



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

Ontogenia do Peixe de Quatro Olhos *Anableps anableps*:
Adaptações Ósseas e Oculares para a Visão Simultânea Aérea e
Aquática

LOUISE NEIVA PEREZ

BELÉM-PA
2015

LOUISE NEIVA PEREZ

Ontogenia do Peixe de Quatro Olhos *Anableps anableps*:
Adaptações Ósseas e Oculares para a Visão Simultânea Aérea e
Aquática

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da UFPA como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Schneider

BELÉM-PA

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Perez, Louise Neiva , 1990-

Ontogenia do peixe de quatro olhos anableps
anableps: adaptações ósseas e oculares para a visão
simultânea aérea e aquática. / Louise Neiva Perez. -
2015.

Orientadora: Patrícia Neiva Coelho
Schneider.

Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal do Pará, Instituto de Ciências
Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2015.

1. Peixe. 2. Visão. 3. Olhos. 4. Retina.
5. Células. I. Título.

CDD 23. ed. 597

LOUISE NEIVA PEREZ

Ontogenia do Peixe de Quatro Olhos *Anableps anableps*:
Adaptações Ósseas e Oculares para a Visão Simultânea Aérea e
Aquática

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da UFPA como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Neiva Coelho Schneider

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Júlio Cesar Pieczarka

Avaliador

Prof^a. Dr^a. Karen Renata Herculano M. Oliveira

Avaliadora

Prof. Dr. Horacio Schneider

Avaliador Suplente

BELÉM-PA

2015

FONTES FINANCIADORAS E INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Programa Ciência sem Fronteiras: MEC/MCTI/CAPES/CNPQ/FAPs Nº 09/2014
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES
- UFPa/Belém: Laboratório de Evolução e Desenvolvimento - LED
- IECOS/Bragança: Laboratório de Biologia Molecular

DEDICATÓRIA

Primeiramente à Deus

Aos meus pais: Ana Maria Neiva e Afonso Perez

Às minhas irmãs: Lila e Gely

Aos meus sobrinhos: Gabriel, Mateus e Bernardo

À Sinnd Alves

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Dr^a. Patrícia Schneider pela orientação durante esses dois anos de mestrado, pela dedicação, por todo conhecimento compartilhado durante esse período e pela oportunidade que me foi dada. Ao Professor Dr. Igor Schneider pela ajuda, incentivo e pelo conhecimento compartilhado. Aos membros do laboratório pela colaboração durante este período de trabalho.

Agradeço aos colaboradores do projeto, Dr. George Mattox e Dr. Rodrigo Martins por valiosos comentários e pela contribuição experimental. Agradeço à Prof^a. Iracilda Sampaio e ao Prof. Horacio Schneider por terem disponibilizado seu laboratório para o processamento das amostras coletadas.

À Universidade Federal do Pará, ao Programa de Pós - Graduação em Neurociências e Biologia Celular e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro na concessão de bolsa de estudo.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE FIGURAS E TABELAS | xii |
| LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS | xiv |
| RESUMO | xvii |
| ABSTRACT | xviii |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Biologia do gênero <i>Anableps</i>..... | 2 |
| 1.2. Padronização ocular em vertebrados | 4 |
| 1.3. Composição ocular de vertebrados e organização da retina..... | 6 |
| 1.4. Desenvolvimento do Neurocrânio de peixes teleósteos | 12 |
| 2. OBJETIVOS | 14 |
| 2.1. Objetivo Geral | 14 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 14 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 3.1. Coleta de material | 15 |
| 3.2. Morfometria..... | 15 |
| 3.3. Diafanização | 16 |
| 3.4. Coloração com Hematoxilina e Eosina..... | 17 |
| 3.5. Imunofluorescência | 17 |
| 4. RESULTADOS | 18 |
| 4.1. Caracterização dos estágios de <i>Anableps anableps</i>..... | 18 |
| 4.2. Análise osteológica do neurocrânio de <i>Anableps anableps</i>..... | 22 |
| 4.3. Caracterização da retina de larvas de <i>A. anableps</i> através da coloração com Hematoxilina e Eosina | 25 |
| 4.4. Proliferação celular na retina de <i>Anableps anableps</i>..... | 28 |
| 4.5. Caracterização da retina através de marcadores moleculares..... | 30 |
| 5. DISCUSSÃO | 32 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 35 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 36 |

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

| | |
|--|----|
| Figura 1- Vista lateral de exemplares das três espécies do gênero <i>Anableps</i> . A) <i>Anableps anableps</i> ; B) <i>Anableps microlepis</i> ; e C) <i>Anableps dowi</i> | 2 |
| Figura 2- Esquema do olho de <i>Anableps</i> mostrando as principais estruturas oculares, e o trajeto da luz proveniente do ambiente aéreo que é projetada na retina ventral e da luz proveniente do ambiente aquático que incide na retina dorsal..... | 4 |
| Figura 3- Ilustração do desenvolvimento do olho em peixes..... | 6 |
| Figura 4- Comparação entre olho de mamífero e olho de peixe..... | 7 |
| Figura 5- Esquema de olho de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>), mostrando as principais estruturas do olho de vertebrado..... | 8 |
| Figura 6- Esquema ilustrando a organização das camadas da retina de vertebrados e o tipo celular que compõe cada camada..... | 9 |
| Figura 7- Microscopia eletrônica mostrando os três períodos de desenvolvimento embrionário da retina de <i>Scyliorhinus canicula</i> | 11 |
| Figura 8- Neurocrânio de <i>Salminus brasiliensis</i> | 13 |
| Figura 9- Mapa da costa Norte do Estado do Pará..... | 18 |
| Figura 10- Demonstração de como foram medidos os parâmetros morfométricos qualitativos das larvas..... | 19 |
| Figura 11- Estágios larvais de <i>A. anableps</i> | 21 |
| Figura 12- Vista dorsal do neurocrânio diafanizado durante o desenvolvimento ocular de <i>A. anableps</i> | 23 |
| Figura 13- Vista lateral do neurocrânio diafanizado durante o desenvolvimento ocular de <i>A. anableps</i> | 24 |
| Figura 14- Diafanização do neurocrânio de indivíduo adulto de <i>A. anableps</i> | 25 |
| Figura 15- Caracterização da retina de cinco estágios de desenvolvimento larvais em <i>A. anableps</i> através de cortes histológicos transversais dos olhos que foram corados com Hematoxilina e Eosina..... | 27 |

| | |
|---|----|
| Figura 16- Imunofluorescência para o anticorpo Anti-Histona Fosforilada HH3 (S10)..... | 29 |
| Figura 17- Caracterização da retina de <i>A. anableps</i> em larvas no sexto estágio do desenvolvimento..... | 31 |
| Tabela 1- Anticorpos primários utilizados nas imunofluorescências, N°. de catálogo e concentração utilizada..... | 17 |
| Tabela 2- Identificação dos estágios larvais | 18 |
| Tabela 3- Definição dos estágios de desenvolvimento larval. As medidas estão representadas em milímetros (mm)..... | 19 |
| Tabela 4- Anticorpos primários utilizados nas imunofluorescências e tipo de marcação celular..... | 30 |

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AC- Célula amacrina;

BC- Célula Bipolar;

BMP- Proteína Morfogenética do corpo;

Boc- Basioccipital;

C- Cone;

CMZ- Zona Marginal Ciliar;

Co- Córnea;

Cr- Coroide;

DCo- Córnea dorsal;

DR- Retina dorsal;

EPO – Epiotico;

Sph- Esfenótico;

Exoc- Exoccipital

FGF- Fator de crescimento do fibroblasto;

Fro- Frontal;

GC- Célula ganglionar;

GCL- Camada de células ganglionares;

HC- Célula Horizontal;

INL- Camada nuclear interna;

Int- Intercalar;

IPL- Camada plexiforme interna;

Ir- ris;

Juv- Juvenil;

Let- Etimódio lateral;

MC- Célula Müller;

Mes- Mesentimódio;

NFL- Camada de fibras nervosas;

NL- Comprimento da notocorda;

OC- Cálice óptico;

ONL- Camada nuclear externo;

ON- Nervo óptico;

OPL- Camada plexiforme externo;

OS- Haste óptica;

Osph - Órbita-esfenóide;

Par- Parietal;

PBS- Tampão fosfato salino;

PFA- Paraformaldeído;

pNR- Retina neural presuntiva;

Pro- Pró-ótico;

pRPE- Epitélio pigmentado da retina;

PS- Faixa de pigmento;

Psph- Paraesfenóide;

PTMs- Modificações pós-transducionais;

Pto- Pterótico;

Ptsph- Pteroesfenóide;

R- Bastonete;

RPE- Epitélio pigmentado da retina;

Sc- Esclera;

SL- Comprimento padrão;

Soc- Supra-occipital;

TZ- Zona de transição;

VCo- Córnea ventral;

Vom- Vôrme;

VR- Retina ventral;

RESUMO

A evolução e desenvolvimento dos olhos tem intrigado cientistas por séculos. Além da perda parcial ou completa dos olhos, poucos vertebrados apresentam uma modificação substancial na morfologia do olho. Um exemplo é o peixe de quatro olhos (*Anableps anableps*). Esta espécie pode ser encontrada desde o Golfo de Paria na Venezuela até o Delta do Parnaíba no Brasil, apresenta fecundação interna e se reproduz continuamente ao longo do ano. O peixe de quatro olhos é um modelo interessante para o estudo de inovações morfológicas no contexto de evolução e desenvolvimento (Evo-Devo) por apresentar algumas estruturas oculares divididas, como córneas e pupilas. A retina é uma estrutura única dividida em duas regiões, dorsal (recebe informações luminosas aquáticas) e ventral (recebe informações luminosas aéreas). Estas características permitem que esses animais acomodem a visão aérea e aquática simultaneamente. O presente estudo teve como objetivo a descrição ontogenética dos estágios de desenvolvimento da espécie *Anableps anableps*, e a descrição morfológica e molecular da retina durante o processo de desenvolvimento ocular. Foram descritos seis estágios larvais. Os dois primeiros estágios, não apresentavam as córneas e pupilas divididas, e a partir do estágio 3, é possível observar o início da divisão. Também foi descrito o desenvolvimento e a expansão do osso frontal. O aparecimento do osso frontal também ocorre no estágio 3. Foi identificado o aparecimento de um septo inter-orbital cartilaginoso, a partir do estágio 4 de desenvolvimento ocular. Observou-se que no início do desenvolvimento da retina, as células ainda não estão organizadas, não sendo possível distinguir as camadas da retina. Durante o desenvolvimento é possível observar as camadas se organizando, foi possível identificar que a camada nuclear externa dorsal é menos densa que a camada nuclear interna ventral. O padrão de proliferação celular foi descrito em três estágios do desenvolvimento, antes e durante a divisão ocular, sendo observado na zona marginal ciliar. A proliferação celular é mais acentuada no início do desenvolvimento ocular e no estágio 5 de desenvolvimento, a quantidade de células em proliferação celular diminui. Os resultados deste trabalho irão elucidar a base genética das mudanças morfológicas presentes neste gênero.

Palavras-chaves: *Anableps*, larva, divisão ocular, retina, proliferação celular.

ABSTRACT

The evolution and development of the eye has intrigued developmental biologists for centuries. Aside from partial or complete loss, few vertebrates display substantial modifications to the eye morphology. One example is the Four-eyed fish (*Anableps anableps*). This species is commonly found from Gulf of Paria in Venezuela to Delta of Parnaíba and reproduces throughout the year. The four-eyed fish consists in a unique model system to study eye Evo-Devo due to its distinctive feature of having divided eye structures, such as pupils and cornea. The retina is a unique structure divided into two regions, dorsal (receives aquatic luminous information) and ventral (receives aerial luminous information). The aim of this study was to describe larval stages of this species, and morphological and molecular description of the retina during eye development. Six larval stages were described. The two earlier stages did not split the cornea and pupil, and from stage three, it is possible to observe this division. It was also described the development and expansion of the frontal bone. The appearance of the frontal bone begins at stage three of development. It has been identified the appearance of an inter-orbital septum cartilaginous, starting four stage of the ocular development. It was observed that the early development of the retinal cellular layers are disorganized and is not possible to distinguish between them, but later during development, these layers become organized, with ventral outer nuclear layer thicker than the dorsal one, and the dorsal inner nuclear layer is thinner than the ventral. The pattern of retinal cell proliferation has been described in three stages of development, before and during ocular division. It was observed that the proliferation is greater at the beginning of the larval development and decreases on later stages. The result of this study will shed light on the molecular basis of this innovative feature.

