferramenta BLAST (e-5) usando sequências ortólogas de *Ictalurus punctatus* ou *Danio rerio*. Em seguida, confirmamos os resultados por BLASTn de sequências de nucleotídeos de *P. cisternarum* contra dados do NCBI, seguidos pela predição de ORFs usando a ferramenta de tradução ExPASy. Finalmente, usamos as ORFs mais longas de *P. cisternarum* e procedemos com um BLASTp contra o NCBI para confirmar a ortologia das proteínas. A anotação dos genes do epitélio pigmentado da retina (RPE) foi realizada no blast2Go 5.2.5 (CONESA et al., 2005). Este programa foi usado para procurar (blast), mapear e anotar os contigs. As sequências de nucleotídeos foram confrontadas contra bancos de dados de peixes ósseos (taxa: 7898, Actinopterygii).

3.5.5. Identificação de substituições de aminoácidos nas opsinas *lws* e *rh1* com possíveis efeitos de ajuste espectral conhecidos

As sequências codificantes de proteína da opsina *rh1.1* de *Phreatobius cisternarum*, *Ictalurus punctatus*, *Tachysurus fulvidraco*, *Sinocyclocheilus anophthalmus*, *Astyanax mexicanus* e zebrafish (*Danio rerio*) foram alinhadas contra a rodopsina bovina (*rho*) como referência para definir a posição dos aminoácidos (PALCZEWSKI et al., 2000) (Apêndice A). No entanto, no caso de opsinas *lws*, essas sequências de *P. cisternarum*, *I. punctatus*, *T. fulvidraco*, *S. anophthalmus*, *A. mexicanus*, *Carassius auratus*, zebrafish foram alinhados contra a opsina humana LWS como referência na numeração de aminoácidos (YOKOYAMA; RADLWIMMER, 2001), e os limites transmembranares foram inferidos por analogia aos da rodopsina bovina (PALCZEWSKI et al., 2000) (Apêndice B). Estas sequências codificantes de proteínas das opsinas visuais foram alinhadas usando ClustalW (THOMPSON et al., 1997) e excluindo os terminais C e N das sequências (BEAUDRY et al., 2017).

3.5.6. Preparação de cortes histológicos para as análises histológicas e hibridização *in situ* (HIS)

Os espécimes de *Phreatobius cisternarum* foram anestesiados na solução de óleo de cravo (43,94 mg/L). As cabeças dos exemplares desta espécie foram removidas e incorporadas em meio *Tissue-Tek* OCT (Sakura), e foram armazenadas a - 80°C. Secções sagitais de 20 µm foram obtidas com o criostato Leica CM 1850 UV, por meio das coletas realizadas em lâminas *ColorFrost Plus Microscope* (Thermo). Em seguida, as secções de tecido da cabeça foram fixadas em 3% paraformaldeído e armazenados à -80 °C, até serem utilizadas nas análises histológicas e de hibridização *in situ*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica e técnica.

3.5.6.1. Preparações histológicas com Hematoxilina e Eosina (H&E)

As secções de tecido da cabeça de *P. cisternarum* foram coradas com Hematoxilina e Eosina seguindo o protocolo padrão (PEREZ et al., 2017). As lâminas com secções sagitais da cabeça de *Phreatobius cisternarum*, mantidas a -80°C foram deixadas à temperatura ambiente para secagem por 4 minutos. Em seguida, as secções de tecido foram coradas com hematoxilina por 3 minutos, lavadas por 5 minutos em água destilada, mergulhadas por 30 segundos em eosina e novamente mergulhadas em água destilada. As secções de tecido foram desidratadas em diluições seriadas de etanol (50%, 70%, 95% e 100%). Prontamente, foram deixadas para secar à temperatura ambiente. Logo depois, foram cobertas com lamínulas e *Cytoseal TM60*. Finalmente, após 48 horas as secções de tecido foram visualizadas em um microscópio óptico de luz Nikon Eclipse Ci-S/Ci-L.

3.5.6.2. Hibridização *in situ* (HIS)

A hibridização *in situ* foi realizada de acordo com o protocolo previamente estabelecido (DE LIMA et al., 2015) utilizando 1 µl de ribosondas marcada com DIG. As secções de tecido foram fotografadas. As fotografias foram registradas com uma câmera digital Nikon Digital Sight DS-Ri1/K12887 acoplada ao Estereomicroscópio Nikon Modelo C-DSD115, usando o aplicativo NIS Elements D 4.10.01 para aquisição de imagens.

3.5.7. Coloração de neuromastos com DASPEI

Os neuromastos são estruturas sensoriais presentes na pele dos peixes (DEZFULI et al., 2009), são compostos por células ciliadas, (WINDSOR; MCHENRY, 2009). O corante vital fluorescente DASPEI (2-(4-(dimethylamino)styryl) -N-Ethylpyridinium Iodide) (Invitrogen™) é usado para corar as células ciliadas (HARRIS et al., 2003), de cor amarelo fluorescente (VAN TRUMP et al., 2010). A coloração de neuromastos no *Phreatobius cisternarum* foi realizada de acordo com um protocolo previamente estabelecido (YOSHIZAWA et al., 2010): Os peixes foram imersos em 25 µg / ml de DASPEI dissolvido em água do aquário durante 1 hora, seguido de imersão em 66,7 mg / ml de sal de metanossulfonato de etil 3-aminobenzoato de etilo (Tricaína, Sigma) em água do mesmo aquário. Os espécimes foram visualizados com um estereomicroscópio de fluorescência (Nikon SMZ1500) equipado com filtros GFRL.Ex.470/40/DM495/BA500(LP) e fotografados com uma câmera Nikon DS-Ri1. Para as contagens dos neuromastos de *P. cisternarum*, foram consideradas as regiões do corpo e cabeça da espécie em estudo (VAN TRUMP et al., 2010).

3.6. RESULTADOS

Para a identificação de genes de opsinas e estruturas oculares no transcriptoma da cabeça de *P. cisternarum*, foram utilizados genes ortólogos de zebrafish e *Ictalurus punctatus*. Substituições de aminoácidos nas sequências de proteínas das opsinas *lws* e *rh1.1* foram identificadas, os quais mostraram ser sítios de ajustes espectrais conhecidos. Através da análise histológica com H&E foram identificadas as estruturas oculares. Estudos por hibridização *in situ* mostraram uma expressão extra-retiniana do gene da opsina *opn4m3*. Assim mesmos, neuromastos foram identificados lateralmente na cabeça e ao longo do corpo.

3.6.1. Um repertório pouco diversificado dos genes das opsinas no transcriptoma da cabeça de *Phreatobius cisternarum*

No transcriptoma da cabeça de *Phreatobius cisternarum* foram identificados um repertório de 11 genes de opsinas (Tabela 7), 3 genes de opsinas visuais e 8 genes de opsinas não visuais. As opsinas visuais identificadas foram a *lws* (cones) e *rh1.1* e *rh1.2* (bastonetes).

Tabela 7. Repertório dos genes das opsinas visuais e não visuais no transcriptoma da cabeça de *Phreatobius cisternarum*

Tipo de opsinas	Nome de gene da opsina	Número de gene
Opsinas visuais	<i>lws</i>	1
	<i>rh1</i>	2
Opsinas não visuais	<i>Exo-rod</i>	1
	<i>rrh</i> /peropsina	1
	<i>rgr1</i>	1
	<i>va-1</i>	1
	<i>va-2</i>	1
	<i>opn4m3</i>	1
	<i>tmt3a</i>	1
	<i>parietopsina</i>	1
	Total	11

Análises do transcriptoma identificaram oito genes de opsinas não visuais: exorodopsina (*exo-rod*), peropsina (*rrh*), *rgr1*, *va1*, *va-2*, *opn4m3*, *tmt3a* e parietopsina. As sequências das opsinas visuais (OV) e não visuais (ONV) de *P. cisternarum* foram alinhadas com representantes dos genes ortólogos de zebrafish. As sequências no

alinhamento foram de 228 pb a 1622 pb (Figura 37). As relações entre cada subfamília de opsinas foram bem suportadas, com altos valores nos nós no teste de *bootstrap* (1000 iterações), e foram consistentes com os padrões de opsinas de zebrafish e *Ictalurus punctatus* empregados.

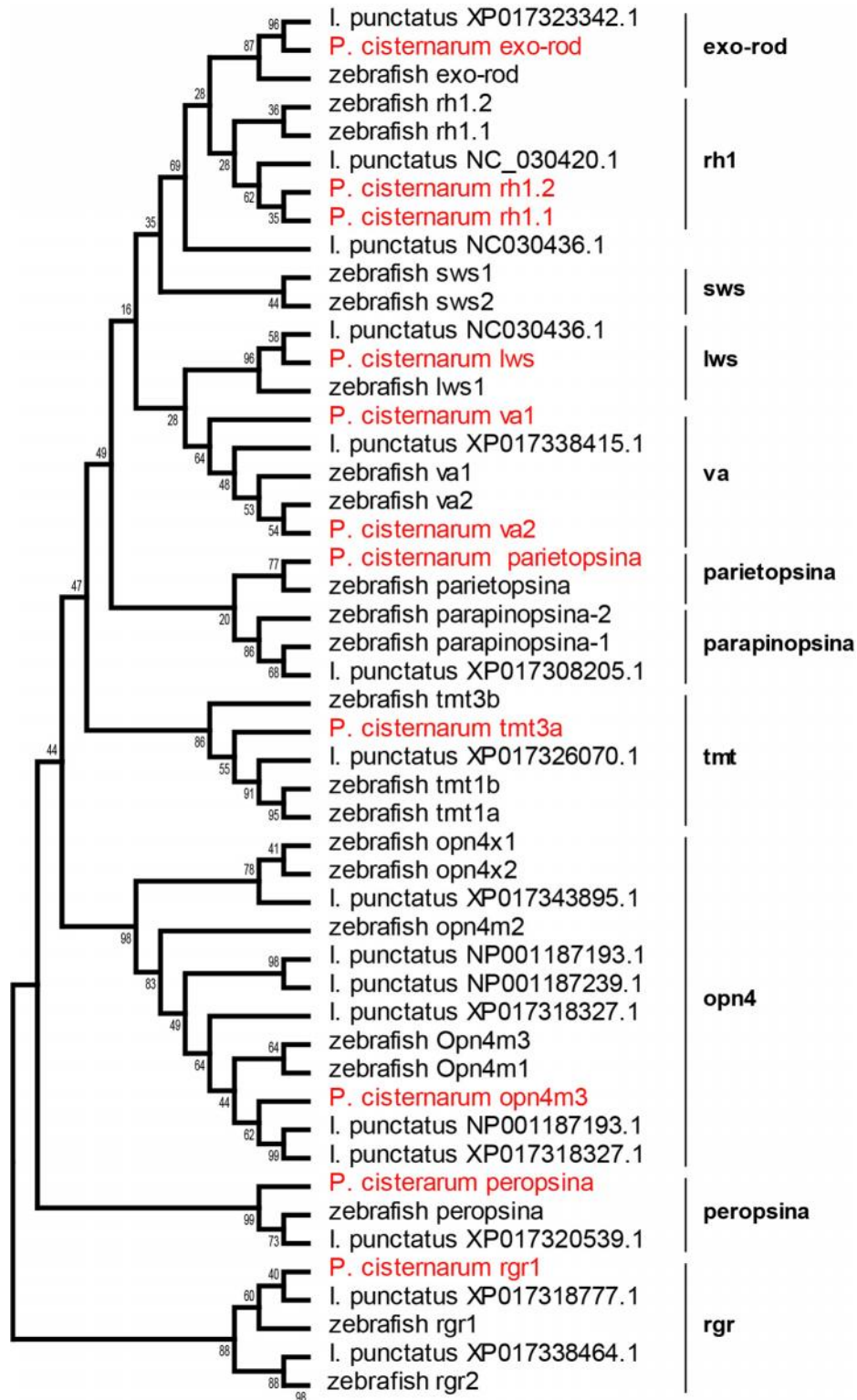


Figura 37 - A árvore filogenética de opsinas visuais e não visuais de *Phreatobius cisternarum*. As sequências de opsinas de *P. cisternarum* foram alinhadas com representantes dos genes ortólogos de zebrafish e *Ictalurus punctatus*. Alto grau de suporte na ramificação interna (porcentagem mostrada nos nós) com teste *bootstrap* (1000 iterações).

3.6.2. Genes do cristalino e RPE estão presentes no transcriptoma de *Phreatobius cisternarum*

A análise do transcriptoma de *Phreatobius cisternarum* mostrou pelo menos 38 genes relacionados com as células da fibra do cristalino (Apêndice C) e 51 genes relacionados ao epitélio pigmentado da retina (RPE) (Apêndice D). A presença de genes do cristalino sugere que esta espécie retém algumas estruturas de cristalino, diferente de *Astyanax mexicanus*.

3.6.3. Substituições de aminoácidos na proteína das opsinas *lws* e *rh1* mostram possíveis ajuste espectral dos pigmentos visuais

Através da análise na sequência de proteínas das opsinas *rh1*, identificamos substituições de aminoácidos. As sequências da opsina *rh1.1* de *P. cisternarum*, *I. punctatus*, *T. fulvidraco* e *A. mexicanus* apresentaram isoleucina (I) ao invés de glutamato (E) na posição 122 (E122I) e tirosina (Y) ao invés de fenilalanina (F261Y) (Apêndice A). Ou seja, essas espécies possuem duas substituições de aminoácidos nas posições E122I e F261Y. No entanto, as opsinas *rh1.1* de zebrafish e *S. anophthalmus* mostraram um glutamato na posição 122 e uma fenilalanina na posição 261 (mesmos aminoácidos e posições da rodopsina bovina) (Apêndice A). Finalmente, nossos resultados mostraram dois possíveis sítios de ajuste (E122I e F261Y) na opsina *rh1.1* de *P. cisternarum* (Figura 38).