Key-words: *Anableps*, larvae, ocular division, retina, cell proliferation

1. INTRODUÇÃO

Em *A Origem das Espécies*, Charles Darwin observa que dentre as espécies de vertebrados atuais, pouca variação existe na estrutura do olho. Schwab e colaboradores (2001) descreveram três tentativas evolutivas de duplicação ocular em quatro espécies de peixe.

A primeira tentativa descrita foi na espécie *Bathylchnops exilis*, encontrada na zona batipelágica no Norte do Oceano Pacífico, esses peixes apresentam dois pares de olhos sendo compostos por uma córnea fina, dois cristalinos e duas pupilas, seus olhos são adaptados para captura de presas bioluminescente, sendo os olhos superiores responsável pela captura de presas acima e na altura de seus olhos e os olhos inferiores são responsáveis por captura de peixes que passam abaixo dele.

A segunda tentativa evolutiva foi descrita em duas espécies de peixes que foram separadas por barreiras geográficas, habitantes da zona epipelágica, sendo elas *Dialommus fuscus* e *Mnierpes macrocephalus*, encontradas em Galápagos e no Leste do Oceano Pacífico, respectivamente. Esses peixes apresentam seus olhos divididos verticalmente, com apenas uma córnea fina, um cristalino e uma retina, sendo os olhos adaptados para captura de presas e para fugir de predadores.

A terceira tentativa evolutiva ocorreu em peixes do Gênero *Anableps* encontrados na região Amazônica, que também vivem nas zonas epipelágicas. As espécies deste gênero vivem na superfície da água com a metade dorsal dos olhos exposta ao ambiente aéreo e a metade ventral submersa. Neste contexto, a estrutura dos olhos está adaptada para o processamento simultâneo de imagens tanto de origem aérea quanto aquática. Os olhos desses animais apresentam duas córneas e duas pupilas, um único cristalino e uma retina funcionalmente duplicada. A luz proveniente do ambiente aéreo passa pelas córnea e pupila dorsais, atravessa o cristalino e incide na região ventral da retina. Em contrapartida, a luz proveniente do ambiente aquático passa pelas córnea e pupila ventrais, atravessa o cristalino e incide na região dorsal retina (Owens *et al.*, 2012). Além desses caracteres, peixes adultos desse gênero apresentam uma expansão dorsolateral do osso frontal para

acomodar seus olhos que são grandes comparado ao corpo total do animal (Parenti, 1981).

1.1. Biologia do gênero *Anableps*

O gênero *Anableps* (Cyprinodontiformes, Anablepidae), compreende três espécies: *A. anableps* (Figura 1A), *A. microlepis* (Figura 1B) e *A. dowi* (Figura 1C). As duas primeiras espécies ocorrem no Atlântico Ocidental, que se restringe desde o Golfo de Paria na Venezuela até o Delta do Parnaíba, no estado do Piauí, no Brasil. A terceira espécie, ocorre no Pacífico Oriental, desde o sul do México até a Nicarágua (Cervigón *et al.*, 1992). Peixes deste gênero pertencem a ordem Cyprinodontiformes, são vivíparos com fertilização interna, se reproduzem continuamente ao longo do ano, vivem em cardumes, e geralmente não migram grandes distâncias. Enquanto as espécies *A. dowi* e *A. microlepis* ocorrem em ambientes marinhos e águas rasas do litoral, *A. anableps* ocorre em baixa frequência nestes habitats, sendo encontrado em ambientes estuarinos (Miller, 1979; Oliveira *et al.*, 2011).



Figura 1- Vista lateral de exemplares das três espécies do gênero *Anableps*. A) *Anableps anableps*; B) *Anableps microlepis*; e C) *Anableps dowi*. A e B, escala de 5 cm (C, adaptado de <http://www.discoverlife.org/mp/20p?see=I_RR2324&res=640>).

Peixes do gênero *Anableps* são conhecidos como peixes de quatro olhos e se diferenciam de outros grupos de peixes devido a modificações de estruturas oculares não comuns a outros vertebrados. Eles apresentam duplicação funcional da córnea e pupila. Em adultos a porção dorsal da córnea é mais espessa que a ventral e a pupila é dividida horizontalmente pela íris (Sivak, 1976; Schwab *et al.*, 2001). Além disso, os peixes deste gênero apresentam os ossos frontais expandidos dorsolateralmente, que auxiliam na acomodação de seus olhos (Parenti, 1981). O cristalino também se distingue por ter formato oval, enquanto outros grupos de peixes possuem o cristalino globular (Sivak, 1976; Schwab *et al.*, 2001). Estudos prévios em adultos de *Anableps* apontam para a diferenciação funcional da retina e diferenças entre as opsinas visuais expressas nos fotorreceptores, permitindo uma visão simultânea aérea e aquática (Owens *et al.*, 2009) (Figura 2).

Dados eletrofisiológicos em *Anableps anableps* descrevem respostas diferentes nas retinas ventral e dorsal, sugerindo que ambas porções da retina são estimuladas diferentemente. Esta resposta está relacionada com o campo visual estimulado, sendo observado um nível maior de resposta quando estimulado o campo visual aéreo. As informações vindas do campo visual aéreo são absorvidas pela retina ventral, sendo esta mais espessa e apresenta maior quantidade de células bipolares quando comparada com a retina dorsal, que recebe informações vinda do campo aquático (Saidel & Fabiane, 1998; Albensi & Powell, 1998).

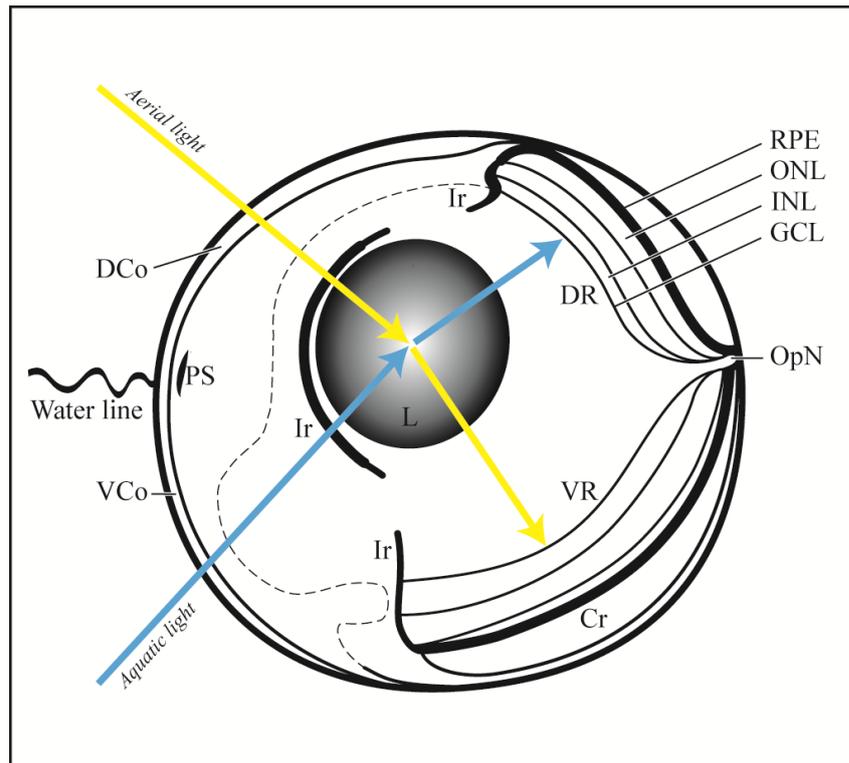


Figura 2- Esquema do olho de *Anableps*, mostrando as principais estruturas oculares. A luz proveniente do ambiente aéreo é projetada na retina ventral (setas amarelas) e a luz proveniente do ambiente aquático incide na retina dorsal (setas azuis). Córnea Dorsal (DCo), Córnea Ventral (VCo), faixa de pigmento (PS), íris (Ir), Retina dorsal (DR), Retina ventral (VR), Coroide (Cr), Epitélio pigmentado da retina (RPE), Esclera (Sc), nervo óptico (OpN), camada de células ganglionares (GCL), camada nuclear interna (INL), camada nuclear externa (ONL).

1.2. Padronização ocular em vertebrados

O primeiro indício do surgimento do primórdio dos olhos em vertebrados é percebido durante a formação e maturação da região ventral do prosencéfalo (cérebro anterior). Muitos atributos humanos, como memória, emoção e consciência são organizados nesta região. Apesar de sua variedade funcional, o prosencéfalo é conservado em todos os vertebrados e a complexidade que esta estrutura adquire durante a sua maturação determina a diversidade de funções observada entre espécies (Hoch *et al.*, 2009; Varga *et al.*, 1999).

O desenvolvimento do olho de vertebrados ocorre em duas etapas: 1) formação da vesícula óptica; 2) indução do placódio do cristalino, seguindo a formação do cálice óptico e do cristalino. O processo de formação da vesícula óptica envolve a evaginação e migração de um grupo de células do diencéfalo para o futuro sítio de formação do campo ocular (Bejarano-Escobar *et al.*, 2014) (Figura 3). Várias vias de sinalização celular estão envolvidas direta ou indiretamente com a formação dos olhos. Algumas das vias de sinalização que têm recebido atenção especial e que exercem um papel importante durante a formação dos olhos são as vias de sinalização *Wingless - type* (Wnt), *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) e *Fibroblast Growth Factors* (FGF) (Leuzinger *et al.*, 1998; Logan & Nusse, 2004; Lamb, 2013).

Além destas vias de sinalização, genes como o *Otx2*, *Pax6*, *Six3*, *Six6* e genes da família RX também desempenham papel importante na diferenciação do prosencéfalo e na formação dos olhos, sendo comumente utilizados como marcadores moleculares no desenvolvimento ocular (Acampora *et al.*, 1999, 2000 e 2001). *Otx2*, por exemplo, é um dos primeiros genes expressos na região da placa neural anterior. Camundongos deficientes para este gene não formam a região do prosencéfalo, indicando função na formação, ou padronização desta região no cérebro (Puelles *et al.*, 2004).

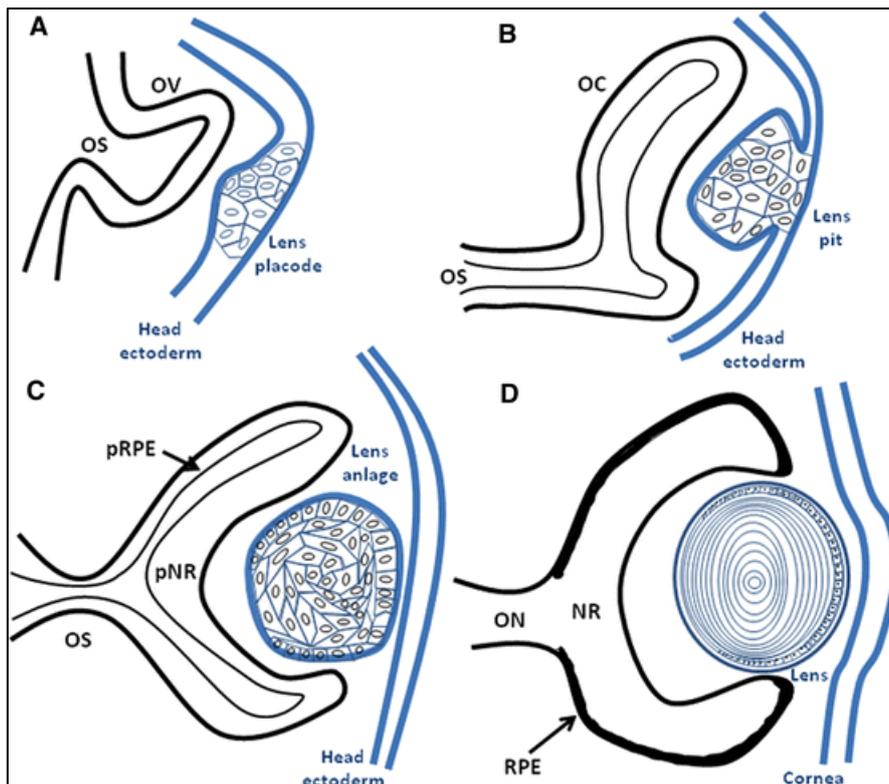


Figura 3- Ilustração o desenvolvimento do olho de peixes. A) Formação da vesícula óptica (OV) a partir da evaginação do diencéfalo. A neuroectoderme começa a evaginar dando origem ao placódio do cristalino; B) A vesícula óptica começa a invaginar originando o cálice óptico (OC). A delaminação da neuroectoderme continua formando cristalino; C) O cálice óptico torna-se padronizado na retina neural presuntiva (pNR), no epitélio pigmentado da retina presuntiva (pRPE) e na haste óptica (OS). A neuroectoderme continua evaginando e finalmente o cristalino se desprende da mesma; D) O olho já está formado, a haste óptica dá origem ao nervo óptico (ON) e a neuroectoderme dá origem à córnea (Adaptado de Bejarano-Escobar *et al.*, 2014).

1.3. Composição ocular de vertebrados e organização da retina

Os olhos de vertebrados são altamente especializados e ao longo da evolução mantiveram-se consideravelmente inalterados, com modificações específicas para cada grupo (Figura 4). Este órgão é composto por três camadas: esclera, úvea e retina; e três estruturas mais externas: cristalino, córnea e pupila. A esclera é a camada mais externa e forma a “parte branca” do olho. Essa camada consiste em uma cápsula rígida de tecido conjuntivo onde os músculos oculares extrínsecos se conectam, ajudando a definir o

globo ocular e a manter a córnea transparente. Geralmente, em aves, répteis e peixes, é encontrada uma pequena placa de ossos chamada de ossículos esclerais, que tem como função manter a forma da esclera (Goldman, 2014).

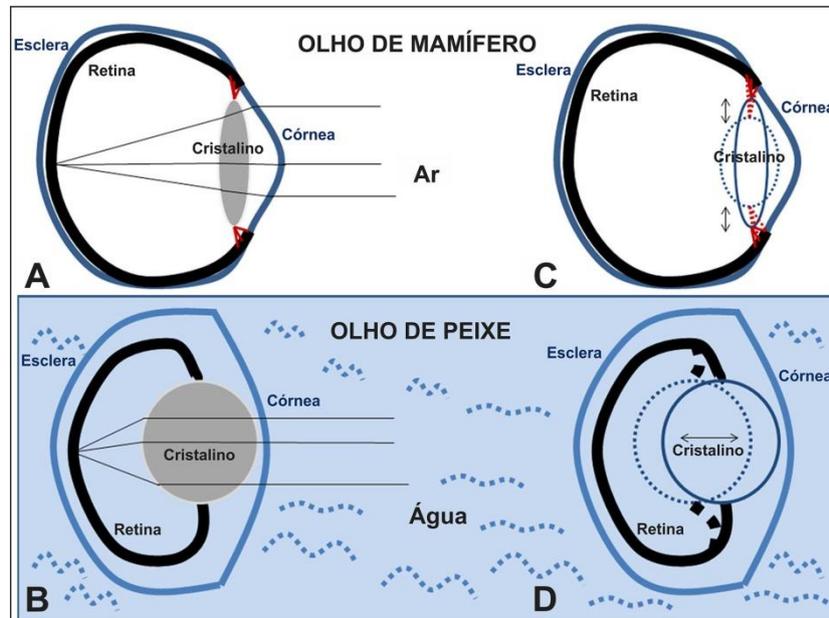


Figura 4- Comparação entre olho de mamífero e olho de peixe. A) Em mamíferos existem músculos ciliar (em vermelho) responsáveis pelo movimento do cristalino, fazendo com que ele se comprima ou se alongue verticalmente de acordo com a necessidade luminosa. B) Em peixes, o cristalino apresenta um alto nível de refração, é redondo e não apresentam esse músculo, seu movimento é antero- posterior (Adaptado de Bejarano-Escobar *et al.*, 2014).

A segunda camada do olho é chamada de úvea é composta por três partes: a coróide que é uma camada pigmentada altamente vascularizada, que fornece suporte nutricional para o tecido ocular e impede que a luz que chega até a retina, seja refletida; corpo ciliar que é um pequeno círculo de músculo liso localizado no interior do globo ocular, responsável por controlar a acomodação visual e acoplar a pupila através de um ligamento suspensor; e a íris, a parte pigmentada do olho, que controla a quantidade de luz que entra através da pupila. Por fim, a terceira camada que encontra-se na região mais interna do olho é a retina, que tem como principal função captação de feixes de

luz e a transformação desta informação em impulsos elétricos transmitidos para o cérebro através do nervo óptico. (Kardong, 2014; Goldman, 2014) (Figura 5).

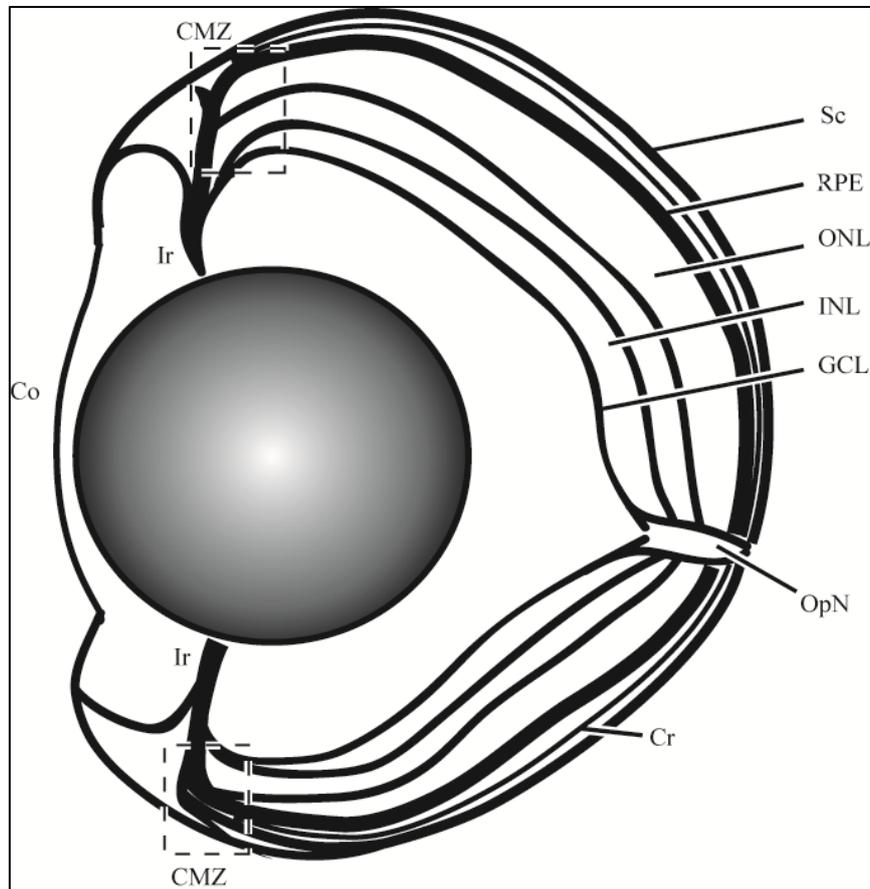


Figura 5- Esquema do olho de Zebrafish (*Danio rerio*), mostrando as principais estruturas do olho de vertebrado. Córnea (Co), Coroíde (Cr), íris (Ir), Zona Marginal Ciliar (CMZ), Epitélio pigmentado da retina (RPE), Esclera (Sc), nervo óptico (OpN), camada de células ganglionares (GCL), camada nuclear interna (INL) e camada nuclear externa (ONL).

A retina de vertebrados por sua vez, é composta por três camadas nucleadas, dentre elas a camada nuclear externa (ONL: *outer nuclear layer*), camada nuclear interna (INL: *inner nuclear layer*) e camada de células ganglionares (GCL: *ganglion cell layer*). Na camada nuclear externa são encontrados os fotorreceptores, sendo eles: cones (sensíveis à cores) e bastonetes (sensíveis à luminosidade), que absorvem a luz através de

proteínas presentes na membrana plasmática destas células chamadas opsinas. Através das opsinas, as informações são transmitidas por três tipos de interneurônios que residem na camada nuclear interna: células bipolares, células amácrinas e células horizontais. Mais internamente à camada nuclear externa, está localizado o epitélio pigmentado da retina, responsável pela absorção da luz e pela conexão da mesma com os fotorreceptores. A camada de células ganglionares recebe os impulsos e envia seus axônios para o cérebro através do nervo óptico, transferindo as informações visuais absorvidas para o cérebro. Os axônios das células ganglionares formam uma camada de fibras nervosas (NFL: *nerve fiber layer*), as sinapses entre os fotorreceptores e os interneurônios formam a camada plexiforme externa (OPL: *outer plexiform layer*), e as sinapses entre os interneurônios e células ganglionares formam a camada plexiforme interna (IPL: *inner plexiform layer*) (Bejarano-Escobar *et al.*, 2014; Goldman, 2014) (Figura 6).

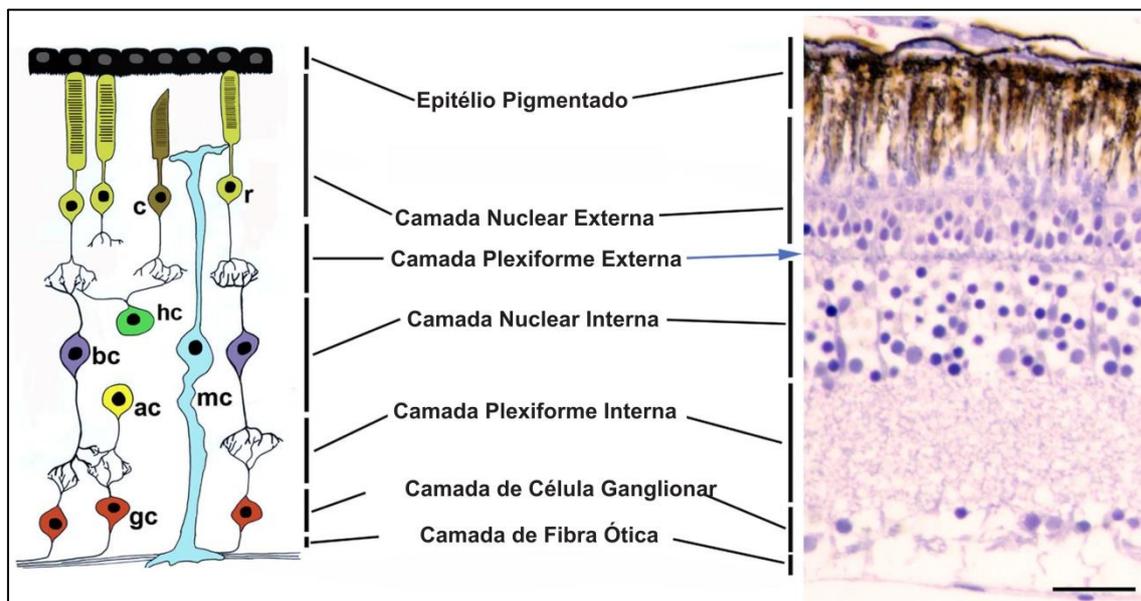


Figura 6- Esquema ilustrando a organização das camadas da retina de vertebrados e o tipo celular que compõe cada camada. À direita um corte da retina de peixe, mostrando as camadas da retina. Cone (C), Bastonete (R), Célula bipolar (BC), Célula horizontal (HC), Célula Amacrina (AC), Célula Müller (MC) e Célula ganglionar (GC) (Adaptado de Bejarano-Escobar *et al.*, 2014).