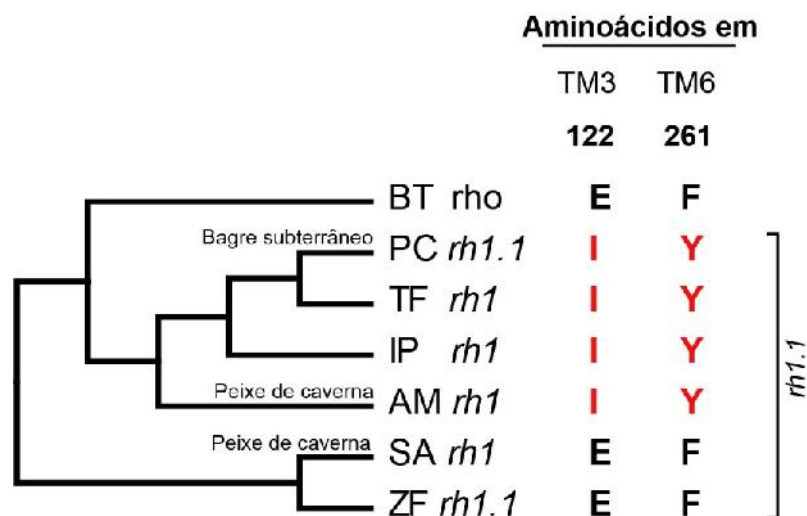


Figura 38 - Diagrama esquemático da relação filogenética da opsina *rh1.1* de *Phreatobius cisternarum* contra sequências publicadas. As colunas da direita mostram os aminoácidos da proteína das opsinas nas posições 122 e 261 conservados (letras pretas) ou substituídos (letras vermelhas). As sequências de aminoácidos da opsina *rh1.1* de *Ictalurus punctatus* (IP), *Tachysurus fulvidraco* (TF), *Sinocyclocheilus anophthalmus* (SA), *Astyanax mexicanus* (AM) e *Danio rerio* (zebrafish, ZF). A proteína da opsina *rh1.1* de *Phreatobius cisternarum* (PC) e rodopsina bovina (*rho*) de *Bos taurus* (BT).

Através da análise de aminoácidos da proteína das opsinas *lws*, identificamos treze resíduos de aminoácidos comuns (Apêndice B) entre espécies da ordem Siluriformes (Figura 39). Além disso, quatro substituições de aminoácidos na opsina *lws* foram comuns entre *P. cisternarum* e *A. mexicanus* (S134A; A166S/G; S176T; A233S/G - numeração de opsina LWS humana) (Figura 40). Os dois alelos *lws* de *S. anophthalmus* não mostram substituições de aminoácidos nestas posições (Figura 40). Nossos resultados mostraram quatro possíveis sítios de ajuste (S134A; A166S; S176T; A233S) na opsina *lws* de *P. cisternarum*.

Ordem	Espécie	Aminoácidos em													
		TM3			C2	TM4				TM5		TM6			
		134	135	149	166	176	182	184	186	222	233	267	275	278	
	HS LWS	S	L	W	A	S	V	T	P	V	A	T	F	C	
Siluriformes	PC <i>lws</i>	A	C	F	S	T	L	T	F	A	S	T	A	A	Bagre subterrâneo
	IP <i>lws</i>	A	C	F	G	T	F	T	L	A	G	T	A	V	
	TF <i>lws</i>	A	C	F	G	T	F	T	L	A	G	T	A	V	
Characiformes	AM <i>lws</i>	A	T	W	G	T	V	C	P	V	G	S	M	C	Peixe de caverna
Cypriniformes	SA <i>lws</i>	S	V	W	A	S	F	C	P	V	A	S	L	C	Peixe de caverna
	SA <i>lws</i>	S	V	W	A	S	F	C	P	I	A	S	L	C	Peixe de caverna

Figura 39 - Comparação de seqüências de aminoácidos da opsina *lws* de *Phreatobius cisternarum* contra seqüências publicadas. Espécies subterrâneas de diferentes ordens apresentam resíduos de aminoácidos não comuns entre elas. A coluna da esquerda mostra a ordem taxonômica da espécie. As colunas da direita mostram os aminoácidos nas posições 134, 135, 149, 166, 176, 182, 184, 186, 222, 233, 267, 275 e 278 conservados em algumas espécies (letras pretas) ou substituídos em outros (letras vermelhas). As seqüências de aminoácidos da opsina *lws* de *Ictalurus punctatus* (IP), *Tachysurus fulvidraco* (FT), *Sinocyclocheilus anophthalmus* (SA), *Astyanax mexicanus* (AM) e *Danio rerio* (zebrafish, ZF). A opsina *lws* de *Phreatobius cisternarum* (PC) e opsina LWS de humano (HS).

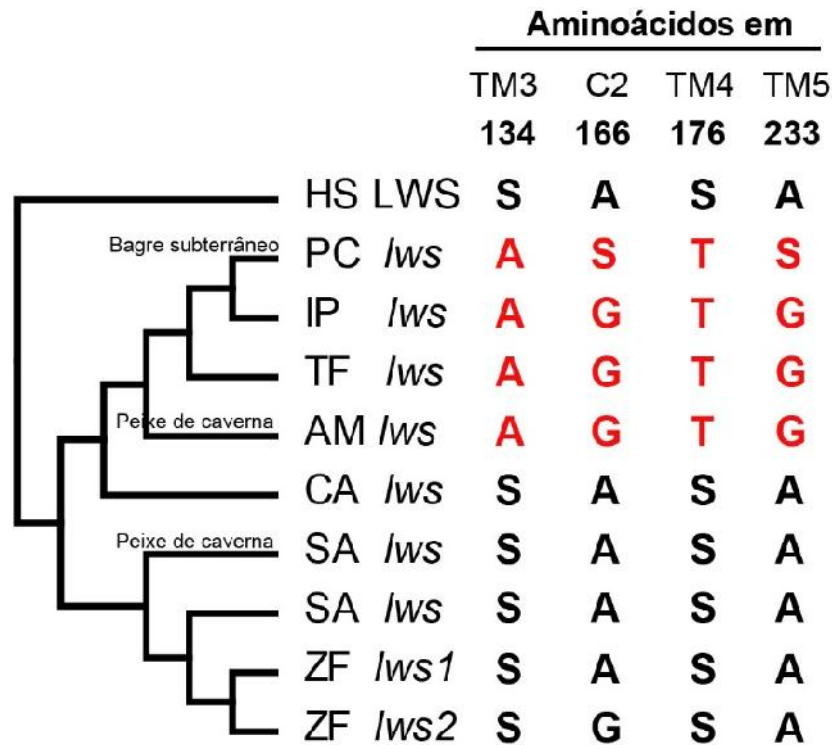


Figura 40 - Diagrama esquemático da relação filogenética da opsina *lws* de *Phreatobius cisternarum* contra seqüências publicadas. As colunas da direita mostram os aminoácidos nas posições 180, 233 e 277 conservados em algumas espécies (letras pretas) ou substituídos em outros (letras vermelhas). As seqüências de aminoácidos da opsina *lws* de *Ictalurus punctatus* (IP), *Tachysurus fulvidraco* (FT), *Sinocyclocheilus anophthalmus* (SA), *Astyanax mexicano* (AM) e *Danio rerio* (zebrafish, ZF). A opsina *lws* de *Phreatobius cisternarum* (PC) e opsina LWS de humano (HS).

3.6.4. Na análise histológica por H&E estruturas oculares foram identificadas

A cabeça de *Phreatobius cisternarum* apresenta olhos minúsculos que não podem ser vistos a olho nu. A análise histológica de H & E das secções da cabeça em espécimes adultos de *P. cisternarum* mostrou o olho perto da região dorsal da cabeça (Figura 41A'). O aumento da região ocular exibiu uma retina (r) e um epitélio pigmentado da retina (RPE) (Figura 41A''), e não foi possível diferenciar o cristalino, a córnea e íris. A retina mostrou uma estrutura pouco diferenciada e não foi possível distinguir as células fotorreceptoras e as outras camadas da retina. Por outro lado, na região lateral da cabeça foram identificados órgãos eletrosensoriais ampulares (Apêndice E). Outra característica observável nos espécimes de *P. cisternarum* foi a tonalidade da cor vermelha. Alguns indivíduos são vermelhos brilhantes, enquanto outros são roxos. Por outro lado, indivíduos de diferentes estágios eram inviáveis para análise devido ao difícil acesso ao seu habitat natural.

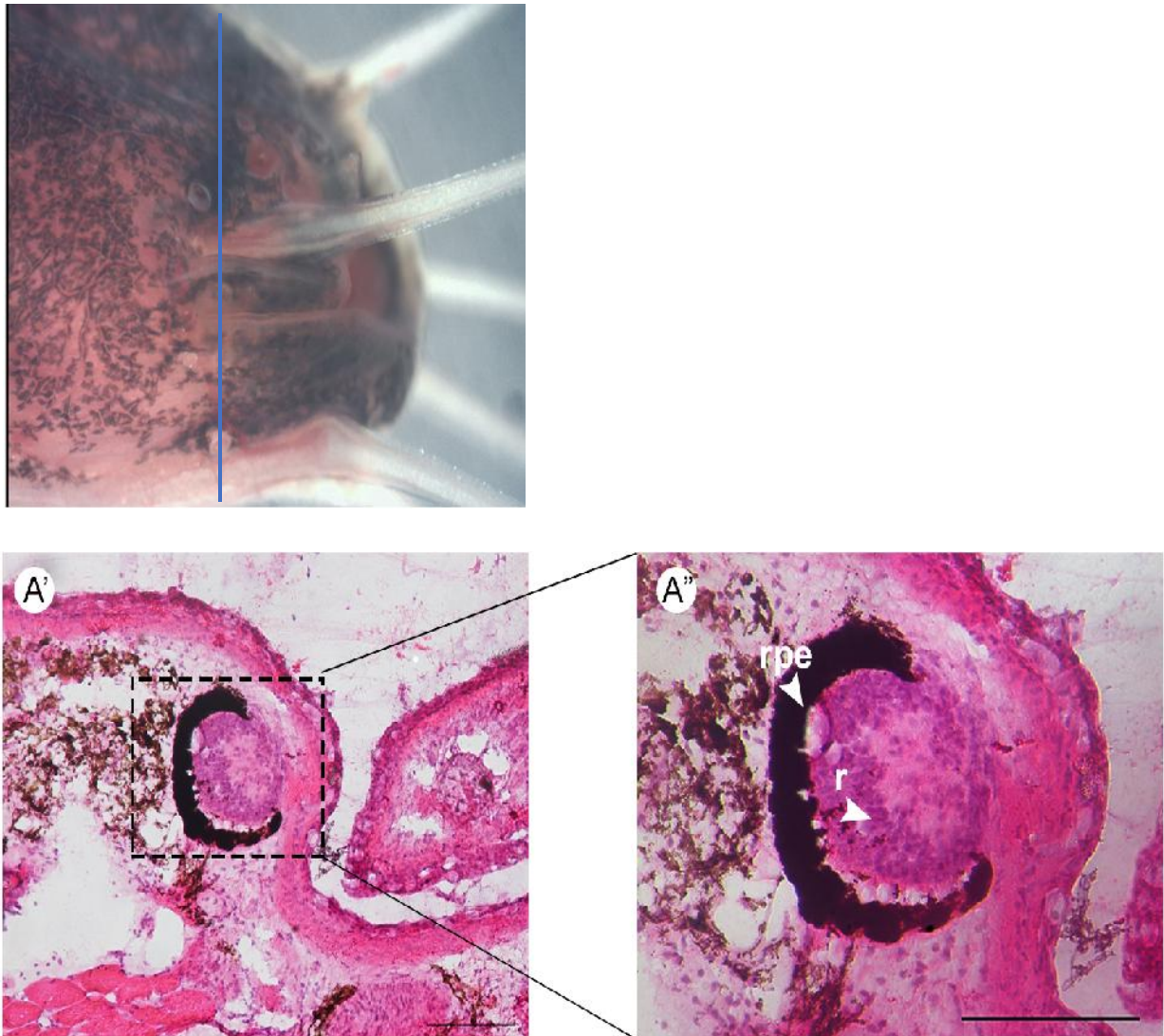


Figura 41 - Histologia do olho de *Phreatobius cisternarum*. Imagem superior mostra com a linha azul o plano de corte a nível da cabeça de *P. cisternarum*. Coloração por Hematoxilina e Eosina. (A' mostra o olho perto da região dorsal da cabeça. (A'') aumento da região delimitada pela caixa preta em A', exhibe) as estruturas oculares como epitélio pigmentado da retina (rpe) e uma retina (r) pouco diferenciada. Espessura de corte: 20µm. Escala: 0.1 mm (A', A'').

3.6.5. Neuromastos foram identificados lateralmente na cabeça e corpo

Os neuromastos são estruturas sensoriais presentes na pele dos peixes (DEZFULI et al., 2009), fornecem informações sobre as correntes de água em seu ambiente (MONTGOMERY; COOMBS; BAKER, 2001). Nos peixes subterrâneos, a redução ocular e o aumento do número de órgãos sensoriais da pele, como os neuromastos, são características convergentes (SOARES; NIEMILLER, 2013).

Para identificar se neuromastos estão presentes na pele de *P. cisternarum*, os peixes foram imersos no corante vital fluorescente DASPEI. Neuromastos individuais e superficiais apareceram como pontos amarelos fluorescentes devido ao corante. Essas estruturas foram identificadas na cabeça (Figura 42a) e no tronco (Figura 42a'), concentradas na região lateral dos indivíduos de *P. cisternarum*.

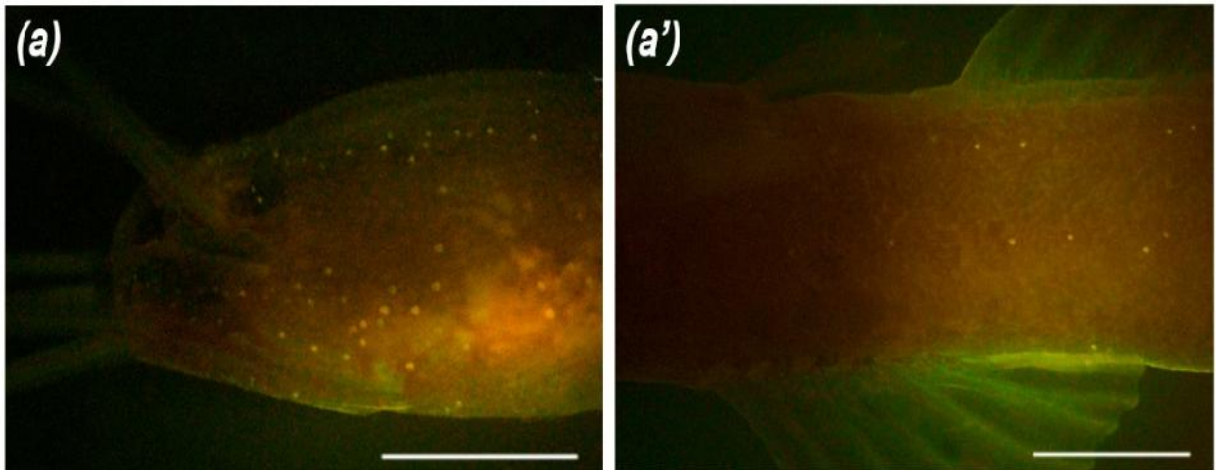


Figura 42 - Imagens fluorescentes de neuromastos com DASPEI. As distribuições de neuromastos superficiais (a) na região lateral anterior (cabeça) e (a') na região lateral posterior (tronco) de espécimes de *P. cisternarum*. Escala: 2 mm.