Em peixes teleósteos, o desenvolvimento da retina é dividido em três períodos. No primeiro período a região central do cálice óptico é mais espessa que a região periférica, no entanto, não há diferenciação celular na retina. O segundo período é marcado pela formação das camadas na região central da retina, sendo a IPL mais visível no centro da retina, além da IPL delimitar o centro da retina e a CMZ. O terceiro e último período é marcado pelo espessamento das camadas da retina do centro para a periferia (Alunni *et al.*, 2007).

O desenvolvimento da retina em truta (*Salmo trutta fario*), também é dividido em três períodos. O primeiro período caracterizado pela desorganização das camadas da retina, nesse estágio ainda não há nenhuma diferenciação das regiões. O segundo período é marcado pela formação progressiva das camadas, sendo que a IPL se torna visível e seu final define o limite da região central e da CMZ. A ONL torna-se claramente distinguível na região central da retina. Esse período termina quando a OPL se torna visível. O terceiro e último período é marcado pelo espessamento das camadas da retina da região central para a periférica (Candal *et al.*, 2005).

Ferreiro-Galve e colaboradores (2009) descreveram a morfogênese da retina neural embrionária de duas espécies de tubarão (*Scyliorhinus canicula* e *Haploblepharus fuscus*) também em três períodos de desenvolvimento. No primeiro período ocorre o surgimento neuroepitelial da retina, organização das células radiais em colunas e não há qualquer diferenciação regional das camadas da retina (Figura 7, A). No segundo período do desenvolvimento ocorre o surgimento da região central da retina, onde IPL se distingue entre a GCL e a INL, também ocorre o surgimento da fibra óptica e a camada OPL torna-se visível entre a ONL e INL. Com as camadas da retina já formadas, elas definem a zona marginal ciliar (CMZ). A zona de transição é definida entre a CMZ e a área de camadas central da retina (Figura 7, B). Durante o terceiro e último período as camadas da retina se estendem da região central da retina para a periferia. As camadas OPL e IPL são mais facilmente observadas, exceto na região temporoventral onde apenas as camadas GCL, IPL e INL, são distinguíveis (Figura 7, C e D). Os autores compararam a retina neural de

tubarões juvenis e adultos, e observaram que a retina aumenta em superfície e diminui em espessura, sendo bastante evidente na INL.

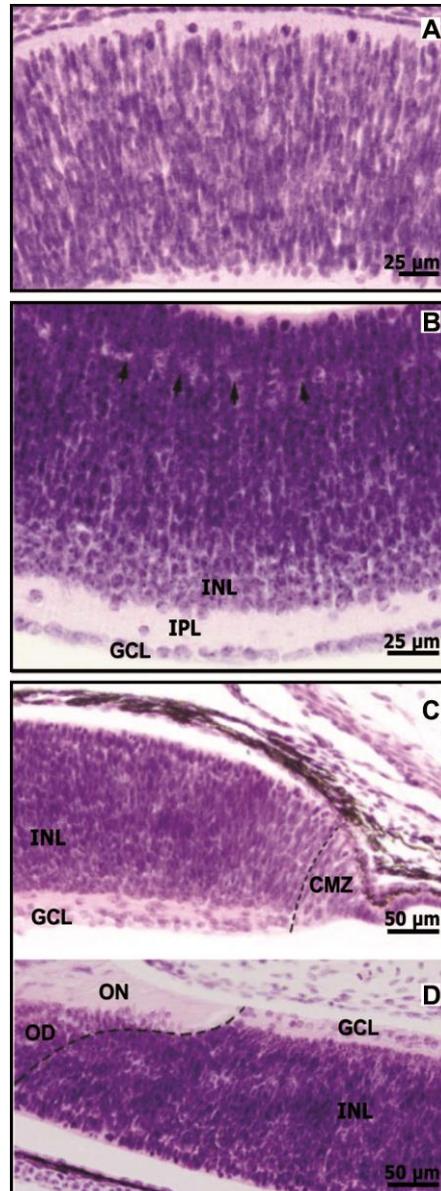


Figura 7- Microscopia eletrônica mostrando os três períodos de desenvolvimento embrionário da retina de *Scyliorhinus canicula*. Em A, B e C, a esclera está na parte superior; em D, a esclera está na parte inferior da imagem. A) Primeiro período de desenvolvimento, sendo caracterizada pelo alto nível de proliferação celular; B) Segundo período de desenvolvimento, ilustrando a organização das camadas, exceto na região temporoventral. Setas em B indicam a OPL primordial na retina central do estágio embrionário 32; C-D) Terceiro período de desenvolvimento da retina (Adaptado de Ferreira-Galve *et al.*, 2009).

A retina de peixes e anfíbios é constituída por uma região conhecida como Zona Marginal Ciliar (CMZ), essa região contém células multipotentes com capacidade proliferativa, capazes de produzir todos os tipos de células da retina, além de permitir o crescimento contínuo da retina ao longo da vida do animal, diferentemente da retina de mamíferos (Alunni *et al.*, 2007). Marcadores moleculares como Histona H3 fosforilada (HH3) são comumente utilizados para identificar as fontes de células proliferativas na retina.

1.4. Desenvolvimento do Neurocrânio de peixes teleósteos

O desenvolvimento do neurocrânio é um parâmetro utilizado há anos para auxiliar na identificação de espécies de peixes. Estudos comparativos entre grupos relacionados podem ajudar no entendimento da ontogenia e evolução de peixes, além de auxiliar no entendimento de modificações/adaptações ósseas que ocorreram nos grupos (Kuratani & Ota, 2008).

O neurocrânio de peixes teleósteos é basicamente dividido em quatro regiões: região olfativa, região orbital, região ótica e região occipital. A região olfativa é composta pelos ossos mesentimóide, etimóide lateral, vômer e nasal.. A região ótica é formada pelos ossos pró-ótico, esfénótico, parietal, intercalar, pterótico e epoccipital. Já a região occipital, sendo formada pelos ossos basioccipital, exoccipital e supra-occipital. Por último A região orbital é constituída pelos ossos paraesfenóide, osso frontal, pteroesfenóide e órbito-esfenóide. Esta sequênciade ossificação, geralmente, segue a ordem cronológica supracitada (Mattox *et al.*, 2014) (Figura 8).

A caixa craniana por sua vez sofre modificações de acordo com o habitat de cada grupo, o desenvolvimento do osso frontal por exemplo, em *S. brasiliensis* ocorre antero-posterior ao longo da *Taenia marginalis*, abrangendo a região dorsal do neurocrânio para a cavidade orbital, através do etimóide lateral. Com relação ao órbito-esfenóide, ele é um osso par, que surge pela primeira vez ao longo da região ventral de *Taenia marginalis* anterior para a

barra epífiseal e se expande ao longo da região ventral de *Taenia marginalis* (Mattox *et al.*, 2014).

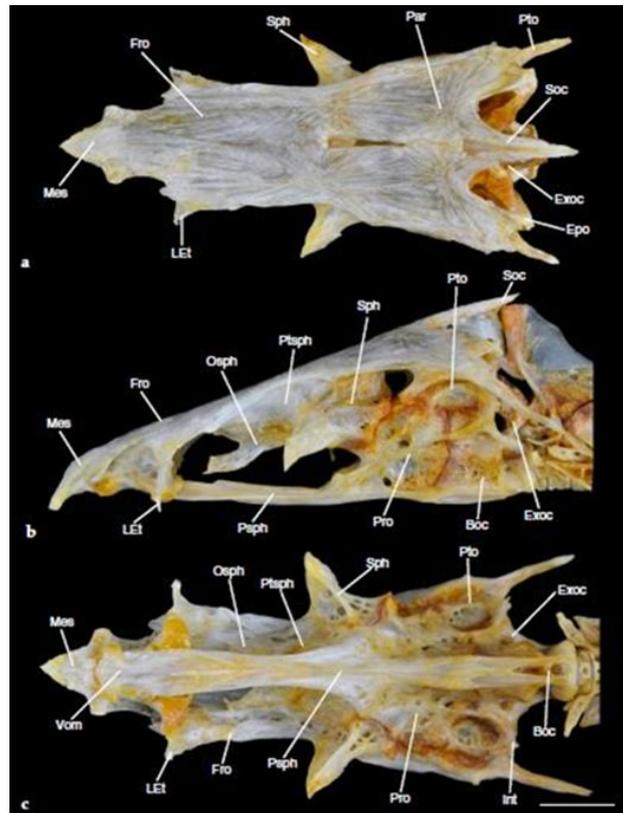


Figura 8- Neurocrânio de *Salminus brasiliensis*. a) Vista dorsal; b) vista lateral; c) vista ventral. Basioccipital-Boc; Epiótico-Epo; Exoccipital-Exoc.; Frontal-Fro; Intercalar-Int; Etimódio lateral-LEt; Mesentimódio-Mes; Órbito-esfenóide-Osph; Parietal-Par; Pró-ótico-Pro; Paraesfenóide-Psph; Pterótico-Pto; Pteroesfenóide-Ptsph; Supra-occipital-Soc; Esfenótico-Sph; Vôrme-Vom. Escala 10 mm (Adaptado de Mattox *et al.*, 2014).

Para o entendimento dos mecanismos que governam as modificações ósseas e oculares da espécie *Anableps anableps* é necessário um estudo detalhado dos estágios larvais e desenvolvimento ocular. Os resultados aqui obtidos ajudarão o entendimento das modificações oculares que ocorreram neste gênero, permitindo assim, que o *A. anableps* seja utilizado como organismo modelo para o estudo de inovações morfológicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Realizar caracterização ontogenética e descrição morfológica e molecular da retina durante o desenvolvimento ocular do peixe de quatro olhos *Anableps anableps*.

2.2. Objetivos Específicos

- I- Descrever os estágios larvais de *A. anableps*, utilizando parâmetros morfométricos estabelecidos anteriormente para peixes;
- II- Descrever o desenvolvimento do neurocrânio através da técnica de diafanização;
- III- Descrever o desenvolvimento morfológico da retina ao longo do desenvolvimento através da técnica de H&E
- IV- Identificar o padrão de proliferação celular na retina ao longo do desenvolvimento ocular através do marcador de proliferação celular HH3;
- V- Caracterizar as retinas ventral e dorsal ao longo do desenvolvimento ocular através de marcadores moleculares para as camadas da retina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de material

Para todos os procedimentos deste trabalho foram coletadas apenas fêmeas grávidas de *Anableps anableps* em oito expedições realizadas entre Outubro de 2013 e Setembro de 2014 no furo da Ostra, Município de Bragança, Pará, Brasil (00°53'28" S, 46°39'22" W). Os peixes foram coletados com auxílio de redes de arrasto com 4 centímetros entre nós opostos, e posteriormente anestesiados com eugenol (óleo de cravo), dissolvido em água destilada na concentração de 1:1200.

A obtenção de larvas para a morfometria ocorreu por meio de corte sagital ventral e posterior remoção dos ovários. As larvas obtidos foram lavadas em 1x PBS (tampão fosfato-salina) e fixadas em paraformaldeído 4% (PFA) diluído em 1x PBS *overnight* a 4°C. Em seguida, as larvas foram desidratadas em lavagens graduais de metanol (100% PBS 2x, 75% PBS/25% Metanol, 50% PBS/50% Metanol, 25% PBS/ 75% Metanol e 100% Metanol 2x) de 10 minutos cada para posterior armazenamento a -20°C para conservação das estruturas teciduais.

Amostras de olhos para histologia e imunofluorescência foram removidas e congeladas imediatamente em Tissue-tek OCT, Sakura (optimal cutting temperature compound) crio-seccionadas em Criostato (Leica CM1850) a 20µm em lâminas Colorfrost Plus® e fixadas em PFA 3% por 5 minutos, lavadas em PBS 0.01M, desidratadas gradualmente em etanol (70%, 95% e 100%) por 2 minutos, e armazenadas em freezer -80°C (Shan-Rong Shi *et al.*, 2008).

3.2. Morfometria

As larvas foram classificados em estágios de desenvolvimento ocular seguindo parâmetros morfométricos quantitativos: (1) divisão ocular, (2) comprimento total, (3) diâmetro do olho, (4) perímetro do olho e (5) distância interocular. Caracteres adicionais qualitativos como tamanho do vitelo, e padrões de pigmentação do corpo também foram analisados para a delimitação

dos estágios (Pereira *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2011). Para as medições, foram utilizadas lupa microscópica (NIKON, SMZ1000), régua e auxílio do programa Motic Images Plus 2.0. As fotografias das larvas foram realizadas com a câmera DMC-FZ150 Panasonic e Motic 5.0.

3.3. Diafanização

Três exemplares de cada estágio de *A. anableps* foram diafanizados seguindo processo de clareamento e de dupla coloração adaptado de Taylor & Van Dyke (1985). As larvas foram fixados em paraformaldeído (PFA) 4% por 24h. Após a fixação foram desidratados em lavagens graduais de PBS/Metanol por 10 min em cada. Em seguida, a cartilagem foi corada com Alcian Blue 8GX por 24h. Após esta etapa, as amostras passaram por um processo de neutralização em solução de borato de sódio por 48h. Posteriormente, as amostras passaram por um procedimento de clareamento em solução de peróxido de hidrogênio 10%/solução de hidróxido de potássio 0.5% por 30 minutos. Após o clareamento, as amostras passaram por um processo de limpeza utilizando a enzima tripsina diluída em borato de sódio 30% por 12h, que degrada toda a proteína do corpo do animal. Em seguida, passaram pela solução de Alizarin red por 24h, cujo objetivo é corar tecido ósseo. Depois foram lavadas com água destilada e colocadas novamente em tripsina por 12h. Para finalizar a técnica e estocar as amostras, elas passaram por três lavagens em glicerol/KOH 0.5%: 1) Glicerol 40% + KOH 0.5%- 60%; 2) Glicerol 70% + KOH 0.5%- 30%; 3) Glicerol 100%. As espécimes foram fotografadas com a câmera DMC-FZ150 da Panasonic.

A nomenclatura osteológica em português foi realizada de acordo com Castro & Castro (1987).

3.4. Coloração com Hematoxilina e Eosina

Para coloração com Hematoxilina e Eosina foi utilizado protocolo padrão (Kiernan, 2008).

Para a montagem das lamínulas foi utilizado o reagente Cytoseal 60 e lamínulas (*Fisherfinest Premium*[®]). As amostras foram fotografadas utilizando microscópio *Nikon* - Eclipse Ci, com o auxílio do programa Motic Images Plus 2.0.

3.5. Imunofluorescência

Foi utilizado 1XPBS/5% de soro normal de cabra/0.3% de Triton[®] X-100 para preparar o tampão de bloqueio e; 1XPBS/1%BSA/0.3% de Triton[®] X-100 para preparar o tampão de diluição dos anticorpos. As lâminas foram retiradas do freezer -80°C e deixadas a temperatura ambiente por 15 minutos; em seguida foram imersas três vezes em 1XPBS por cinco minutos cada; depois foram incubadas em tampão de bloqueio por 60 minutos, e depois incubadas em anticorpo primário diluído em tampão de diluição do anticorpo (Tabela 1), e deixadas durante a noite em 4°C. No dia seguinte foram imersas três vezes em 1XPBS por cinco minutos cada, depois foram incubadas em anticorpo secundário, conjugado com o fluoróforo verde (fluoresceína isocianetada – FITC), diluído em tampão de diluição do anticorpo, por 1-2 horas. Após a incubação, adicionou-se um meio de montagem com DAPI (*Fluoroshield*TM com DAPI - sigma F6057), As lâminas foram fotografadas em microscópio *Nikon* – Eclipse 80i utilizando câmera NIKON- DS Ri1, com o auxílio do programa NIS elements.

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados nas imunofluorescências, N^o. de catálogo e concentração utilizada.

| Anticorpo | Empresa/número de catálogo | Concentração |
|--------------------------------|----------------------------|--------------|
| Histona fosforilada H3 (HH3) | Abcam Cat. No. ab5176 | 1:100 |
| Rodopsina (Rod) | Milipore Cat. No. MABN15 | 1:500 |
| Opsina Verde/vermelha (Opsina) | Milipore Cat. No. AB5405 | 1:100 |

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização dos estágios de *Anableps anableps*

Foram capturadas 118 espécimes no município de Bragança – Pará (Figura 9), dos quais obteve-se 826 larvas (Tabela 2).

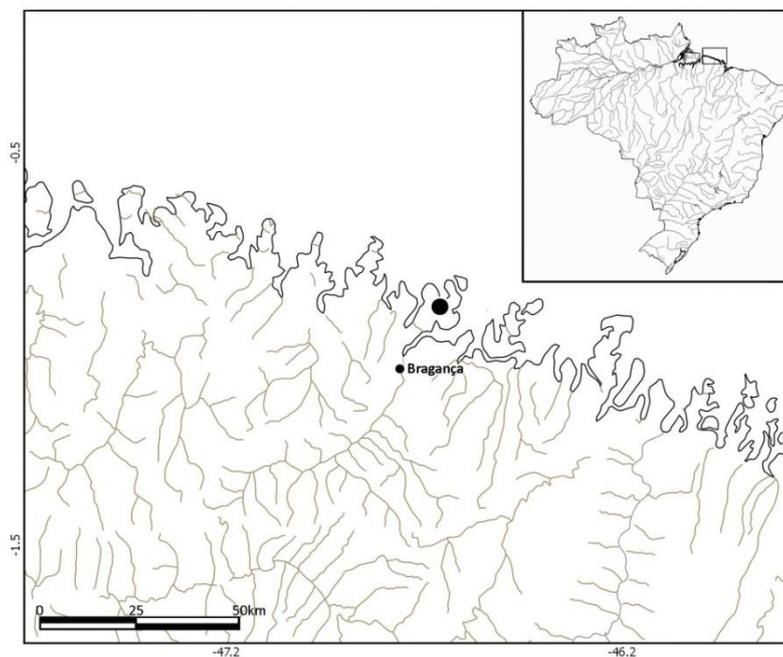


Figura 9- Mapa da costa Norte do Estado do Pará (00°53'28" S, 46°39'22" W). O ponto indica o local de coletas dos espécimes de *Anableps anableps*.

Tabela 2- Identificação do estágio larval por número de fêmeas.

| Estágio Larval | Fêmeas (n) | Larvas (n) |
|-----------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | 12 | 83 |
| 2 | 14 | 133 |
| 3 | 32 | 241 |
| 4 | 26 | 186 |
| 5 | 22 | 115 |
| 6 | 12 | 68 |
| Total | 118 | 826 |

Através da análise morfométrica e morfológica das larvas de *A. anableps*, foi possível identificar seis estágios de desenvolvimento (Figura 10). Vale ressaltar que a classificação dos estágios teve ênfase no desenvolvimento ocular. Foram então definidos seis estágios, numerados de 1 a 6 (Tabelas 3, Figura 11).

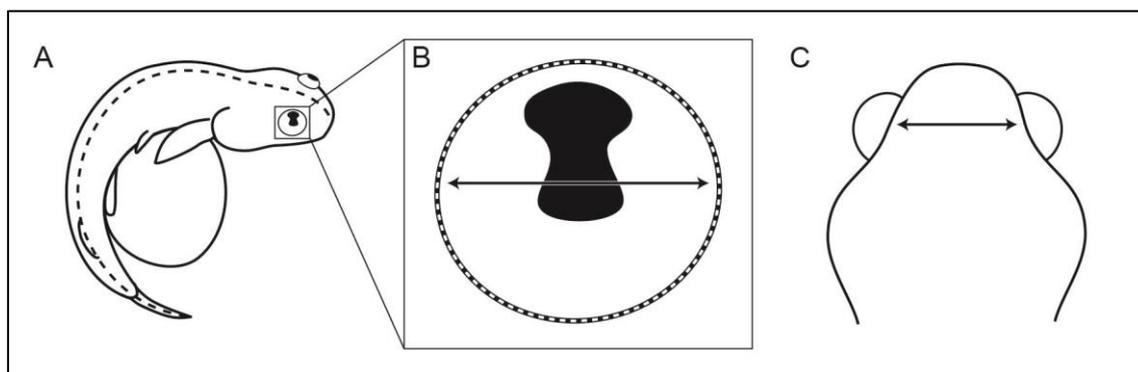


Figura 10- Demonstração de como foram medidos os parâmetros morfométricos quantitativos para classificação das larvas. A) Comprimento total (linha tracejada); B) Perímetro ocular (linha tracejada) e diâmetro ocular (seta de ponta dupla); C) Distância interorbital (seta de ponta dupla).

Tabela 3- Identificação dos estágios larvais. Valores mínimo, máximo, média e desvio padrão são apresentados respectivamente. As medidas estão representadas em milímetros (mm). O número amostral para cada estágio foi de 10 exemplares (N = 10).

| Estágios | Comprimento total (mm) | Diâmetro ocular(mm) | Perímetro do olho (mm) | Distância interorbital (mm) |
|----------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| 1 | 4,50-7,50 (5,84 ± 0,79) | 0,29-0,52 (0,38 ± 0,05) | 0,93-1,34 (1,13 ± 0,10) | 0,49-0,85 (0,74 ± 0,11) |
| 2 | 8,41-11,40 (9,53 ± 0,85) | 0,44-0,78 (0,61 ± 0,08) | 1,46-2,34 (1,83 ± 0,23) | 1,04-1,78 (1,56 ± 0,26) |
| 3 | 19,00-24,00 (21,90 ± 1,57) | 1,33-1,50 (1,40 ± 0,04) | 4,20-4,67 (4,44 ± 0,17) | 3,37-4,02 (3,79 ± 0,18) |
| 4 | 27,00-38,66 (35,77 ± 3,90) | 2,04-2,22 (2,10 ± 0,05) | 6,16-6,85 (6,50 ± 0,22) | 4,53-5,73 (5,39 ± 0,35) |
| 5 | 39,85-47,68 (43,96 ± 2,34) | 2,24-2,41 (2,34 ± 0,05) | 6,79-7,80 (7,32 ± 0,32) | 5,44-6,67 (6,18 ± 0,36) |
| 6 | 61,00-65,01 (62,75 ± 1,25) | 2,61-3,23 (3,07 ± 0,18) | 8,42-10,13 (9,64 ± 0,51) | 5,69-8,59 (7,86 ± 1,10) |

Com relação aos parâmetros qualitativos, os estágios de desenvolvimento ocular de *A. anableps* podem ser caracterizados do seguinte modo:

Estágio 1 – Olho com pigmentação, ausência de divisão das estruturas oculares. Presença de pontos de pigmentação apenas na região dorsal da cabeça. Presença de vitelo (Figura 11 - A e B).

Estágio 2 – Olhos com pigmentação, ausência de divisão das estruturas oculares. Aumento da pigmentação na região dorsal da cabeça. Presença de vitelo com estruturas de absorção (Figura 11 - C e D; Figura 12 – B e C).

Estágio 3 – Início da divisão de córneas e pupilas. Intensificação da pigmentação na região mediana do olho. Início da ossificação do osso frontal. Início da formação da faixa mediana dorsal. Pigmentação dispersa nos flancos. Presença de vitelo com estruturas de absorção. (Figura 11 - E e F; Figura 12 – A, B e C).

Estágio 4 – Córneas e pupilas ainda em divisão. Início do desenvolvimento da expansão dorsolateral do osso frontal. Corpo bastante pigmentado, com início de pigmentação nas nadadeiras anteriores. Faixa mediana dorsal e faixas laterais mais delimitada. Presença de vitelo com estruturas de absorção. (Figura 11 - G e H; Figura 12 – B e C).