3.6.6. O gene *opn4m3* é expresso na epiderme

Interessantemente, identificamos a presença de um ortólogo de *opn4m* na análise do transcriptoma, o gene *opn4m3*, que exibe um códon de parada prematura. Em teleósteos, a melanopsina (*opn4*) mostra um repertório de cinco genes (*opn4x1*, *opn4x*, *opn4m1*, *opn4m2* e *opn4m3*) expressos na retina, cérebro e pele (DAVIES et al., 2011; SANDBAKKEN et al., 2012). Entretanto, *P. cisternarum* possui um gene *opn4m3* e um forte grau de redução ocular. Com base nisso, testamos a hipótese de que o gene *opn4m3* é expresso em fotorreceptores extra-retinianos. Esta suposição foi confirmada por hibridização *in situ* (HIS) (Figura 43a, 43a'). Nossos resultados de HIS detectaram expressão do gene *opn4m3* na pele (Figura 43a), não foi possível detectar expressão deste gene nos olhos de *P. cisternarum* (Figura 43a').

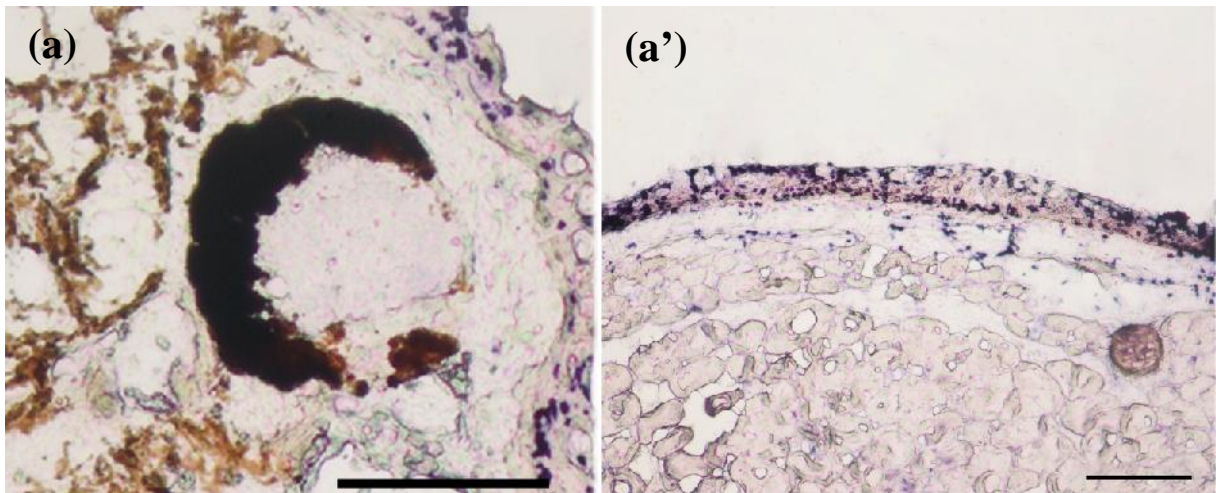


Figura 43 - Hibridização *in situ* do gene *opn4m3*. (a) *Opn4m3* não é expresso em estruturas oculares, (a'), mas expresso na superfície da pele da cabeça de *P. cisternarum*. Criosecções tem 20 μ m de espessura. Escala: 0,1 mm.

3.7. DISCUSSÃO

A análise *in silico* da região anterior de *Phreatobius cisternarum* identificou o repertório de genes de opsinas, genes ligados às funções do cristalino e genes relacionados ao epitélio pigmentado da retina. Análise das opsinas visuais identificou dois potenciais genes, *lws* e *rh1.1*, com substituições de aminoácidos típicas de *shift* ou mudanças na percepção espectral.

Através da análise histológica dos olhos, é possível perceber células centrais possivelmente do cristalino e o epitélio pigmentado da retina (RPE). No entanto, não foi possível a identificação de todas as estruturas oculares. Peixes de cavernas que tem redução ocular, como *Sinocyclocheilus anophthalmus* e *S. tileihornes*, apresentam alterações morfológicas na retina, resultado da degeneração ocular (MENG et al., 2013b, 2013a). Nossos resultados indicam que, apesar dos olhos pouco desenvolvidos, ainda é possível fazer a detecção de genes relacionados ao cristalino e ao RPE (epitélio pigmentado da retina) e não foi possível identificar, através de H&E, células fotorreceptoras ou as camadas neuronais da retina (Figura 41).

Trinta e oito genes identificados estão relacionados à diferenciação das células da fibra do cristalino foram identificados no transcriptoma de *P. cisternarum*, sugerindo que a redução ocular não aboliu a expressão de genes relacionados a desenvolvimento e manutenção do cristalino (CAVALHEIRO et al., 2017).

O repertório pouco diversificado dos genes de opsinas no transcriptoma pode estar relacionado a baixos níveis de luz disponíveis para a retina neural (EMERLING; SPRINGER, 2014), foi também observado potenciais pseudogenes de opsinas na retina de *P. cisternarum*, o que pode ser explicado pelo ambiente de pouca luminosidade resultado de pouco estímulo luminoso nesta região.

As opsinas visuais *rh1.1* e *lws* de *Phreatobius cisternarum* possuem substituições de aminoácidos que estão relacionadas a sítios de ajuste espectral conhecidos (*known tuning spectral sites*). A rodopsina (*rh1.1*) de *P. cisternarum*, *Ictalurus punctatus*, *Tachysurus fulvidraco* e *Astyanax mexicanus* apresenta dois sítios de ajuste espectral (E122I e F261Y – numeração da rodopsina bovina) (Figura 38) que contribuem com a absorção máxima (λ_{max}) de 504 nm (YOKOYAMA et al., 2008). Este desvio para o vermelho é típico da rodopsina de peixes em ambientes de água turva (HAUSER; CHANG, 2017), como o ambiente aquático da bacia amazônica (LOEW; LYTHGOE, 1985). Este resultado sugere que os desvios da rodopsina em comprimentos de onda mais longos por E122I e F261Y poderiam contribuir no

processo de visualização de *P. cisternarum* (LOEW; LYTHGOE, 1985). No caso da opsina visual *lws*, identificamos treze aminoácidos comuns entre as espécies da ordem Siluriformes (Figura 39). Estes podem representar regiões de motivos conservados para estas espécies de bagres. Da mesma forma, quatro substituições de aminoácidos na opsina *lws* (S134A; A166S/G; S176T; A233S/G - numeração da opsina LWS humana) são comuns entre *P. cisternarum* e o peixe de caverna *A. mexicanus* (Figura 40). No entanto, os dois alelos *lws* do peixe de caverna *S. anophthalmus* não mostram substituições de aminoácidos nestas posições (Figura 40). Com base nesses resultados, poderíamos dizer que essas substituições podem ser possíveis sítios para o ajuste spectral das opsinas *lws* de *P. cisternarum* e *A. mexicanus* (SEEHAUSEN et al., 2008; TERAJ et al., 2006; WEADICK; CHANG, 2007), e que estão envolvidas a sítios de ajuste spectral (CARLETON, 2009; STIEB et al., 2017; YOKOYAMA, 2000).

Em *P. cisternarum*, um sítio importante para o ajuste spectral da opsina *lws* (A233S) foi identificado (WILLIAMS et al., 1992). A substituição de Serina (S) em vez de Alanina (A) na posição (A233S) contribuiria com um max <541 nm, enquanto os valores intermediários de max (560 - 541nm) seriam experimentados pelas opsinas *lws* de *A. mexicanus*, *I. punctatus* e *T. fulvidraco* que apresentam Glicina (G) em vez de Alanina (A) na posição A233G (WILLIAMS et al., 1992) (Figura 40). No caso de *S. anophthalmus*, as opsinas visuais não apresentam substituições de aminoácidos nas posições analisadas. No entanto, estudos anteriores relatam que este peixe de caverna apresenta rodopsinas e opsinas cone, que são significativamente subexpressas (MENG et al., 2013a). Mudanças espectrais semelhantes do pigmento *lws* são relatadas em peixes ciclídeos (CARLETON; SPADY; COTE, 2005; MAAN et al., 2006; TERAJ et al., 2017). Isso sugere que o deslocamento de *lws* a um comprimento de onda menor (max <541 nm) pela substituição A233S poderia contribuir no reconhecimento e comunicação entre indivíduos da espécie *P. cisternarum*.

As substituições de aminoácidos, nas opsinas *lws* e *rh1.1*, estão localizadas nas regiões da bolsa de ligação do cromóforo, e provavelmente alteram o ambiente do cromóforo (PALCZEWSKI et al., 2000; WEADICK; CHANG, 2007). A confirmação desses resultados através de experimentos de mutagênese nos permitiria confirmar o deslocamento de max dessas substituições críticas de aminoácidos (YOKOYAMA, 1997). Além disso, essas mudanças no max poderiam contribuir para adaptações visuais em ambientes subterrâneos.

Interessantemente, identificamos a presença de um ortólogo de *opn4m* na análise do transcriptoma, o gene *opn4m3*, que exibe um códon de parada prematura. Em teleósteos, a melanopsina (*opn4*) mostra um repertório de cinco genes (*opn4x1*, *opn4x*, *opn4m1*, *opn4m2* e

opn4m3) expressos na retina, cérebro e pele (DAVIES et al., 2011; SANDBAKKEN et al., 2012). Entretanto, *P. cisternarum* possui um gene *opn4m3* e um forte grau de redução ocular. Com base nisso, testamos a hipótese de que o gene *opn4m3* é expresso em fotorreceptores extra-retinianos. Esta suposição foi confirmada por hibridização *in situ* (Figura 43a, a'). A expressão extra-retiniana desse ortólogo *opn4m* (Figura 43a') está possivelmente associada à regulação do relógio periférico (CAVALLARI et al., 2011). Além disso, seria interessante determinar as consequências das perdas de genes ortólogos *opn4* na capacidade sensorial desta espécie.

A redução ocular e o aumento de órgãos sensoriais da pele, como os neuromastos, são características convergentes que permitem que peixes subterrâneos sobrevivam em seus habitats (SOARES; NIEMILLER, 2013). Estruturas sensoriais como neuromastos e órgãos eletrosensoriais ampulares foram identificadas na pele dos espécimes de *Phreatobius cisternarum*. Os neuromastos do bagre subterrâneos são distribuídos na região lateral na pele da cabeça (Figura 42a) e lateral posterior (tronco) (Figura 42a'), distribuição semelhante é relatada em outros peixes subterrâneos (DEZFULI et al., 2009; MONTGOMERY; COOMBS; BAKER, 2001). Estas estruturas fornecem informações sobre as correntes de água em seu ambiente (MONTGOMERY; COOMBS; BAKER, 2001), e possivelmente contribuem para a reorientação espacial dos peixes (SOVRANO et al., 2018). Por outro lado, os órgãos eletrosensoriais ampulares (Apêndice E) foram observados com coloração H&E. Essas estruturas eram notórias na região lateral na pele da cabeça. Eles podem contribuir para a orientação espacial e nas inter-relações em condições de pouca luz (SOARES; NIEMILLER, 2013). Portanto, essas estruturas sensoriais de *P. cisternarum* poderiam contribuir para sua adaptação em um ambiente subterrâneo.

3.8. CONCLUSÕES

Através da análise *in silico* foram identificados no transcriptoma da cabeça de *Phreatobius cisternarum* 11 genes de opsinas, das quais 3 são visuais e 8 não visuais, com sinais de pseudogeneização. Pela análise *in silico*, foram identificadas substituições de aminoácidos nas opsinas visuais *lws* e *rh1.1*, as quais são sítios de ajuste espectral conhecidos. As análises histológicas da cabeça de *P. cisternarum* apresentou olhos reduzidos, com retina não estratificada com o epitélio pigmentado e sem cristalino; enquanto a análise *in silico* exibiu genes do cristalino e epitélio pigmentado. Em *P. cisternarum*, os neuromastos estão presentes ao longo do corpo e mais abundantes na cabeça. Assim mesmo, foi identificado a expressão de *opn4m3* na pele da cabeça.

4. DISCUSSÕES GERAIS

Neste estudo, trabalhamos com duas espécies que vivem em ambientes de luminosidade diferentes, *Aanableps anableps* de habitat de superfície e *Phreatobius cisternarum* de um ambiente subterrâneo. *Danio rerio* (zebrafish) foi utilizada como padrão na busca de opsinas nas espécies de estudos. O zebrafish é um excelente modelo na compreensão das opsinas devido ao genoma já sequenciado e suas opsinas já caracterizadas (DAVIES et al., 2015).

As espécies de habitat de superfície, *A. anableps* e zebrafish, mostram um repertório diverso de genes de opsinas, 30 (OWENS et al., 2012, 2009; BEAUDRY et al., 2017) e 42 (DAVIES et al., 2012; MORROW et al., 2011; DAVIES et al., 2015), respectivamente. No primeiro caso, *A. anableps*, peixe de superfície, seus grandes olhos esféricos lhe proporcionam uma visão simultânea acima e abaixo da água, permitindo a exploração eficiente de seu habitat de estuário (MILLER, 1979; OWENS et al., 2012). Igualmente, zebrafish é uma espécie diurna, ativa durante o dia, e vive em águas superficiais. Esses estilos de vida sugere a necessidade de uma visão fotópica bem desenvolvida, com a capacidade de distinguir cores (NEUHAUSS, 2010). Assim mesmo, essa diversidade de genes de opsinas nestas espécies provavelmente confere-lhes uma série de vantagens para a sobrevivência em um ambiente fótico dinâmico (DAVIES et al., 2015). No caso de *P. cisternarum*, tem olhos muitos pequenos adaptados ao seu ambiente subterrâneo (MURIEL-CUNHA; DE PINNA, 2005). Esta espécie exibiu um repertório pouco diversificado de genes de opsinas. Baseando-nos nestes resultados poderíamos dizer que a heterogeneidade ambiental impulsiona a duplicação e divergência das opsinas (Tabela 5, Figura 26) na espécie *A. anableps* (DAVIES et al., 2015; RENNISON; OWENS; TAYLOR, 2012), enquanto habitats subterrâneos, considerados como ambientes homogêneos, com baixos níveis de luz pode estar relacionada com a pseudogeneização das opsinas em *P. cisternarum* (Tabela 7, Figura 37) (EMERLING; SPRINGER, 2014; TRAJANO, 2007).

Em relação ao repertório de genes de opsinas visuais nas espécies em estudo, 10 opsinas visuais (Tabela 5) são relatadas para *A. anableps* (OWENS et al., 2009). Enquanto 3 opsinas visuais (Tabela 7) foram identificadas para *P. cisternarum* neste trabalho. O grande número de genes de opsinas visuais em *A. anableps* em relação ao *P. cisternarum* poderia estar em relação ao seu habitat superficial. Isso provavelmente confere-lhe uma série de vantagens para a sobrevivência neste ambiente fótico dinâmico (DAVIES et al., 2015).

Um repertório diverso de genes de opsinas não visuais apresenta *A. anableps* com respeito a *P. cisternarum* (Tabela 5 e Tabela 7). Nosso resultado mostrou que apenas cinco genes das opsinas não visuais (*opn4m3*, *rgr-1*, *rrh*/peropsina, *tmt3a* e *va-1*) são comuns entre *A. anableps*, *P. cisternarum* e zebrafish (*Danio rerio*) (Figura 44). Esses resultados sugerem que esses cinco genes poderiam ter uma função essencial no processo visual, porque são comuns entre essas espécies (*A. anableps*, *P. cisternarum* e zebrafish) que vivem em ambientes de luminosidade diferentes. Da mesma forma, um número maior de genes de opsinas é comum entre espécies de superfície, *A. anableps* e zebrafish, do que entre espécies de habitat com luminosidade diferente, como são *A. anableps* e *P. cisternarum* (Figura 44).

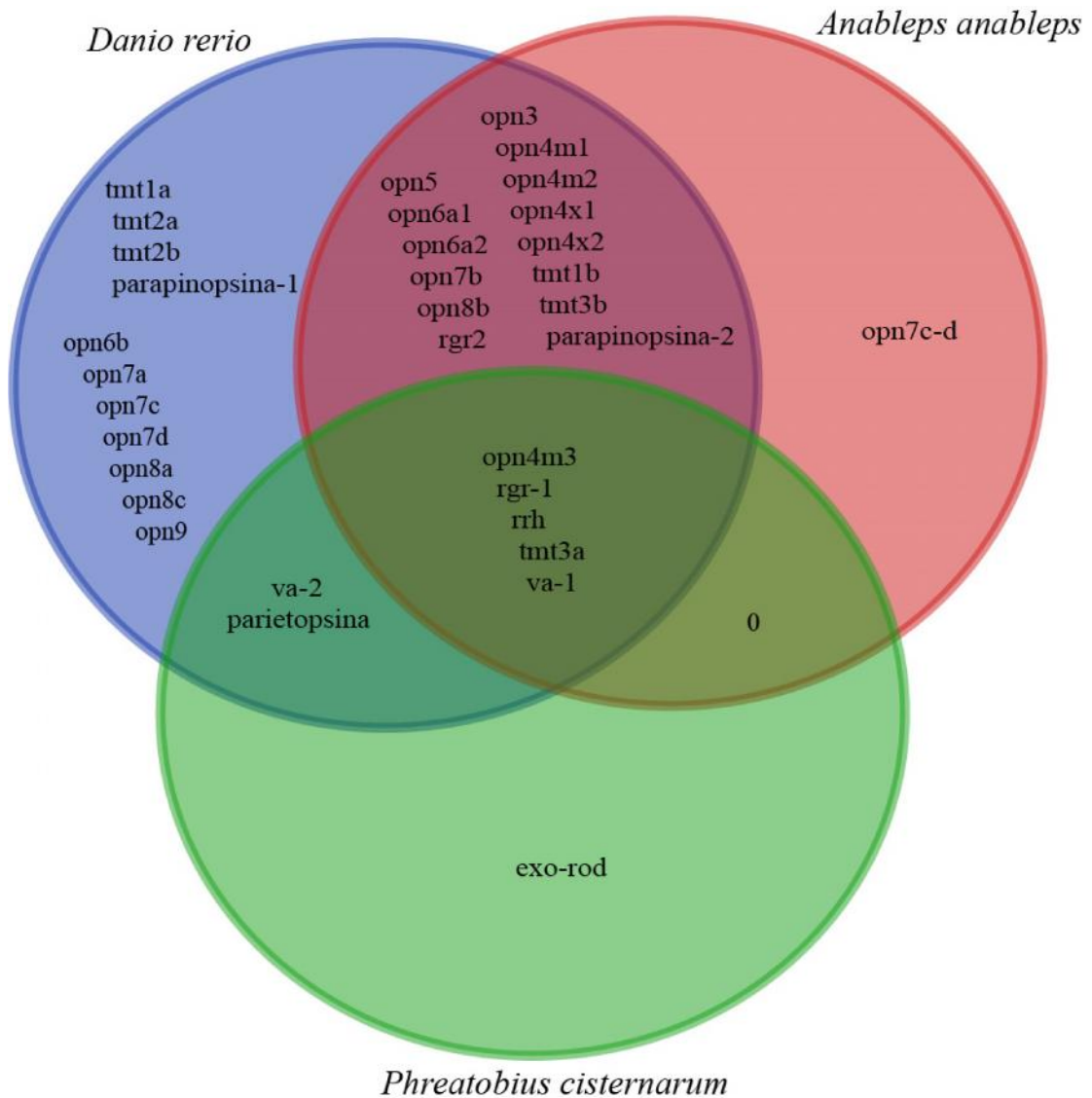


Figura 44 - Genes de opsinas não visuais comuns e únicos em *Anableps anableps* e *Phreatobius cisternarum*. Diagrama de Venn mostra o número de genes compartilhados em *A. anableps*, *P. cisternarum* e zebrafish (*Danio rerio*) (diagrama criado usando <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Um número maior de genes comuns foi encontrado nas espécies *A. anableps* e zebrafish (14 genes). Além disso, *A. anableps*, *P. cisternarum* e zebrafish compartilharam cinco genes de opsinas não visuais em comuns.

Igualmente, cada espécie apresentou genes de opsina não visuais exclusivos, por exemplo, *A. anableps* e *P. cisternarum* exibiram o gene *opn7c-d* e o gene *exo-rod*, respectivamente. Enquanto, zebrafish mostrou onze genes de opsinas não visuais (Figura 44). Esse grande número de opsinas não visuais exclusivos no zebrafish poderia ter relação com a necessidade de uma visão fotópica bem desenvolvida (NEUHAUSS, 2010).

Os peixes usam diferentes estratégias de mecanismos moleculares em seus pigmentos visuais (HAUSER; CHANG, 2017). Em *P. cisternarum*, por meio da análise *in silico*, foram identificadas substituições de aminoácidos nas opsinas visuais *lws* e *rh1.1*. A opsina *rh1.1* apresentaram dois sítios de ajuste espectral conhecido (E122I e F261Y), que contribuem com max de 504 nm (YOKOYAMA et al., 2008). Essa mudança para o vermelho é típico da rodopsina de peixes em ambientes de água turva (HAUSER; CHANG, 2017), como o ambiente aquático da bacia amazônica (LOEW; LYTHGOE, 1985). Enquanto a opsina *lws*, exibiu um sítio de ajuste espectral conhecido (A233S), e que contribuem com uma mudança do max <541 nm (WILLIAMS et al., 1992). Esse ajuste espectral poderia contribuir no reconhecimento e comunicação entre indivíduos da espécie *P. cisternarum*.

Em *A. anableps*, por meio de hibridização *in situ*, os genes das opsinas não visuais *tmt1b*, *tmt3b*, *opn5*, *parapinopsina-2* e *rgr2* apresentam expressão espacial assimétrica na retina dos indivíduos adultos, enquanto apenas o gene *rgr2* é regulada assimetricamente nas retinas das larvas, assim como também os genes das opsinas *tmt1b*, *tmt3b* e *rgr2* exibem uma expressão assimétrica durante seu desenvolvimento ocular, isto possivelmente contribuíam no desenvolvimento ocular em *A. anableps*.

Por fim, essas estratégias de mecanismos moleculares nos genes das opsinas nas espécies de estúdio, sejam estas substituições de aminoácidos das opsinas visuais em *P. cisternarum* e expressão assimétrica das opsinas não visuais em *A. anableps*, poderiam contribuir na mudança da sensibilidade espectral do fotopigmento e na adaptação visual destas espécies a ambientes de luminosidade diferentes.

5. CONCLUSÕES GERAIS

As investigações realizadas nesta tese abordaram aspectos da base molecular das adaptações dos genes das opsinas de *Anableps anableps* e *Phreatobius cisternarum* através da análise *in silico* e histologia. Organismos que vivem em diversos ambientes fóticos, como peixes, desenvolveram uma série de estratégias no nível molecular para se adaptar a esses ambientes, como as substituições na sequência de aminoácidos das opsinas, alteração dos cromóforos, alterações nos padrões de expressão e no tamanho do repertório de opsinas (HAUSER; CHANG, 2017).

No **capítulo 1** foi abordado o estudo de uma espécie de ambiente aéreo-aquático, *Anableps anableps*, que vive na superfície da água e por isso está exposta a um ambiente de heterogeneidade espectral. Seus grandes olhos lhe proporcionam uma visão aérea e aquática simultânea, possuindo adaptações anatômicas e funcionais. O repertório diversificado de genes de opsinas (20 opsinas não visuais) no transcriptoma de *A. anableps*, bem como seu padrão de expressão espacial indicam mecanismos moleculares de adaptação da espécie ao seu hábitat aéreo-aquático.

No **capítulo 2**, tratou-se de uma espécie de ambiente subterrâneo, *Phreatobius cisternarum*. Esta espécie possui olhos minúsculos, vive em lençol freático, e pouco se sabe sobre a degeneração ocular nesses ambientes. O repertório pouco diversificado de genes de opsinas (11 opsinas: 3 opsinas visuais, 8 opsinas não visuais) no transcriptoma e olhos reduzidos em *P. cisternarum* podem estar associados ao seu habitat subterrâneo, com pouca a nenhuma luminosidade.

Estes dois casos ilustram a contribuição dos genes das opsinas como possíveis mecanismos de adaptação a ambientes fóticos atípicos.

PUBLICAÇÕES

Beaudry, F.E.G. ; Iwanicki, T.W. ; **Mariluz, B.R.Z**; Darnet, S. ; Brinkmann, H. ; Schneider, P. ; Taylor, J.S. The non-visual opsins: eighteen in the ancestor of vertebrates, astonishing increase in ray-finned fish, and loss in amniotes. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, v. 328, n. 7, p. 685–696, 2017.

Bertha Mariluz^{1*}, Louise Perez^{1*}, Amy Liu², Jamily Lorena¹, Danielle Salgado¹, Marcos P. Sousa¹, Sylvain Darnet¹, Janice Muriel-Cunha¹, John S. Taylor², Patricia N. Schneider¹
Phreatobius cisternarum transcriptome provides insights into visual adaptation to subterranean environments (*In preparation*)

Pôster – Congresso Internacional de Genética 2017

MARILUZ, BRZ; SOUSA, M.P.A; PEREZ, LN.; SCHNEIDER, PN. Transcriptomic analysis of subterranean catfish *Phreatobius dracunculus*. Congresso Internacional de Genética realizado no período de 12 a 15 de setembro de 2017 em Águas de Lindoia, SP, Brasil. *Modalidade de pôster*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. L. et al. *Cottus specus*, a new troglomorphic species of sculpin (Cottidae) from southeastern Missouri. **Zootaxa**, v. 3609, n. 5, p. 484–494, 2013.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
- ARAUJO, M. R. **Análise do padrão de expressão de genes melanopsina durante o desenvolvimento do peixe de quatro olhos *Anableps anableps***. 2008. 31 f. Tese de Mestrado. Laboratório de Evolução e Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Para, Belém, Brasil.
- ARSHAVSKY, V. Y.; LAMB, T. D.; PUGH, E. N. G Proteins and Phototransduction. **Annual Review of Physiology**, v. 64, n. 1, p. 153–187, 2002.
- AYOUB, G. Evolution of the Visual System. An Organ of Exquisite Perfection. In: TOMBRAN-TINK, J.; BARNSTABLE, C. (Eds.). **Visual Transduction and Non-Visual Light Perception**. NJ, USA: Humana Press., 2008. p. 3–16.
- BAN, E. et al. The signaling pathway in photoresponses that may be mediated by visual pigments in erythrophores of Nile tilapia. **Pigment Cell Res.**, v. 18, p. 360–369, 2005.
- BEAUDRY, F. E. G. et al. The non-visual opsins: eighteen in the ancestor of vertebrates, astonishing increase in ray-finned fish, and loss in amniotes. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 328, n. 7, p. 685–696, 2017.
- BEJARANO-ESCOBAR, R. et al. Molecular characterization of cell types in the developing, mature, and regenerating fish retina. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 24, n. 1, p. 127–158, 2014.
- BELLINGHAM, J. et al. Evolution of melanopsin photoreceptors: Discovery and characterization of a new melanopsin in nonmammalian vertebrates. **PLoS Biology**, v. 4, n. 8, p. 1334–1343, 2006.
- BELLINGHAM, J.; FOSTER, R. G. Opsins and mammalian photoentrainment. **Cell and Tissue Research**, v. 309, n. 1, p. 57–71, 2002.
- BERTI, R. et al. Eye degeneration in the blind cave-dwelling fish *Phreatichthys andruzzii*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 79, n. 7, p. 1278–1285, 2001.
- BETANCUR-R, R. et al. Phylogenetic classification of bony fishes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, n. 1, p. 162, 2017.
- BLACKSHAW, S.; SNYDER, S. Encephalopsin: a novel mammalian extraretinal opsin discretely localized in the brain. **The Journal of neuroscience**, v. 19, n. 10, p. 3681–3690, 1999.

BLACKSHAW, S.; SNYDER, S. H. Parapinopsin, a novel catfish opsin localized to the parapineal organ, defines a new gene family. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 21, p. 8083–8092, 1997.