Estágio 5 – Córneas e pupilas ainda em divisão. Aumento da intensificação da pigmentação mediana do olho. Expansão dorsolateral do osso frontal ultrapassa o perfil dorsal da cabeça. Faixa mediana dorsal e faixas laterais evidentes. Vitelo (Figura 11 - I e J; Figura 12 – B e C).

Estágio 6 - Córneas e pupilas quase ou completamente divididas, com presença de faixa pigmentada na região mediana do olho. Padrão de pigmentação semelhante ao do indivíduo adulto. Vitelo pouco visível ou ausente (Figura 11; K e L).

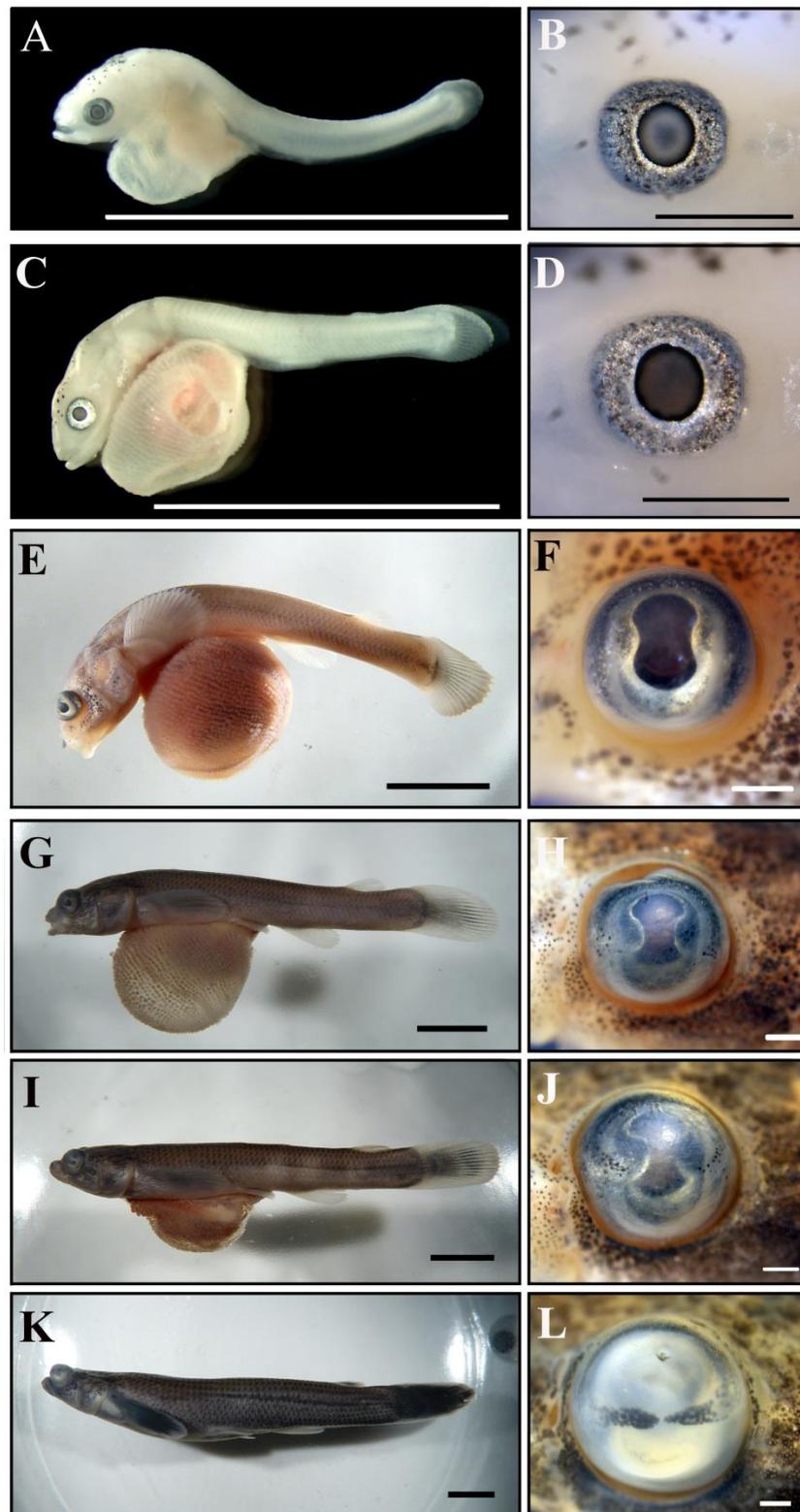


Figura 11- Estágios larvais de *A. anableps*. Representantes dos estágios larvais 1, 2, 3, 4, 5, e 6, em A, C, E, G, I e K, respectivamente. Figuras a direita são ampliações da região ocular dos indivíduos à esquerda. Escala: A, C, E, G, I e K (5 mm); B (0,5 mm, aprox. 6); D (0,5 mm, aprox. 10); F (0,5mm, aprox. 4); H e J (0,5 mm, aprox. 3); L (0,5 mm, aprox. 2).

4.2. Análise osteológica do neurocrânio de *Anableps anableps*

A característica osteológica mais distinta no neurocrânio de *Anableps* foi o desenvolvimento da expansão dorsolateral do osso frontal, formando uma cobertura medial óssea para a órbita, sendo esta, desenvolvida para fora do perfil dorsal da cabeça. Além disso, observou-se o aparecimento do septo interorbital cartilaginoso.

Não há sinais de ossificação no neurocrânio em larvas do estágio 1 e em larvas do estágio 2 (Figura, 12 e 13, A) As primeiras ossificações no neurocrânio aparecem no estágio 3, quando os ossos frontais aparecem pela primeira vez, como uma tala fina de osso ao longo da margem medial do *taenia marginalis anterioris* (Figura 12 e 13, B) . De modo geral, o neurocrânio ainda é pouco desenvolvido.

No estágio 4, o osso frontal já está mais desenvolvido, uma aba membranosa de tecido mole começa a desenvolver-se dorsolateralmente sobre o olho, a partir da região de desenvolvimento do etmóide lateral para a ponta do processo do esfenótico. Em vista lateral, esta aba ultrapassa o perfil dorsal do neurocrânio, seguindo a forma do olho (Figura 12 e 13, C).

No estágio 5, a aba dorsolateral de tecido cartilaginoso continua a crescer no sentido medial ao olho, seguida e igual à expansão dorsolateral do osso frontal, ambas as estruturas ultrapassam o perfil dorsal da cabeça (Figura 12 e 13, D).

Além da expansão dorsolateral do osso frontal que cobre o olho dorsalmente, um septo inter-orbital cartilaginoso divide parte do espaço entre as cavidades orbitais contralateralmente.

Em indivíduo adulto da de *A. anableps*, o osso frontal já está completamente ossificado e expandido, e o septo inter-orbital também está completamente ossificado (Figura 14, A e B).

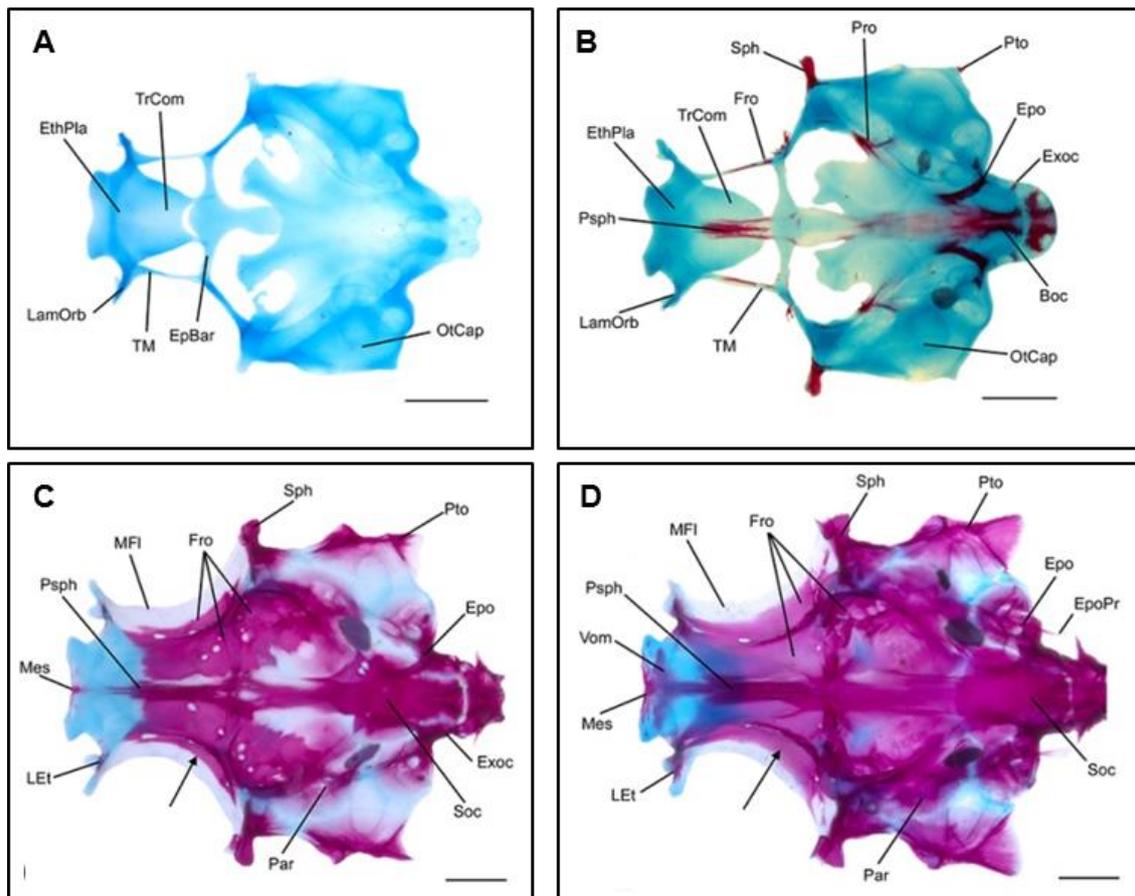


Figura 12- Vista dorsal do neurocrânio diafanizado durante o desenvolvimento ocular de *A. anableps*. A) Larva no estágio 2, sem ossificação do neurocrânio; B) Início da ossificação do neurocrânio, larva no estágio 3; C) Início da expansão do osso frontal, estágio 4; D) Larva no estágio 5, osso frontal mais ossificado. Em C e D, as setas indicam a expansão dorsolateral do osso frontal. Boc – basioccipital; EpBar – Barra epífisial; Epo – epiótico; EpoPr – Processo epiótico; EthPla – Placa etmóico; Exoc – exoccipital; Fro – frontal; IntSp – septo inter-orbital; LamOrb – *lamina orbitonasalis*; LEt – Etimóide lateral; MFI – aba mebranosa; OtCap – Capsula ótica; Par – parietal; Pro – pró-ótico; Pto – pterótico; Psph – paresfenóide; Soc – supra-occipital; Sph – esfenótico; TM – *taenia marginalis*; TrCom – *trabecula communis*; Vom – vômer. Escala de 1mm.