BOCKMANN, F. A.; CASTRO, R. M. C. The blind catfish from the caves of Chapada Diamantina, Bahia, Brazil (Siluriformes: Heptapteridae): Description, anatomy, phylogenetic relationships, natural history, and biogeography. **Neotropical Ichthyology**, v. 8, n. 4, p. 673–706, 2010.

BORWEIN, B.; HOLLENBERG, M. J. The photoreceptors of the “four eyed” fish, *Anableps anableps* L. **Journal of Morphology**, v. 140, n. 4, p. 405–441, 1973.

BOWMAKER, J. K. The visual pigments of fish. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 15, n. 1, p. 1–31, 1995.

BOWMAKER, J. K. Evolution of vertebrate visual pigments. **Vision Research**, v. 48, n. 20, p. 2022–2041, 2008.

BOWMAKER, J. K. Adaptations of Photoreceptors and Visual Pigments. In: FARRELL, A. et al. (Eds.). **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**. Amsterdam: Elsevier Inc., 2011. p. 116–122.

BOWMAKER, J. K.; HUNT, D. M. Evolution of vertebrate visual pigments. **Current Biology**, v. 16, n. 13, p. R484–R489, 2006.

BOWNDS, D. Site of attachment of retinal in rhodopsin. **Nature**, v. 216, 1967.

CARLETON, K. Cichlid fish visual systems: mechanisms of spectral tuning. **Integrative zoology**, v. 4, n. 1, p. 75–86, 2009.

CARLETON, K. L. et al. Visual sensitivities tuned by heterochronic shifts in opsin gene expression. **BMC Biology**, v. 6, n. 22, p. 1–14, 2008.

CARLETON, K. L. et al. Proximate and Ultimate Causes of Variable Visual Sensitivities : Insights from Cichlid Fish Radiations. **Genesis**, v. 54, p. 299–325, 2016.

CARLETON, K. L.; KOCHER, T. D. Cone Opsin Genes of African Cichlid Fishes : Tuning Spectral Sensitivity by Differential Gene Expression. **Mol. Biol. Evol.**, v. 18, n. 8, p. 1540–1550, 2001.

CARLETON, K. L.; SPADY, T. C.; COTE, R. H. Rod and cone opsin families differ in spectral tuning domains but not signal transducing domains as judged by saturated evolutionary trace analysis. **Journal of Molecular Evolution**, v. 61, n. 1, p. 75–89, 2005.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; CASTRO, A. C. L. Diversidade das assembléias de peixes estuarinos da ilha dos Caranguejos, Maranhão. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 41, n. 1, p. 48–57, 2008.

CAVALHEIRO, G. R. et al. N-myc regulates growth and fiber cell differentiation in lens development. **Developmental Biology**, v. 429, n. 1, p. 105–117, 2017.

- CAVALLARI, N. et al. A blind circadian clock in cavefish reveals that opsins mediate peripheral clock photoreception. **PLoS Biology**, v. 9, n. 9, p. e1001142, 2011.
- CHEN, P. et al. A photic visual cycle of rhodopsin regeneration is dependent on Rgr. **Nature Genetics**, v. 28, n. 3, p. 256–260, 2001.
- CHENG, C. L.; FLAMARIQUE, I. N. New mechanism for modulating colour vision. **Nature**, v. 428, p. 279–280, 2004.
- CHOI, Y.; CHAN, A. P. PROVEAN web server : a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. **Bioinformatics**, v. 31, n. 16, p. 2745–2747, 2015.
- CONESA, A. et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, p. 3674–3676, 2005.
- COOPER, H. M., HERBIN, M., & NEVO, E. Visual System of a Naturally Microphthalmic Mammal : The Blind Mole Rat, *Spalax ehrenbergi*. **The Journal of comparative neurology**, v. 328, p. 313–350, 1993.
- DALTON, B. E. et al. Spectral tuning by opsin coexpression in retinal regions that view different parts of the visual field. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1797, p. 1–9, 2014.
- DAVID-GRAY, Z. K. et al. Adaptive loss of ultraviolet-sensitive/violet-sensitive (UVS/VS) cone opsin in the blind mole rat (*Spalax ehrenbergi*). **European Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 1186–1194, 2002.
- DAVIES, W. I. L. et al. Functional diversity of melanopsins and their global expression in the teleost retina. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 68, p. 4115–4132, 2011.
- DAVIES, W. I. L. et al. An extended family of novel vertebrate photopigments is widely expressed and displays a diversity of function. **Genome Research**, v. 25, n. 11, p. 1666–1679, 2015.
- DAVIES, W. I. L.; COLLIN, S. P.; HUNT, D. M. Molecular ecology and adaptation of visual photopigments in craniates. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 13, p. 3121–3158, 2012.
- DE LIMA, J. et al. A putative RA-like region in the brain of the scale-backed antbird, *Willisornis poecilinotus* (Furnariides, Suboscines, Passeriformes, Thamnophilidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, p. 249–254, 2015.
- DEZFULI, B. S. et al. The Lateral Line System in Larvae of the Blind Cyprinid Cavefish, *Phreatichthys andruzzii*. **Anat Rec**, v. 292, p. 423–430, 2009.
- DHAR, A. et al. Biology, Genome Organization, and Evolution of Parvoviruses in Marine Shrimp. **Advances in Virus Research**, v. 89, p. 85–139, 2014.
- DÍAZ, N. M.; MORERA, L. P.; GUIDO, M. E. Melanopsin and the Non-visual Photochemistry in the Inner Retina of Vertebrates. **Photochemistry and Photobiology**, v. 92, n. 1, p. 29–44, 2016.

DRIVENES, Ø. et al. Isolation and characterization of two teleost melanopsin genes and their differential expression within the inner retina and brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 456, p. 84–93, 2003.

EMERLING, C. A.; SPRINGER, M. S. Eyes underground : Regression of visual protein networks in subterranean mammals. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 78, p. 260–270, 2014.

ENRIGHT, J. M. et al. Cyp27c1 Red-Shifts the Spectral Sensitivity of Photoreceptors by Converting Vitamin A1 into A2. **Current Biology**, v. 25, n. 23, p. 3048–3057, 2015.

FAIRCLOTH, B. C. et al. A Phylogenomic Perspective on the Radiation of Ray-Finned Fishes Based upon Targeted Sequencing of Ultraconserved Elements (UCEs). **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

FANG, X. et al. Genome-wide adaptive complexes to underground stresses in blind mole rats Spalax. **Nature Communications**, v. 5, p. 3966, 2014.

FEENSTRA, M. et al. Detection of a Putative HLA-A * 31012 Processed (Intronless) Pseudogene in a Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 34, p. 26–34, 2000.

FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap. **Society for the Study of Evolution**, v. 39, n. 1, p. 1–15, 1985.

FERNANDEZ, L. et al. A new phreatic catfish of the genus Phreatobius Goeldi 1905 from groundwaters of the Iténez River, Bolivia (Siluriformes: Heptapteridae). **Zootaxa**, n. 1626, p. 51–58, 2007.

FERNÁNDEZ, L.; PINNA, M. C. C. DE. Phreatic Catfish of the Genus *Silvinichthys* from Southern South America (Teleostei, Siluriformes, Trichomycteridae). **Copeia**, v. 1, p. 100–108, 2005.

FISCHER, A. J.; BOSSE, J. L.; EL-HODIRI, H. M. Reprint of: The ciliary marginal zone (CMZ) in development and regeneration of the vertebrate eye. **Experimental Eye Research**, v. 116, p. 199–204, 2013.

FISCHER, R. M. et al. Co-Expression of VAL- and TMT-Opsins Uncovers Ancient Photosensory Interneurons and Motorneurons in the Vertebrate Brain. **PLoS Biology**, v. 11, n. 6, 2013.

FU, L. et al. CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 23, p. 3150–3152, 2012.

HAAS, B. J. et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. **Nature Protocols**, v. 8, n. 8, p. 1494–1512, 2013.

HALFORD, S. et al. Characterization of a novel human opsin gene with wide tissue expression and identification of embedded and flanking genes on chromosome 1q43. **Genomics**, v. 72, n. 2, p. 203–208, 2001.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HANKINS, M.; DAVIES, W. I. L.; FOSTER, R. G. The Evolution of Non-visual Photopigments in the Central Nervous System of Vertebrates. In: HUNT, D. et al. (Eds.). **Evolution of Visual and Non-visual Pigments**. New York: Springer Science-Business Media, 2014. p. 65–104.

HANKINS, M. W.; PEIRSON, S. N.; FOSTER, R. G. Melanopsin: an exciting photopigment. **Trends in Neurosciences**, v. 31, n. 1, p. 27–36, 2008.

HARRIS, J. A. et al. Neomycin-induced hair cell death and rapid regeneration in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*). **JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, v. 4, n. 2, p. 219–234, 2003.

HAUSER, F. E.; CHANG, B. S. Insights into visual pigment adaptation and diversity from model ecological and evolutionary systems. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 47, p. 110–120, 2017.

HAZEL, I.V. et al. Short-wavelength sensitive opsin (SWS1) as a new marker for vertebrate phylogenetics. **BMC Evolutionary Biology**, v. 6, p. 97, 2006.

HELFMAN, G. et al. **The Diversity of Fishes: Biology, Evolution, and Ecology**. 2nd. ed. West Sussex, PO19 8SQ, UK: Wiley-Blackwell, 2009.

HIROTSUNE, S. et al. An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene. **Letters to Nature**, v. 423, p. 91–100, 2003.

HOFMANN, C. M.; CARLETON, K. L. Gene duplication and differential gene expression play an important role in the diversification of visual pigments in fish. **Integrative and Comparative Biology**, v. 49, n. 6, p. 630–643, 2009.

JEFFERY, W. R. Regressive Evolution in *Astyanax* Cavefish. **Annu Rev Genet.**, v. 43, p. 25–47, 2009.

JENKINS, A. et al. VA Opsin, Melanopsin, and an Inherent Light Response within Retinal Interneurons. **Current Biology**, v. 13, p. 1269–1278, 2003.

JIANG, M.; PANDEY, S.; FONG, H. K. W. An opsin homologue in the retina and pigment epithelium. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 34, n. 13, p. 3669–3678, 1993.

JONES, D. T.; TAYLOR, W. R.; THORNTON, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Comput Appl Biosci.**, v. 8, n. 3, p. 275–282, 1992.

KANDOUZ, M. et al. Connexin43 pseudogene is expressed in tumor cells and inhibits growth. **Oncogene**, v. 23, p. 4763–4770, 2004.

KARNIK, S. S. et al. Cysteine residues 110 and 187 are essential for the formation of correct structure in bovine rhodopsin. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 8459–8463, 1988.

KIMCHI, T.; TERKEL, J. Seeing and not seeing. **Curr. Opin. Neurobiol.** 12, v. 12, p. 728–734, 2002.

KINGSTON, A. C. N.; CRONIN, T. W. Diverse Distributions of Extraocular Opsins in Crustaceans, Cephalopods, and Fish. **Integrative and Comparative Biology**, v. 56, n. 5, p. 820–833, 2016.

KLAPPER, S. D. et al. Biophysical properties of optogenetic tools and their application for vision restoration approaches. **Front. Syst. Neurosci.**, v. 10, p. 74, 2016.

KOJIMA, D. et al. Differential expression of duplicated VAL-opsin genes in the developing zebrafish. **Journal of Neurochemistry**, v. 104, n. 5, p. 1364–1371, 2008.

KONDRASIV, S. L. et al. Coloration of corneas in fish. A list of species. **Vision Res.**, v. 26, n. 2, p. 287–290, 1986.

KOYANAGI, M. et al. Bistable UV pigment in the lamprey pineal. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 17, p. 6687–6691, 2004.

KOYANAGI, M. et al. Homologs of vertebrate Opn3 potentially serve as a light sensor in nonphotoreceptive tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 13, p. 4998–5003, 2013.

KOYANAGI, M. et al. Diversification of non-visual photopigment parapinopsin in spectral sensitivity for diverse pineal functions. **BMC Biology**, v. 13, p. 73, 2015.

KOYANAGI, M.; TERAOKA, A. Diversity of animal opsin-based pigments and their optogenetic potential. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1837, p. 710–716, 2014.

KRISHNAN, J.; ROHNER, N. Cavefish and the basis for eye loss. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, p. 20150487, 2017.

LAMB, T. D. Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 36, p. 52–119, 2013.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. **Nucleic acids research**, v. 44, p. W242–W245, 2016.

LIEBMAN, P. A.; GRANDA, A. M. Super dense carotenoid spectra resolved in single cone oil droplets. **Nature**, v. 253, n. 5490, p. 370–372, 1975.

LIN, J. J. et al. The rises and falls of opsin genes in 59 ray-finned fish genomes and their implications for environmental adaptation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

- LIN, S. W. et al. Mechanism of Spectral Tuning in Blue Cone Visual Pigments. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 38, p. 24583–24591, 1998.
- LOEW, E. R.; LYTHGOE, J. N. The ecology of colour vision. **Endeavour**, v. 9, n. 4, p. 170–174, 1985.
- LYTHGOE, J. N. Light and Vision in the Aquatic Environment. In: ATEMA J., FAY R.R., POPPER A.N., T. W. N. (EDS) (Ed.). **Sensory Biology of Aquatic Animals**. Springer, New York, NY: Springer-Verlag New York Inc., 1988. p. 57–82.
- MAAN, M. E. et al. Sensory Drive in Cichlid Speciation. **Am. Nat.**, v. 167, n. 6, p. 947–954, 2006.
- MANO, H.; KOJIMA, D.; FUKADA, Y. Exo-rhodopsin: A novel rhodopsin expressed in the zebrafish pineal gland. **Molecular Brain Research**, v. 73, n. 1–2, p. 110–118, 1999.
- MATHGER, L. M.; ROBERTS, S. B.; HANLON, R. T. Evidence for distributed light sensing in the skin of cuttlefish, *Sepia officinalis*. **Biol. Lett.**, v. 6, n. 5, p. 600–603, 2010.
- MAX, M. et al. Pineal opsin: A nonvisual opsin expressed in chick pineal. **Science**, v. 267, n. 5203, p. 1502–1506, 1995.
- MENG, F. et al. Evolution of the eye transcriptome under constant darkness in *Sinocyclocheilus cavefish*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 7, p. 1527–1543, 2013a.
- MENG, F. et al. Differentially-expressed opsin genes identified in *Sinocyclocheilus cavefish* endemic to China. **Current Zoology**, v. 59, n. 2, p. 170–174, 2013b.
- MIGHELL, A. et al. Vertebrate pseudogenes. **FEBS Letters**, v. 468, p. 109–114, 2000.
- MILLER, R. R. Ecology, habits and relationships of the middle American cuatro ojos, *Anableps dowi* (Pisces: Anablepidae). **Copeia**, v. 1979, n. 1, p. 82–91, 1979.
- MINAMOTO, T.; SHIMIZU, I. Molecular mechanism of visual adaptation in fish. Japan. **Japan. J. Ichthyol.**, v. 52, n. 2, p. 91–106, 2005.
- MOHUN, S. M. et al. Identification and characterization of visual pigments in caecilians (Amphibia : Gymnophiona), an order of limbless vertebrates with rudimentary eyes. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 3586–3592, 2010.
- MONTGOMERY, J. C.; COOMBS, S.; BAKER, C. F. The mechanosensory lateral line system of the hypogean form of *Astyanax fasciatus*. **Environmental Biology of Fishes**, v. 62, p. 87–96, 2001.
- MOUTSAKI, P. et al. Sequence, genomic structure and tissue expression of carp (*Cyprinus carpio* L.) vertebrate ancient (VA) opsin. **FEBS Letters**, v. 473, p. 316–322, 2000.

MOUTSAKI, P. et al. Teleost multiple tissue (tmt) opsin: A candidate photopigment regulating the peripheral clocks of zebrafish? **Molecular Brain Research**, v. 112, n. 1–2, p. 135–145, 2003.

MURIEL-CUNHA, J. **Biodiversidade e sistemática molecular de Phreatobiidae (Ostariophysi, Siluriformes) - com uma proposta sobre sua posição filogenética em Siluriformes e uma discussão sobre a evolução do hábito subterrâneo**. 2008. 143 f. Tese de Doutorado. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

MURIEL-CUNHA, J.; DE PINNA, M. C. New data on Cistern catfish, *Phreatobius cisternarum*, from subterranean waters at the mouth of the Amazon river (Siluriformes, Incertae Sedis). **Pap. Avulsos Zool.** (São Paulo), v. 45, n. 26, p. 327–339, 2005.

MURO, E. M.; MAH, N.; ANDRADE-NAVARRO, M. A. Functional evidence of post-transcriptional regulation by pseudogenes. **Biochimie**, v. 93, n. 11, p. 1916–1921, 2011.

NAPOLI, J. L. Biochemical Pathways of Retinoid Transport, Metabolism, and Signal Transduction. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 80, n. 3, p. 52–62, 1996.

NASCIMENTO, F. L.; ASSUNÇÃO, M. I. S. Ecologia reprodutiva dos tralhotos *Anableps anableps* e *Anableps microlepis* (Pisces: Osteichthyes: Cyprinodontiformes: Anablepidae) no rio Paracauari, ilha de Marajó, Pará, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 33, p. 229–240, 2008.

NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. **Fishes of the World**. 5th ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2016.

NEUHAUSS, S. C. F. Zebrafish vision: structure and function of the zebrafish visual system. In: STEVE F. PERRY, MARC EKKER, ANTHONY P. FARRELL, C. J. B. (Ed.). **Zebrafish**. [s.l.] Elsevier Inc., 2010. v. 29p. 81–122.

NIEDER, J. Ecological Observations on *Dialommus fuscus* (Labrisomidae), the “Four-Eyed. **Pacific Science**, v. 53, n. 3, p. 286–288, 1999.

NIEDER, J. Amphibious behaviour and feeding ecology of the four-eyed blenny (*Dialommus fuscus*, Labrisomidae) in the intertidal zone of the island of Santa Cruz (Galapagos, Ecuador). **Journal of Fish Biology**, v. 58, n. 3, p. 755–767, 2001.

O’QUIN, K. E. et al. New evidence for the role of heterochrony in the repeated evolution of cichlid opsin expression. **Evolution & Development**, v. 13, n. 2, p. 193–203, 2011.

OHARA, W.; DA COSTA, I.; FONSECA, M. Behaviour, feeding habits and ecology of the blind catfish *Phreatobius sanguijuela* (Ostariophysi: Siluriformes). **J Fish Biol.**, v. 89, n. 2, p. 1285–1301, 2016.

OKANO, T.; YOSHIZAWA, T.; FUKADA, Y. Pinopsin is a chicken pineal photoreceptive molecule. **Nature**, v. 372, p. 94–97, 1994.

OLIVEIRA, F. G. et al. Topographic analysis of the ganglion cell layer in the retina of the four-eyed fish *Anableps anableps*. **Visual Neuroscience**, v. 23, n. 6, p. 879–886, 2006.

OLIVEIRA, V. A.; FONTOURA, N. F.; MONTAG, L. F. Reproductive characteristics and the weight-length relationship in *Anableps anableps* (Linnaeus, 1758) (Cyprinodontiformes: Anablepidae) from the Amazon Estuary. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 4, p. 757–766, 2011.

OWENS, G. L. et al. A fish eye out of water: Ten visual opsins in the four-eyed fish, *Anableps anableps*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, p. 1–7, 2009.

OWENS, G. L. et al. In the four-eyed fish (*Anableps anableps*), the regions of the retina exposed to aquatic and aerial light do not express the same set of opsin genes. **Biology Letters**, v. 8, n. 1, p. 86–89, 2012.

PALCZEWSKI, K. et al. Crystal structure of rhodopsin: a G-protein-coupled receptor. **Science**, v. 289, p. 739–745, 2000.

PARRY, J. W. L. et al. Mix and Match Color Vision : Tuning Spectral Sensitivity by Differential Opsin Gene Expression in Lake Malawi Cichlids. **Current Biology**, v. 15, p. 1734–1739, 2005.

PARTHA, R. et al. Subterranean mammals show convergent regression in ocular genes and enhancers, along with adaptation to tunneling. **eLife**, v. 6, p. e25884. 2017.

PEIRSON, S. N.; HAIFORD, S.; FOSTER, R. G. The evolution of irradiance detection: Melanopsin and the non-visual opsins. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1531, p. 2849–2865, 2009.

PEREZ, L. N. et al. Eye development in the four-eyed fish *Anableps anableps*: cranial and retinal adaptations to simultaneous aerial and aquatic vision. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 284, p. 1–8, 2017.

PHILP, A. et al. Vertebrate ancient (VA) opsin and extraretinal photoreception in the Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Journal of Experimental Biology**, v. 203, p. 1925–1936, 2000a.

PHILP, A. R. et al. A novel rod-like opsin isolated from the extra-retinal photoreceptors of teleost fish. **FEBS Letters**, v. 468, n. 2–3, p. 181–188, 2000b.

PICCIANI, N. et al. Prolific Origination of Eyes in Cnidaria with Co-option of Non-visual Opsins. **Current Biology**, v. 28, p. 1–7, 2018.

PINK, R. C. et al. Pseudogenes : Pseudo-functional or key regulators in health and disease? **RNA**, v. 17, p. 792–798, 2011.

PORTER, M. L. et al. Shedding new light on opsin evolution. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1726, p. 3–14, 2012.

PRICE, T. D. Sensory Drive, Color, and Color Vision. **Am. Nat.**, v. 190, n. 2, p. 157–170, 2017.

- PROTAS, M.; JEFFERY, W. R. Evolution and development in cave animals: from fish to crustaceans. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.**, v. 1, n. 6, p. 823–845, 2013.
- PROVENCIO, I. et al. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 1, p. 340–345, 1998.
- RAMIREZ, M. D. et al. Understanding the dermal light sense in the context of integrative photoreceptor cell biology. **Visual Neuroscience**, v. 28, p. 265–279, 2011.
- RENNISON, D. J. et al. Intra-retinal variation of opsin gene expression in the guppy (*Poecilia reticulata*). **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 19, p. 3248–3254, 2011.
- RENNISON, D. J.; OWENS, G. L.; TAYLOR, J. S. Opsin gene duplication and divergence in ray-finned fish. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, n. 3, p. 986–1008, 2012.
- ROMERO, A.; PAULSO, K. M. It's a wonderful hypogean life: a guide to the troglomorphic fishes of the world. **Environmental Biology of Fishes**, v. 62, n. 1–3, p. 13–41, 2001.
- SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.
- SANDBAKKEN, M. et al. Isolation and characterization of melanopsin photoreceptors of atlantic salmon (*Salmo salar*). **Journal of Comparative Neurology**, v. 520, n. 16, p. 3727–3744, 2012.
- SATO, K. et al. Two UV-sensitive photoreceptor proteins, *Opn5m* and *Opn5m2* in ray-finned fish with distinct molecular properties and broad distribution in the retina and brain. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–16, 2016.
- SCHMIDT, T. M. et al. Melanopsin-Positive Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells: From Form to Function. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 45, p. 16094–16101, 2011.
- SCHUSTER, S.; MACHNIK, P.; SCHULZE, W. Behavioral Assessment of the Visual Capabilities of Fish. In: FARRELL, A. P. (Ed.). **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**. San Diego: Academic Press: Elsevier Inc., 2011. v. 1. 143–149.
- SCHWAB, I. et al. Evolutionary attempts at 4 eyes in vertebrates. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v. 99, p. 145–158, 2001.
- SCHWASSMAN, H. O.; KRUGER, L. Experimental Analysis of the of the Visual Four-Eyed fish *Anableps microlepis*. **Vision Res.**, v. 5, p. 269–281, 1965.
- SEEHAUSEN, O. et al. Speciation through sensory drive in cichlid fish. **Nature**, v. 455, n. 7213, p. 620–626, 2008.
- SHIBATTA, O. A.; MURIEL-CUNHA, J.; DE PINNA, M. C. C. A new subterranean species of *Phreatobius* Goeldi, 1905 (Siluriformes, Incertae Sedis) from the Southwestern Amazon basin. **Pap. Avulsos Zool.** (São Paulo), v. 47, n. 17, p. 191–201, 2007.

- SHICHIDA, Y.; MATSUYAMA, T. Evolution of opsins and phototransduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1531, p. 2881–2895, 2009.
- SHIRAKI, T.; KOJIMA, D.; FUKADA, Y. Light-induced body color change in developing zebrafish. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 9, p. 1498–1504, 2010.
- SIVAK JG. Optics of the eye of the four-eyed fish (*Anableps anableps*). **Vision Res.**, v. 16, n. 5, p. 531–534, 1976.
- SMITH, A. R. et al. Relative LWS cone opsin expression determines optomotor thresholds in Malawi cichlid fish. **Genes, Brain and Behavior**, v. 11, n. 2, p. 185–192, 2012.
- SOARES, D.; NIEMILLER, M. L. Sensory Adaptations of Fishes to Subterranean Environments. **BioScience**, v. 63, n. 4, p. 274–283, 2013.
- SONI, B. G.; FOSTER, R. G. A novel and ancient vertebrate opsin. **FEBS Letters**, v. 406, n. 3, p. 279–283, 1997.
- SONI, B.; PHILIP, A.; FOSTER, R. Novel retinal photoreceptors. **Nature**, v. 394, p. 27–28, 1998.
- SOVRANO, V. A. et al. Extra-Visual Systems in the Spatial Reorientation of Cavefish. **Scientific Reports**, v. 8, p. 17698, 2018.
- SPADY, T. C. et al. Evolution of the Cichlid Visual Palette through Ontogenetic Subfunctionalization of the Opsin Gene Arrays. **Mol. Biol. Evol.**, v. 23, n. 8, p. 1538–1547, 2006.
- STEMMER, M. et al. Cavefish eye loss in response to an early block in retinal differentiation progression. **Development**, v. 142, n. 4, p. 743–752, 2015.
- STIEB, S. M. et al. Why UV vision and red vision are important for damselfish (*Pomacentridae*): structural and expression variation in opsin genes. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 5, p. 1323–1342, 2017.
- SU, C. Y. et al. Parietal-eye phototransduction components and their potential evolutionary implications. **Science**, v. 311, p. 1617–1621, 2006.
- SULLIVAN, J. P.; LUNDBERG, J. G.; HARDMAN, M. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 41, n. 3, p. 636–662, 2006.
- SUN, H. et al. Peropsin, a novel visual pigment-like protein located in the apical microvilli of the retinal pigment epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 18, p. 9893–8, 1997.
- SWAMYNATHAN, S. K. et al. Adaptive differences in the structure and macromolecular compositions of the air and water corneas of the “four-eyed” fish (*Anableps anableps*). **The FASEB Journal**, v. 17, n. 14, p. 1996–2005, 2003.

- TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.
- TARTTELIN, E. E. et al. Neuropsin (Opn5): A novel opsin identified in mammalian neural tissue. **FEBS Letters**, v. 554, n. 3, p. 410–416, 2003.
- TARTTELIN, E. E. et al. Adaptation of pineal expressed teleost exo-rod opsin to non-image forming Photoreception through enhanced Meta II decay. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 22, p. 3713–3723, 2011.
- TEMPLE, S. et al. A spitting image: Specializations in archerfish eyes for vision at the interface between air and water. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 277, n. 1694, p. 2607–2615, 2010.
- TERAI, Y. et al. Divergent selection on opsins drives incipient speciation in Lake Victoria cichlids. **PLoS Biology**, v. 4, n. 12, p. 2244–2251, 2006.
- TERAI, Y. et al. Visual adaptation in Lake Victoria cichlid fishes : depth-related variation of color and scotopic opsins in species from sand / mud bottoms. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, p. 200, 2017.
- TERAKITA, A. The opsins. **Genome Biology**, v. 6, n. 3, p. 1–9, 2005.
- THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p. 4876–4882, 1997.
- TRAJANO, E. Ecology of subterranean fishes: an overview. **Environmental Biology of Fishes**, v. 62, p. 133–160, 2001.
- TRAJANO, E. The Challenge of Estimating the Age of Subterranean Lineages : Examples from Brazil. In: KRANJC, A. et al. (Eds.). . **Time in Karst**. Karst Water Institute, Leesburg: Karst Water Institute Special Publication 12, 2007. p. 191–198.
- TRAJANO, E.; REIS, R. E.; BICHUETTE, M. E. Pimelodella spelaea: A New Cave Catfish from Central Brazil, with Data on Ecology and Evolutionary Considerations (Siluriformes: Heptapteridae). **Copeia**, v. 2004, n. 2, p. 315–325, 2004.
- TSUKAMOTO, H.; TERAKITA, A. Diversity and functional properties of bistable pigments. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 9, p. 1435–1443, 2010.
- TYTLER, P.; VAUGHAN, T. Thermal ecology of the mudskippers, *Periophthalmus koelreuteri* (Pallas) and *Boleophthalmus boddarti* (Pallas) of Kuwait Bay. **Journal of Fish Biology**, v. 23, n. 3, p. 327–337, 1983.
- VAN GELDER, R. N.; BUHR, E. D. Melanopsin: The Tale of the Tail. **Neuron**, v. 90, n. 5, p. 909–911, 2016.
- VAN TRUMP, W. J. et al. Gentamicin is ototoxic to all hair cells in the fish lateral line system. **Hearing Research**, v. 261, n. 1–2, p. 42–50, 2010.