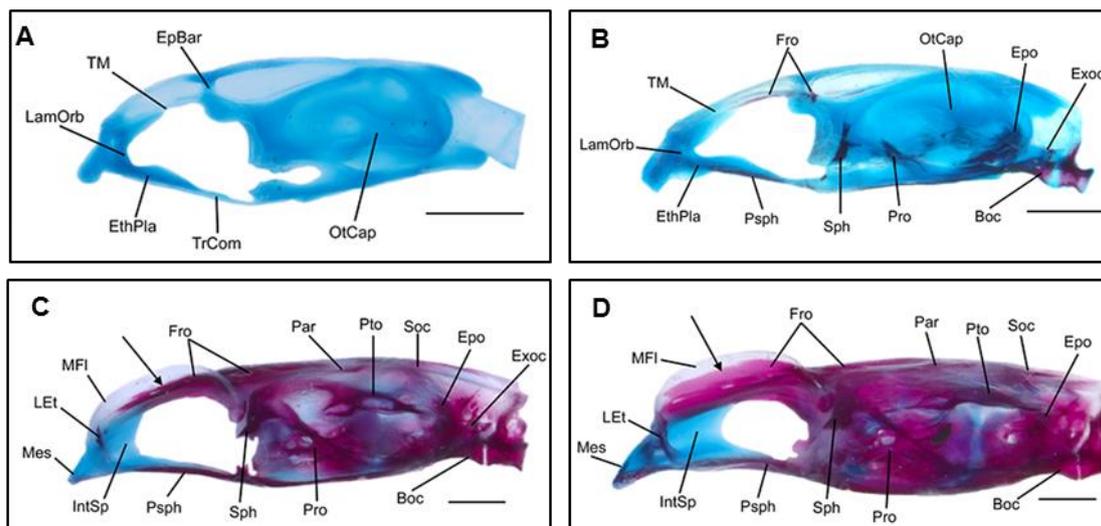


Figura 13- Vista lateral do neurocrânio diafanizado durante o desenvolvimento ocular de *A. anableps*. A) Larva no estágio 2, sem ossificação do neurocrânio; B) Início da ossificação do neurocrânio, larva no estágio 3; C) Início da expansão do osso frontal, estágio 4; D) Larva no Estágio 5, osso frontal mais ossificado. As setas mostram a expansão dorsolateral do osso frontal, em C e D. Boc – basioccipital; EpBar – Barra epífisial; Epo – epiótico; EthPla – Placa etmóico; Exoc – exoccipital; Fro – frontal; IntSp – Septo inter-orbital; LamOrb – *lamina orbitonasalis*; LEt – Etimóide lateral; MFI – aba membranosa; OtCap – Capsula ótica; Par – parietal; Pro – prootic; Pro – pró-ótico; Pto – pterótico; Psph – paresfenóide; Soc – supra-occipital; Sph – esfenótico; TM – *taenia marginalis*; TrCom – *trabecula communis*. Escala de 1mm.

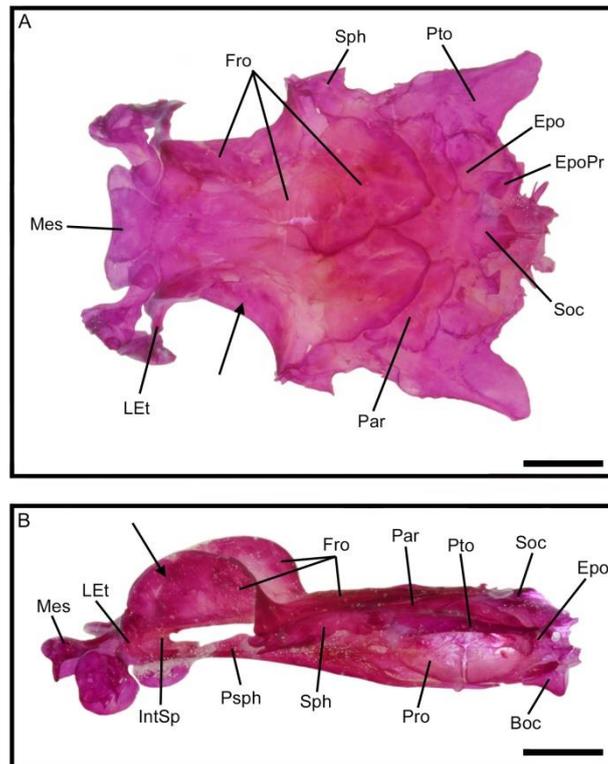


Figura 14- Diafanização do neurocrânio de indivíduo adulto de *A. anableps*. A) Vista dorsal do neurocrânio; B) Vista lateral do neurocrânio. As setas mostram a expansão dorsolateral do osso frontal. Boc – basioccipital; EpBar – Barra epifisial; Epo – epiótico; EthPla – Placa etmóico; Exoc – exoccipital; Fro – frontal; IntSp – Septo inter-orbital; LamOrb – *lamina orbitonasalis*; LEt – Etimóide lateral; MFI – aba membranosa; OtCap – Capsula ótica; Par – parietal; Pro – prootico; Pro – pró-ótico; Pto – pterótico; Psph – paresfenóide; Soc – supra-occipital; Sph – esfenótico; TM – *taenia marginalis*; TrCom – *trabecula communis*. Escala de 5mm.

4.3. Caracterização da retina de larvas de *A. anableps* através da coloração com Hematoxilina e Eosina

A caracterização da retina durante os estágios larvais de *Anableps anableps* foi feita em cinco estágios larvais: estágio 2, estágio 3, estágio 4, estágio 5 e estágio 6. Não havendo diferenças morfológicas evidente entre os estágios 1 e 2.

No estágio 2, a retina apresenta as camadas celulares em processo de laminação. Não sendo óbvia a discriminação entre as camadas celulares.

Neste estágio, não existe diferença de espessura entre as córneas dorsal e ventral, a coroide ventral também não foi detectada (Figura 15, A).

No estágio 3 já é possível observar as camadas da retina e distinguir entre os diferentes tipos celulares. É possível observar uma maior densidade de células tanto na camada nuclear externa ventral (ONL - *outer nuclear layer*), quanto na camada nuclear interna ventral (INL – *inner nuclear layer*) quando comparadas às porções dorsais de ambas camadas. Não foi possível identificar a camada plexiforme externa (OPL – *outer plexiform layer*), e os segmentos externo e interno. Não observamos diferenças entre a córnea dorsal e a ventral, no entanto, a coroide já está desenvolvida (Figura 15, B).

No estágio 4, as camadas da retina estão mais organizadas. As camadas ONL e INL ventrais ainda apresentam maior densidade de células quando comparadas com as porções dorsais. A OPL e os segmentos externos e internos já são visíveis. Neste estágio, também foi possível observar que a córnea dorsal é mais espessa quando comparada com a córnea ventral e a coroide está mais desenvolvida (Figura 15, C).

No estágio 5, ainda é possível observar que as camadas estão se organizando, sendo possível observar as três camadas nucleares (ONL, INL e GCL). Também é possível observar uma camada de NFL, as camadas OPL, IPL e a camada de células ganglionares. Neste estágio, a córnea está mais espessa que nos estágio anterior, e a diferença da espessura das porções dorsal e ventral são mais visíveis (Figura 15, D).

No estágio 6, as camadas da retina estão bem organizadas. As porções dorsais e ventrais das camadas nucleares interna e externa ainda apresentam diferença de densidade celular. A camada de células ganglionares está bem definida. Nesse estágio, também é possível observar a camada NFL e as OPL e IPL, bem definidas. Também é possível observar que a córnea dorsal é bem mais espessa que a córnea ventral, e a coroide está desenvolvida, formando um bolsa atrás do epitélio pigmentado da retina ventral (Figura 15, E).

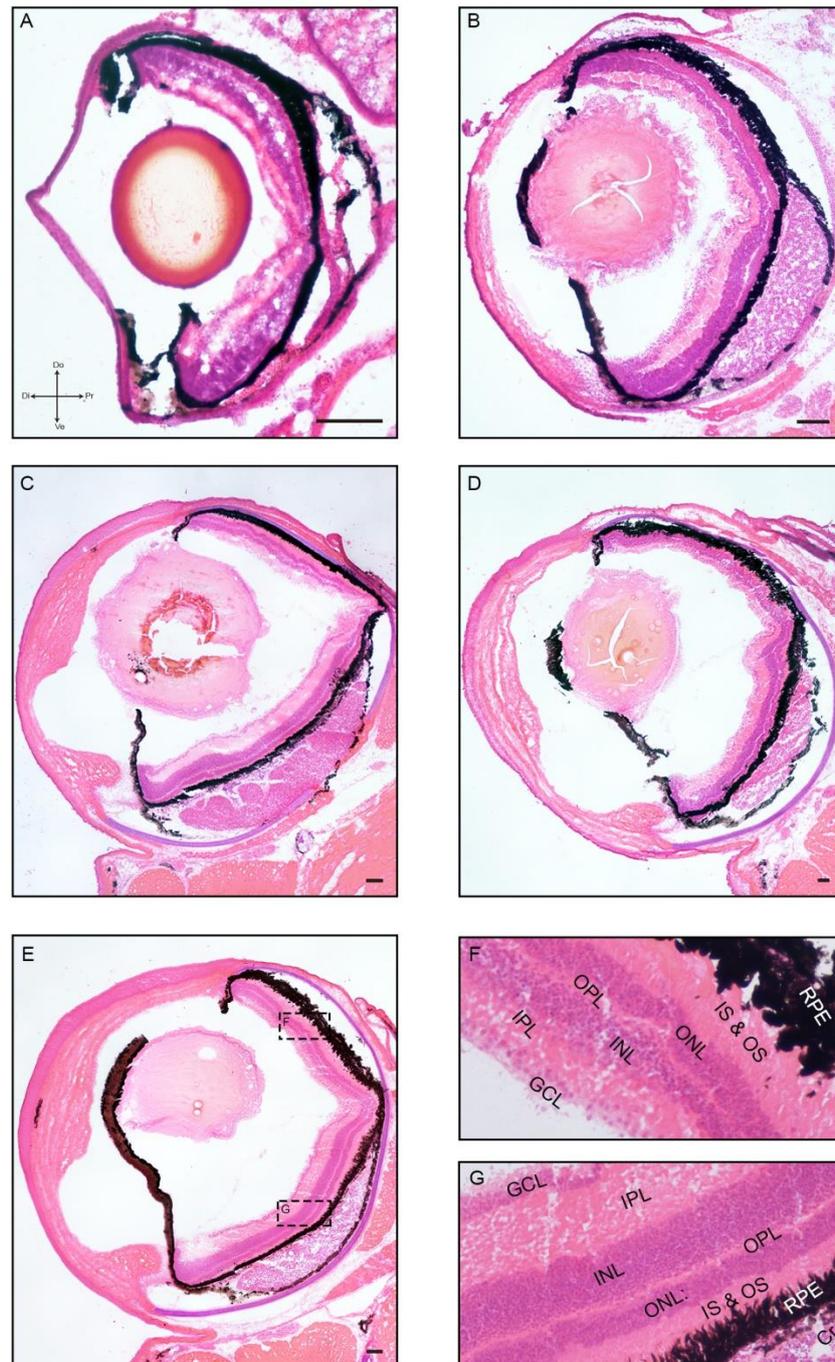


Figura 15- Caracterização da retina de cinco estágios de desenvolvimento larvais em *A. anableps* através de cortes histológicos transversais dos olhos que foram corados com Hematoxilina e Eosina. A) Estágio 2; B) Estágio 3; C) Estágio 4; D) Estágio 5; E) Estágio 6. As caixas pontilhadas indicam as aproximações das retina dorsal (F) e ventral (G). Cortes realizados a 20 μ m e escala das fotos de 0,2 mm, e aumento 20x. Epitélio pigmentado da retina- RPE; Segmento interno- IS; Segmento externo- OS; Camada Nuclear Externa- ONL; Camada Plexiforme Externa- OPL; Camada Nuclear Interna- IPL; Camada Plexiforme Interna- IPL; Camada de Células Ganglionares- GCL; Coróide- Cr.

4.4. Proliferação celular na retina de *Anableps anableps*

Para analisar o padrão de proliferação celular durante o desenvolvimento ocular de *Anableps anableps*, utilizamos a técnica de imunofluorescência com anticorpo anti histona H3 fosforilada (HH3) em cortes transversais histológicos do olho de *A. anableps* em três estágios do desenvolvimento, 2, 3 e 4 (Figura 16). Em verde é possível observar os nichos de células proliferativas e em azul, DAPI, marcando os núcleos.

Nos estágios 2 e 3 foi possível observar nichos de proliferação celular na zona marginal ciliar (CMZ) da retina (caixa descontínua) (Figura 16, A, A', A'', B, B' e B'').

No estágio 4 a intensidade da marcação da HH3 é menor, A ampliação da imagem indicada pelas setas brancas mostram algumas células marcadas com o anticorpo (Figura 16, C, C' e C'').