- WARRANT, E. J.; JOHNSEN, S. Vision and the light environment. **Current Biology**, v. 23, n. 22, p. R990–R994, 2013.
- WATANABE, L. A. et al. The past and present of an estuarine-resident fish, the “four-eyed fish” *Anableps anableps* (Cyprinodontiformes, Anablepidae), revealed by mtDNA sequences. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.
- WEADICK, C. J.; CHANG, B. S. W. Long-wavelength sensitive visual pigments of the guppy (*Poecilia reticulata*): six opsins expressed in a single individual. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. Suppl 1, p. 1–12, 2007.
- WILLIAMS, A. J. et al. The polymorphic photopigments of the spectral tuning and genetic basis marmoset : spectral tuning and genetic basis. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 6, p. 2039–2045, 1992.
- WINDSOR, S. P.; MCHENRY, M. J. The influence of viscous hydrodynamics on the fish lateral-line system. **Integrative and Comparative Biology**, v. 49, n. 6, p. 691–701, 2009.
- YAMADA, K. et al. Empirical Analysis of Transcriptional Activity in the Arabidopsis Genome. **Science**, v. 302, p. 842–846, 2003.
- YAMAMOTO, Y.; STOCK, D. W.; JEFFERY, W. R. Hedgehog signalling controls eye degeneration in blind cavefish. **Letters to Nature**, v. 431, p. 844–847, 2004.
- YOKOYAMA, R.; KNOX, B. E.; YOKOYAMA, S. Rhodopsin from the fish, *Astyanax* : Role of tyrosine 261 in the red shift. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 36, n. 5, p. 939–945, 1995.
- YOKOYAMA, S. Molecular genetic basis of adaptive selection : Examples from color vision in vertebrates. **Annu. Rev. Genet.**, v. 31, p. 315–36, 1997.
- YOKOYAMA, S. Molecular evolution of vertebrate visual pigments. **Progress in retinal and eye research**, v. 19, n. 4, p. 385–419, 2000.
- YOKOYAMA, S. Evolution of Dim-Light and Color Vision Pigments. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 9, n. 1, p. 259–282, 2008.
- YOKOYAMA, S. et al. Elucidation of phenotypic adaptations : Molecular analyses of dim-light vision proteins in vertebrates. **PNAS**, v. 105, n. 36, p. 13480–13485, 2008.
- YOKOYAMA, S. et al. Extraordinarily low evolutionary rates of short wavelength-sensitive opsin pseudogenes. **Gene**, v. 534, n. 1, p. 93–99, 2014.
- YOKOYAMA, S.; RADLWIMMER, F. B. The Molecular Genetics and Evolution of Red and Green Color Vision in Vertebrates. **Genetics**, v. 158, p. 1697–1710, 2001.
- YOSHIZAWA, M. et al. Evolution of a behavioral shift mediated by superficial neuromasts helps cavefish find food in darkness. **Current Biology**, v. 20, p. 1631–1636, 2010.

YOU, X. et al. Mudskipper genomes provide insights into the terrestrial adaptation of amphibious fishes. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–8, 2014.

ZHANG, X. et al. Transcriptome analysis of the *Octopus vulgaris* central nervous system. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1–11, 2012.

ZOU, C. et al. Evolutionary and Expression Signatures of Pseudogenes. **Genome Analysis Evolutionary**, v. 151, p. 3–15, 2009.

APÊNDICE A. Alinhamento da sequência de aminoácidos da opsina *rh1.1* de *Phreatobius cisternarum* contra sequências publicadas

	TM1	TM2	TM3	TM4																															
BT-rho	WDFSLAAAYMFFLLIILGFPINFLTLVVTVQHKLRTPLNIIILNLAVADLFMFGGFTTLLVTSILHGYFVFGPDTGCLN	EGFFATLGGEEALVLSLVVLAIERYVVVCKPMSNFRFGENHAIMGVAFTWMA	LACAA	PPLVGM	SRYIPEGMCCSG154																														
PC-rh1.1	WAFMLGAYMFFLIIGFPINFLTLVVTIHKHLRTPLNIIILNLAVADLMFMFGGFTTIVTSMHGYFVGRGCLN	IEFAFTGGINS	LUCLAVLS	IERM	VVCKPMSNFRFGENHA	LGVAFTWMA	LACTVPLVGM	SRYIPEGMCCSG154																											
TF-rh1	WAYMLGAYMFFLIIVGFPINFLTLVVTIHKHLRTPLNIIILNLAVADLMFMFGGFTTIVTSMHGYFVGRGCLN	IEFFAFTGGINS	LUCLVLS	IERM	VVCKPMSNFRFGENHA	IMGVAFTWMA	LACTVPLVGM	SRYIPEGMCCSG154																											
IP-rh1	WAYMLGAYMFFLIIVGFPINFLTLVVTIHKHLRTPLNIIILNLAVADLMFMFGGFTTIVTSMHGYFVGRGCLN	IEFFAFTGGINS	LUCLVLS	IERM	VVCKPMSNFRFGENHA	IMGVAFTWMA	LACTVPLVGM	SRYIPEGMCCSG154																											
AM-rh1	WAYACLAAYMFFLIIVGFPINFLTLVVTIHKHLRTPLNIIILNLAVADLMFMFGGFTTIVTSMHGYFVGRGCLN	IEFFAFTGGINS	LUCLVLS	IERM	VVCKPMSNFRFGENHA	IMGVAFTWMA	LACTVPLVGM	SRYIPEGMCCSG154																											
SA-rh1	WAYACLAAYMFFLIIVGFPINFLTLVVTIHKHLRTPLNIIILNLAVADLMFMFGGFTTIVTSMHGYFVGRGCLN	IEFFAFTGGINS	LUCLVLS	IERM	VVCKPMSNFRFGENHA	IMGVAFTWMA	LACTVPLVGM	SRYIPEGMCCSG154																											
ZF-rh1.1	WAYGLAAAYMFFLIIVGFPINFLTLVVTIHKHLRTPLNIIILNLAVADLMFMFGGFTTIVTSMHGYFVGRGCLN	IEFFAFTGGINS	LUCLVLS	IERM	VVCKPMSNFRFGENHA	IMGVAFTWMA	LACTVPLVGM	SRYIPEGMCCSG154																											
ZF-rh1.2	WAYGLAAAYMFFLIIVGFPINFLTLVVTIHKHLRTPLNIIILNLAVADLMFMFGGFTTIVTSMHGYFVGRGCLN	IEFFAFTGGINS	LUCLVLS	IERM	VVCKPMSNFRFGENHA	IMGVAFTWMA	LACTVPLVGM	SRYIPEGMCCSG154																											
IP-rh1.2	WAYGLAAAYMFFLIIVGFPINFLTLVVTIHKHLRTPLNIIILNLAVADLMFMFGGFTTIVTSMHGYFVGRGCLN	IEFFAFTGGINS	LUCLVLS	IERM	VVCKPMSNFRFGENHA	IMGVAFTWMA	LACTVPLVGM	SRYIPEGMCCSG154																											
TF-rh1.2	WAFSFLTIYMFFLIILMGIPVNLFTLCLVTLHKHLRTPIIYIMVVMNTMADLLVIVISFPFTMAAHMHHGYFVRGM	GCNFESEF	FGHGIL	TLT	LUCLV	LAV	ERCA	M/SFRPGMD	IHSRRRV	IKGVRF	IWLMA	FSVSL	PPLFEM	SRYIPEGMCCSG154																					
BT-rho	IDYYTPHEETNNEFVIYMFVWHFHTIPLIVITFCYGRLLVCTVKEAAAAQQESETTORAEREVTRM	IIIMVIAFL	LOWL	PYAG	VAFY	FT	HQGS	D	F	G	P	I	F	M	T	I	P	A	F	F	A	K	S	S	V	N	P	I	Y	I	M	N	K	O	F
PC-rh1.1	IDYYTRAEGFNNEFVIYMFVWHFHTIPLIVITFCYGRLLVCTVKEAAAAQQESETTORAEREVTRM	IIIMVIAFL	LOWL	PYAG	VAFY	FT	HQGS	D	F	G	P	I	F	M	T	I	P	A	F	F	A	K	S	S	V	N	P	I	Y	I	M	N	K	O	F
TF-rh1	IDYYTRAEGFNNEFVIYMFVWHFHTIPLIVITFCYGRLLVCTVKEAAAAQQESETTORAEREVTRM	IIIMVIAFL	LOWL	PYAG	VAFY	FT	HQGS	D	F	G	P	I	F	M	T	I	P	A	F	F	A	K	S	S	V	N	P	I	Y	I	M	N	K	O	F
IP-rh1	IDYYTRAEGFNNEFVIYMFVWHFHTIPLIVITFCYGRLLVCTVKEAAAAQQESETTORAEREVTRM	IIIMVIAFL	LOWL	PYAG	VAFY	FT	HQGS	D	F	G	P	I	F	M	T	I	P	A	F	F	A	K	S	S	V	N	P	I	Y	I	M	N	K	O	F
AM-rh1	IDYYTRAEGFNNEFVIYMFVWHFHTIPLIVITFCYGRLLVCTVKEAAAAQQESETTORAEREVTRM	IIIMVIAFL	LOWL	PYAG	VAFY	FT	HQGS	D	F	G	P	I	F	M	T	I	P	A	F	F	A	K	S	S	V	N	P	I	Y	I	M	N	K	O	F
SA-rh1	VDYYTRVGVNNEFVIYMFVWHFHTIPLIVITFCYGRLLVCTVKEAAAAQQESETTORAEREVTRM	IIIMVIAFL	LOWL	PYAG	VAFY	FT	HQGS	D	F	G	P	I	F	M	T	I	P	A	F	F	A	K	S	S	V	N	P	I	Y	I	M	N	K	O	F
ZF-rh1.1	VDYYTRVGVNNEFVIYMFVWHFHTIPLIVITFCYGRLLVCTVKEAAAAQQESETTORAEREVTRM	IIIMVIAFL	LOWL	PYAG	VAFY	FT	HQGS	D	F	G	P	I	F	M	T	I	P	A	F	F	A	K	S	S	V	N	P	I	Y	I	M	N	K	O	F
ZF-rh1.2	VDYYTPNPELNEFVIYMFVWHFHTIPLIVITFCYGRLLVCTVKEAAAAQQESETTORAEREVTRM	IIIMVIAFL	LOWL	PYAG	VAFY	FT	HQGS	D	F	G	P	I	F	M	T	I	P	A	F	F	A	K	S	S	V	N	P	I	Y	I	M	N	K	O	F
IP-rh1.2	VDYYTLKPELNEFVIYMFVWHFHTIPLIVITFCYGRLLVCTVKEAAAAQQESETTORAEREVTRM	IIIMVIAFL	LOWL	PYAG	VAFY	FT	HQGS	D	F	G	P	I	F	M	T	I	P	A	F	F	A	K	S	S	V	N	P	I	Y	I	M	N	K	O	F
TF-rh1.2	VDYYTLKPELNEFVIYMFVWHFHTIPLIVITFCYGRLLVCTVKEAAAAQQESETTORAEREVTRM	IIIMVIAFL	LOWL	PYAG	VAFY	FT	HQGS	D	F	G	P	I	F	M	T	I	P	A	F	F	A	K	S	S	V	N	P	I	Y	I	M	N	K	O	F

A anotação dos aminoácidos foi feita com rodopsina bovina (*Bos taurus*, BT-rho). As sequências de aminoácidos *rh1.1* de *Ictalurus punctatus* (IP), *Tachysurus fulvidraco* (TF), *Sinocyclocheilus anophthalmus* (SA), *Astyanax mexicanus* (AM) e *Danio rerio* (zebrafish, ZF). Lacunas, indicadas por traços, foram inseridas nas sequências para manter um alto grau de identidade. As linhas horizontais indicam domínios transmembranares putativos (TM1-TM7), e as letras indicam alças citoplasmáticas (C1-C4) e extracelulares (E1-E3). Os aminoácidos nas posições 122, 261 e 292 estão envolvidos na função adaptativa à visão de luz fraca, e em E113 e K296 são essenciais para a função básica da fotorrecepção.

APÊNDICE B. Alinhamento da sequência de aminoácidos da opsina *lws* de *Phreatobius cisternarum* contra sequências publicadas

	TM2	E1	TM3	TM4	E2
HS_LWS	WYHLTSWMI FVVTASVFNGLVLAATMFKFKLRHLPLNWI LNLAVADLAETV IASTIS IVNQSGYFVLGHPMCVLEGYTVSLCG I TGLVMS LA I ISWERWLVVCKPFGNVRFDAKLA I VGI AFSWVWSA WWTAPP I FGMRRYPHGLKTS CG 154				
PC_lws	----- TNSLVLA TAKFKLRHLPLNWI LNLAVAD ILETLAST ISVGNQIYGYF ILGHPMCY FEGTV ACCG IAGLWSL TV ISFERCWMVCKPFRNVKFSKVAAGG I IFTWMS I LWTA FPI FGMRRYPHGLKTS CG 135				
IP_lws	WYHVALTMVWFVW IASTFTNGLVLA TAKFKLRHLPLNWI LNLAVAD ILETLAST ISVGNQFQFY ILGHPMC I FEGTV ACCG IAGLWSL TF ISFERWVWVCKPFGNVKFDKVAAGG I IFTWYSA FMT I LPV FGMRRYPHGLKTS CG 154				
TF_lws	WYHVALTMVWFVW IASTFTNGLVLA TAKFKLRHLPLNWI LNLAVAD ILETLAST ISVGNQFQFY ILGHPMC I FEGTV ACCG IAGLWSL SV ISFERWVWVCKPFGNVKFDKVAAGG I IFTWYSA FMT ALP I FGMRRYPHGLKTS CG 154				
AM_lws	WYHVALTMVWFVW IASTFTNGLVLA TAKFKLRHLPLNWI LNLAVAD ILETLAST ISVGNQFQFY ILGHPMC I FEGTV ACCG IAGLWSL TV ISWERWVWVCKPFGNVKFDKVAAGG I IFTWYSA WWTAPP I FGMRRYPHGLKTS CG 154				
CA_lws	WYHVALTMVWFVW IASTFTNGLVLA TAKFKLRHLPLNWI LNLAVAD ILETLAST ISVGNQFQFY ILGHPMC I FEGTV ACCG IAGLWSL TV ISWERWVWVCKPFGNVKFDKVAAGG I IFTWYSA WWTAPP I FGMRRYPHGLKTS CG 154				
SA_lws	WYHVALTMVWFVW IASTFTNGLVLA TAKFKLRHLPLNWI LNLAVAD ILETLAST ISVGNQFQFY ILGHPMC I FEGTV ACCG IAGLWSL TV ISWERWVWVCKPFGNVKFDKVAAGG I IFTWYSA WWTAPP I FGMRRYPHGLKTS CG 154				
SA_lws1	WYHVALTMVWFVW IASTFTNGLVLA TAKFKLRHLPLNWI LNLAVAD ILETLAST ISVGNQFQFY ILGHPMC I FEGTV ACCG IAGLWSL TV ISWERWVWVCKPFGNVKFDKVAAGG I IFTWYSA WWTAPP I FGMRRYPHGLKTS CG 154				
ZF_lws2	WYHVALTMVWFVW IASTFTNGLVLA TAKFKLRHLPLNWI LNLAVAD ILETLAST ISVGNQFQFY ILGHPMC I FEGTV ACCG IAGLWSL TV ISWERWVWVCKPFGNVKFDKVAAGG I IFTWYSA WWTAPP I FGMRRYPHGLKTS CG 154				
BT_rho	WQFSMLAAAYMFL L IMLGFP INFL TLYVTVQHKLRIRPLNWI LNLAVADL FIMVFGGFTTTTLYTSLHG YFVFGPTGCONLEGFFA TLGGEI ALWSLVLA IERYVWVWVCKPMSNFRFGENHA IMGVAFTWMLACAAAPLVGMSRY IPEGMQCSCG 154				
	C1	C2	C3	C4	
	TM5	TM6	E3	TM7	
HS_LWS	222 PDVFSGSSYPGVQSYMIVLMI TCC I IPLA I IMLCYLAWMLA I RAVAKQOK ESES TOKAEKEVTRMIVVMI FAYCVQMGPYTFACFAAANPGYA FHPLMAALPAYFAKSAT IYNPVIYVFNIRQF 279				
PC_lws	PDVCSGNDGAVRSYMA LMI SCC I IPLS I IIVLCYLA WKA IRAV ----- TOKAEKEVTRMI FVMI AAYVFCMGPYTFAGFGTAHPGYA FHPLAAALPAYFAKSAT IYNP I IYVFNIRQF 250				
IP_lws	PDVFSGNEDEPGVRSYMA LMI SCC I IPLG I IILCY I PVLLA I RAVAAQOK ESES TOKAEKEVTRMI CVMI AAYVFCMGPYTFVCFGTAPGYA FHPLAAAMPAYFAKSAT IYNP I IYVFNIRQF 279				
TF_lws	PDVFSGSEDPGVQSYM I LMI TCC I IPLG I IIVLCYLA WMA I RAVAAQOK ESES TOKAEKEVTRMI FVMI AAYVFCMGPYTFACFAAANPGYA FHPLAAAMPAYFAKSAT IYNPVIYVFNIRQF 279				
AM_lws	PDVFSGSEDPGVQSYM I V LMI TCC I IPLG I IILCY IAWMA I RTVAQQOK DSES TOKAEKEVSRMIVVMI NAYVFCMGPYTFACFAAANPGYA FHPLAAAMPAYFAKSAT IYNPVIYVFNIRQF 279				
CA_lws	PDVFSGSEDPGVQSYM I V LMI TCC I IPLA I IILCY IAWMLA I RTVAQQOK DSES TOKAEKEVSRMIVVMI FAYCVQMGPYTFACFAAANPGYA FHPLAAAMPAYFAKSAT IYNP I IYVFNIRQF 279				
SA_lws	PDVFSGSEDPGVQSYM I V LMI TCC I IPLA I IILCY IAWMLA I RTVAQQOK DSES TOKAEKEVSRMIVVMI LA YCLCWGPTFFACFAAANPGYA FHPLAAAMPAYFAKSAT IYNP I IYVFNIRQF 279				
SA_lws1	PDVFSGSEDPGVQSYM I V LMI TCC I IPLA I IILCY IAWMLA I RAVAAQOK DSES TOKAEKEVSRMIVVMI LAYCVQMGPTFFACFAAANPGYA LHPLAAAMPAYFAKSAT IYNP I IYVFNIRQF 279				
ZF_lws2	PDVFSGSEDPGVQSYM I V LMI TCC I IPLA I IILCY IAVFLA I HAVAAQOK DSES TOKAEKEVSRMIVVMI LA FCLCWGPTFFACFAAANPGYA FHPLAAAMPAYFAKSAT IYNP I IYVFNIRQF 279				
BT_rho	IDYTPHEETNNESFV IYMFVHF I IPL IV IFFCYGQLVFTVKEAAAQQGSESAT TOKAEKEVTRMI I IIM I A F L I CMLPAGVAFY I FT HQGSDFGP I FMT I PAFFAKTSAVYNPV IY IIMINKQF 279				

A anotação de aminoácidos foi feita com a opsina humana LWS (Humano, HS-LWS). As sequências de aminoácidos *lws* de *Ictalurus punctatus* (IP), *Tachysurus fulvidraco* (TF), *Sinocyclocheilus anophthalmus* (SA), *Astyanax mexicanus* (AM), *Carassius auratus* (CA) e *Danio rerio* (peixe-zebra, ZF). Lacunas, indicadas por traços, foram inseridas nas sequências para manter um alto grau de identidade. Os limites transmembranares foram inferidos por analogia com os da rodopsina bovina (Palczewski et al., 2000). As linhas horizontais indicam domínios putativos transmembranares (TM1-TM7) e as letras cinzas indicam alças citoplasmáticas (C1-C4) e extracelulares (E1-E3).

APÊNDICE C. Genes relacionados às células das fibras do cristalino encontrados no transcriptoma de *Phreatobius cisternarum*

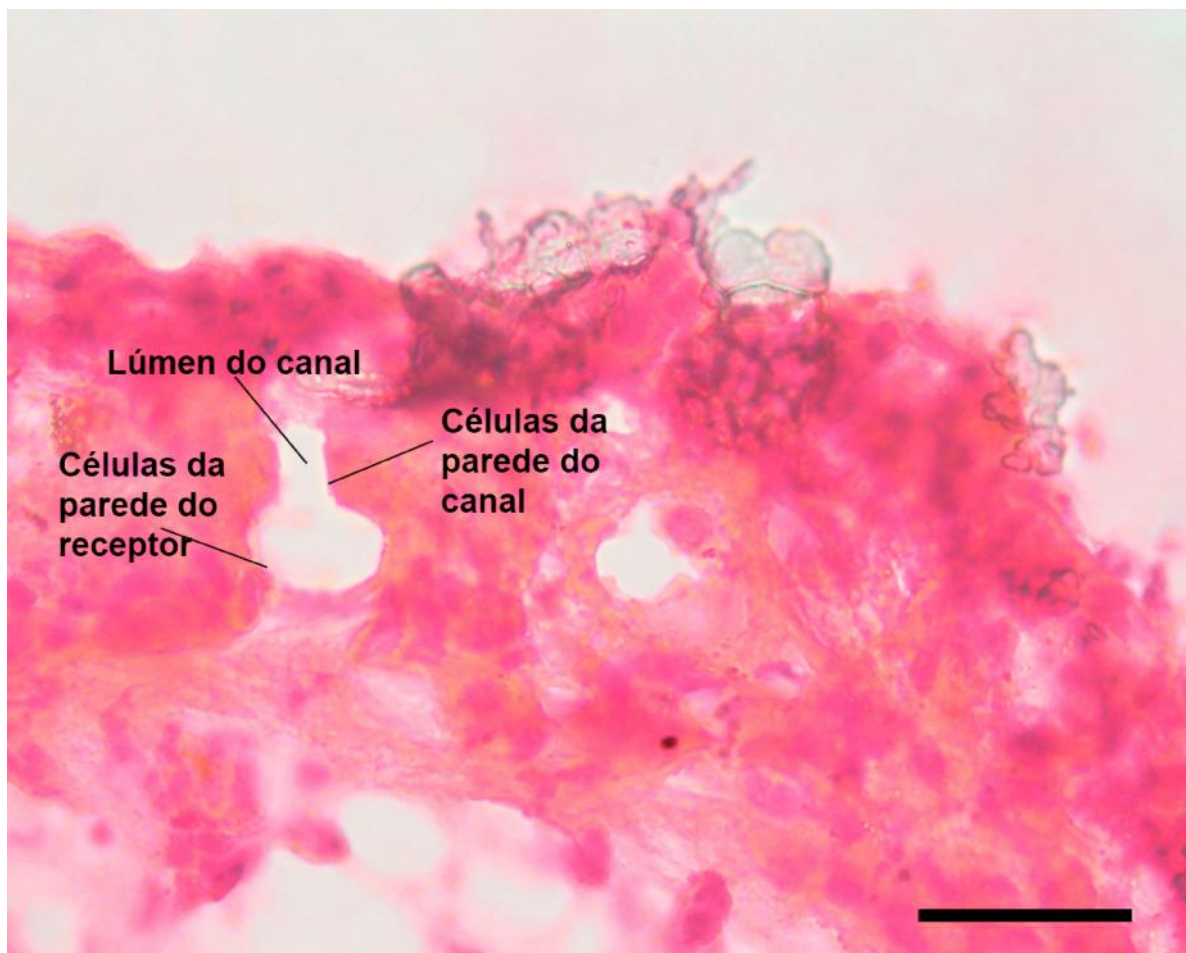
Genes do cristalino		
<i>N-myc</i>	<i>Iars</i>	<i>Utp15</i>
<i>Tcp1</i>	<i>Casp7</i>	<i>Gpatch4</i>
<i>Dcun1d1</i>	<i>Gadd45g</i>	<i>Ddx3x</i>
<i>Rps11</i>	<i>Hspe1</i>	<i>Adam10</i>
<i>Rpl13a</i>	<i>Cct3</i>	<i>Rps8</i>
<i>Nefm</i>	<i>Phb</i>	<i>Gtpbp4</i>
<i>Utp18</i>	<i>Rpl18a</i>	<i>Hspa4</i>
<i>Ccnh</i>	<i>Eif5a2</i>	<i>Tomm70a</i>
<i>Gadd45b</i>	<i>Aldh18a1</i>	<i>Cct2</i>
<i>Ogn</i>	<i>Pdlim1</i>	<i>Exoc5</i>
<i>Psm14</i>	<i>Nfatc2</i>	<i>Rpl7</i>
<i>Skp1a</i>	<i>Stambpl1</i>	<i>Park7</i>
<i>Ccng1</i>	<i>Hspd1</i>	

**APÊNDICE D. Genes relacionados ao RPE encontrados no
transcriptoma de *Phreatobius cisternarum***

Genes do Epitélio Pigmentado da Retina (RPE)¹				
<i>Retinoid isomer hydrolase</i>		<i>Arfaptin-1 isoform X1</i>	<i>Transketolase-like</i>	<i>Arginine/serine-rich protein 1</i>
<i>GTP cyclohydrolase 1-like</i>		<i>Aquaporin 1</i>	<i>Annexin A2-like</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B-like</i>
<i>L-dopachrome tautomerase</i>		<i>Synaptogyrin-2-like</i>	<i>Runt-related transcription factor 2-like isoform X1</i>	<i>Tumor protein D52 isoform X1</i>
<i>RPE-retinal protein-coupled receptor-like</i>	G	<i>Arrestin-C-like isoform X1</i>	<i>Alpha-N-acetylneuraminide alpha-2,8-sialyltransferase</i>	<i>Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK-like isoform X1</i>
<i>Keratin, type II cytoskeletal 8-like</i>		<i>Beta-enolase</i>	<i>Carboxypeptidase catalytic chain</i>	<i>Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK-like</i>
<i>Serpin H1-like</i>		<i>Bifunctional purine biosynthesis protein PURH</i>	<i>Hermansky-Pudlak syndrome 4 protein isoform X1</i>	<i>Collagen alpha-1(II) chain-like isoform X2</i>
<i>Keratin, type I cytoskeletal 18</i>	I	<i>Beta-galactosidase-like</i>	<i>Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3</i>	<i>Diphthamide biosynthesis protein 1</i>
<i>Ras-related protein Rab-32</i>		<i>Beta-galactosidase</i>	<i>Pleckstrin homology-like domain family A member 2</i>	<i>Collagen alpha-2(IX) chain</i>
<i>Myoglobin</i>		<i>M-phase phosphoprotein 6</i>	<i>CD63 antigen</i>	<i>Heat shock protein 70</i>
<i>Tubulin alpha-8 chain-like</i>		<i>Four and a half LIM domains protein 3-like</i>	<i>Protein TSSC1</i>	<i>Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1-like</i>
<i>Tryptophan hydroxylase isoform X1</i>	5-1	<i>Transmembrane emp24 domain-containing protein 7-like</i>	<i>Keratin, type I cytoskeletal 13-like</i>	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein cytoplasmic-like</i>
<i>Tetraspanin-3-like</i>		<i>Laminin subunit beta-1-like</i>	<i>Cell cycle checkpoint control protein RAD9A</i>	<i>28S ribosomal protein S18b, mitochondrial</i>
<i>Glutathione transferase P</i>	S-	<i>Transgelin-like isoform X1</i>	<i>Retinoid isomer hydrolase</i>	

¹A anotação dos genes do epitélio pigmentado da retina (RPE) foi realizada no blast2Go 5.2.5.

APÊNDICE E. Órgão eletrosensorial ampular individual corado com Hematoxilina e Eosina em *Phreatobius cisternarum*



Esta secção de tecido mostra uma visão transversal através de um órgão ampular. Criosecções de 20 μ m de espessura. Escala: 0,02 mm.