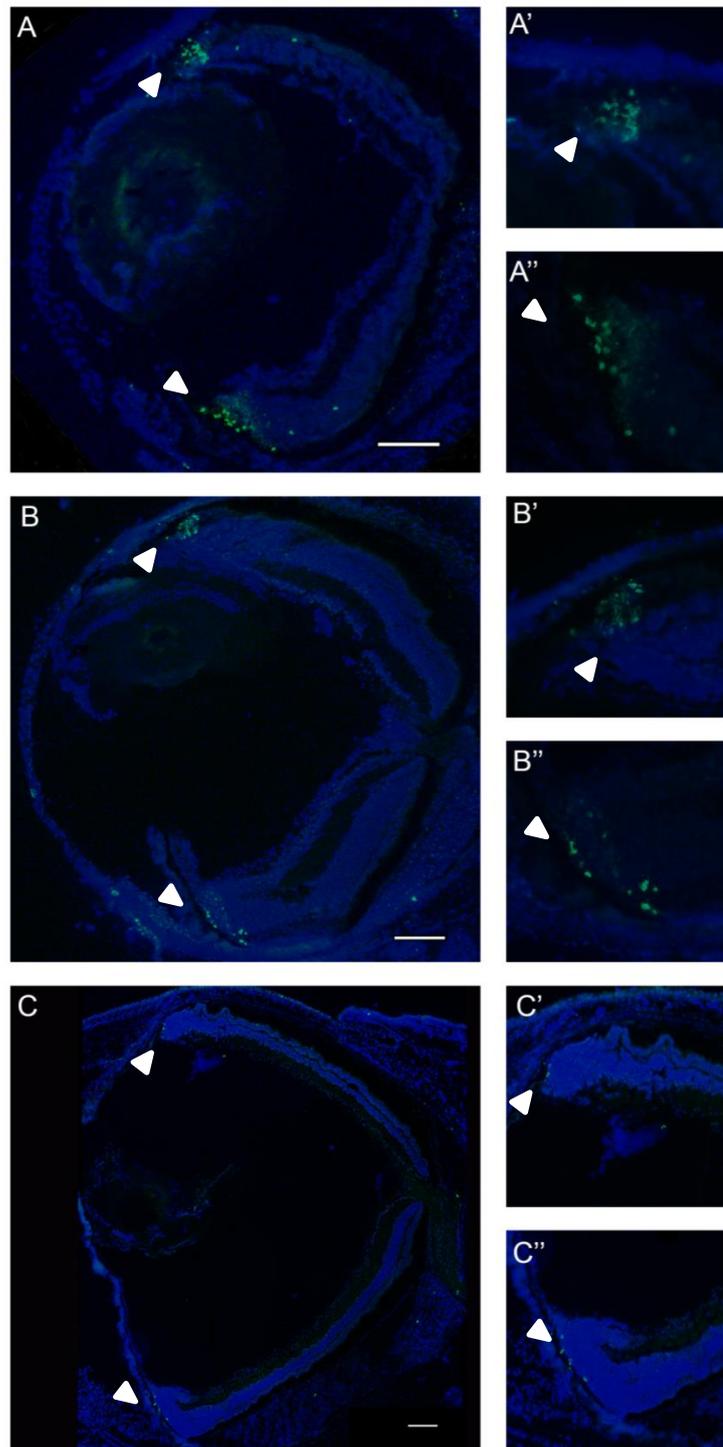


Figura 16- Imunofluorescência para o anticorpo Anti-Histona Fosforilada HH3 (S10). Corte transversal do olho de três estágios de desenvolvimento larval de *Anableps anableps*. As setas indicam a marcação do anticorpo. Cortes realizados a 20 μ m, escala 0,5 mm e aumento 10x.

4.5. Caracterização da retina através de marcadores moleculares

A análise morfológica dos olhos apontou para diferenças entre as retinas dorsal e ventral da espécie *A. anableps*. Para melhor visualizar esta diferença, utilizamos marcadores moleculares (em vermelho) no estágio 6 de desenvolvimento, onde já se observa duplicação das córneas e pupilas. Foram utilizados os marcadores celulares rodopsina E opsina verde/vermelho (Tabela 4). A figura 17 mostra a morfologia dos olhos através da técnica de H&E (Figura 16 A e B).

Tabela 4- Anticorpos primários utilizados nas imunofluorescências e tipo de marcação celular

| Anticorpo primário: | Tipo celular: |
|--------------------------------|----------------------|
| Rodopsina (Rod) | Bastonete |
| Opsina Verde/Vermelho (Opsina) | Cones L/M |

A expressão da proteína rodopsina (Figura 17, B, E) e da proteína opsinas verde/vermelho (Figura 17, C e F) foi semelhante ao longo da retina. Esta marcação foi observado nos segmentos interno e externo tanto na retina dorsal, quanto na retina ventral.

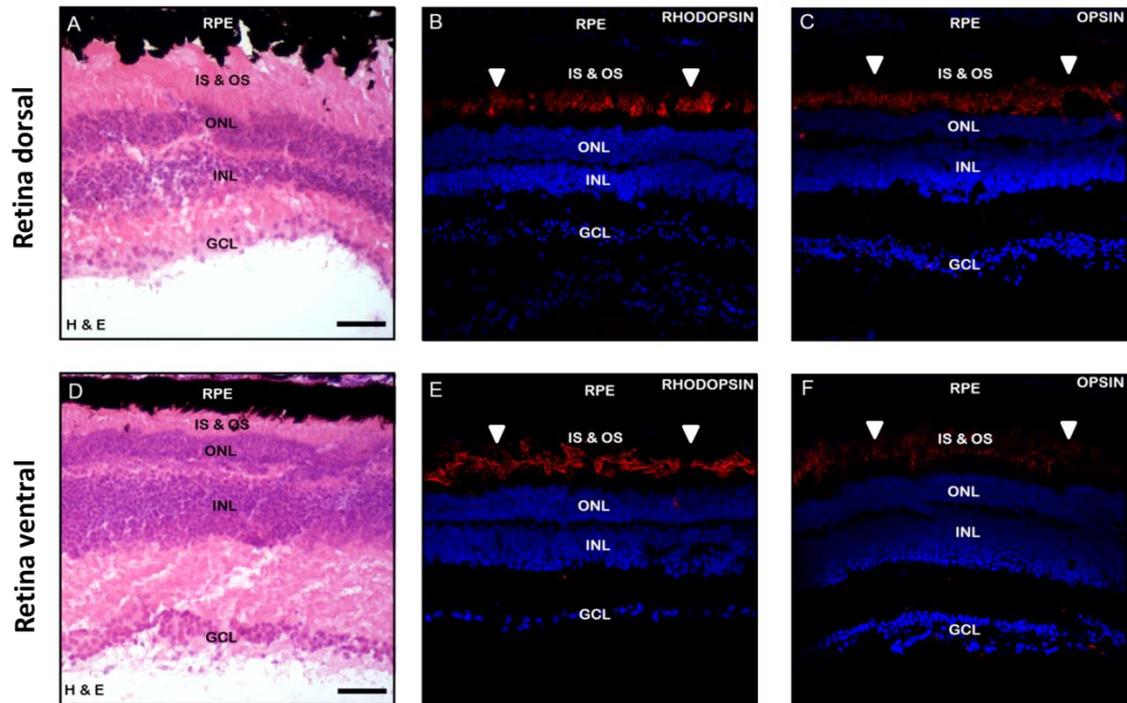


Figura 17- Caracterização da retina de *A. anableps* em larvas no sexto estágio do desenvolvimento. Coloração com Hematoxilina e Eosina (A e D) Imunofluorescência utilizando anticorpos: Rodopsina (B e E); Opsinas verde/vermelho (C e F); e DAPI (azul). Corte transversal do olho realizados a 20 μ m e aumento 40x.

5. DISCUSSÃO

O estudo ontogenético e molecular do desenvolvimento ocular desvendou algumas diferenças morfológicas nos olhos de *Anableps anableps*. A caracterização de seis estágios larvais com base no desenvolvimento dos olhos possibilitou que nossas análises fossem realizadas em estágios críticos para o entendimento da duplicação da córnea e da pupila desta espécie e modificação da morfologia dos olhos. A descrição de estágios larvais da espécie *A. anableps* já havia sido reportada por Oliveira *et al.*, em 2011 e Cavalcante *et al.*, em 2012. Nestes trabalhos os autores utilizaram parâmetros morfométricos distintos dos adotados no presente trabalho. Nos trabalhos mencionados acima os autores classificaram 5 e 7 estágios de desenvolvimento larval da espécie *A. anableps* respectivamente.

A morfologia do olho das espécies do gênero *Anableps* com uma divisão transversal da pupila é reconhecido como uma característica notável deste gênero (por exemplo, Regan, 1911; Gregory, 1933; Miller, 1979) e a expansão dorsolateral do osso frontal, que acomoda o olho foi interpretado como um autapomorfia do gênero por Parenti (1981) e Ghedotti (1998). Nesta pesquisa descrevemos brevemente o desenvolvimento desta expansão que começa um pouco depois do osso frontal surgir pela primeira vez no estágio 3 e rapidamente cresce dorso-lateralmente para acompanhar o desenvolvimento dorsal da órbita. É também importante notar que o início da expansão dorsolateral do osso frontal coincide em desenvolvimento, com o início da divisão transversal da pupila (por exemplo, estágio 3), sugerindo que estes dois acontecimentos estão ligados a um processo ontogenético.

A caracterização do desenvolvimento da retina de *Anableps anableps* é similar ao desenvolvimento da retina de peixes teleósteos (Alunni *et al.*, 2007; Candal *et al.*, 2005) e cartilaginosos (Ferreiro-Galve *et al.*, 2009). No entanto, encontrou-se uma característica não reportada em estudos anteriores. As camadas ONL e INL ventrais apresentam maior densidade de células quando comparadas às camadas ONL e INL dorsais. Essa diferenciação morfológica surge no estágio 3 de desenvolvimento larval, período em que a divisão da córnea e da pupila se iniciam. Isto pode estar ligado à diferenciação funcional da retina, como reportado por Owens e colaboradores (2012) em indivíduos adultos de *A. anableps*, e possivelmente está ligado ao tipo de informação externa recebida pelos olhos, vinda simultaneamente do ar e da água.

Diferentemente de mamíferos, os olhos de peixes crescem continuamente ao longo da vida e podem regenerar quando lesionados (Otteson and Hitchcock 2003). Estudos em zebrafish mostram que novas células receptoras surgem a partir de duas principais fontes, a CMZ e as células de Müller da glia na camada nuclear interna. Em *A. anableps*, o padrão de proliferação celular nos estágios larvais de desenvolvimento foi visualizado unicamente na CMZ em três estágios de desenvolvimento (estágio 2, 3 e 4), no estágio 2, a intensidade da marcação do anticorpo HH3 indica maior atividade proliferativa das células da CMZ, esta atividade foi observada em menor intensidade nos estágios 3 e 4. Estes resultados sugerem que nestes estágios a retina já está formada e a diminuição da proliferação pode ter sido substituída pela diferenciação das células que irão compor as camadas da retina.

Dados obtidos utilizando marcadores moleculares irão auxiliar na quantificação da diferença de densidade celular entre as retinas ventral e

dorsal, apesar da expressão destas proteínas ter sido observada ao longo da retina, diferenças de intensidade indicam que existe maior número de células presentes na camada ganglionar da retina ventral.

Neste trabalho, fizemos a caracterização dos estágios larvais de *A. anableps* com base no desenvolvimento ocular, as análises comparativas das diferentes porções da retina utilizando histologia, e análise de expressão de proteínas indicam diferenças de densidade de células e expressão gênica diferenciada na camada de células ganglionares. A análise osteológica através da diafanização aponta para uma autapomorfia do gênero que já é observada nas larvas da espécie. Estes resultados irão ajudar a elucidar a base genética das mudanças morfológicas presentes neste gênero.

6. CONCLUSÕES

Na primeira etapa deste trabalho foi possível realizar a descrição ontogenética de seis estágios larvais para *A. anableps* através de parâmetros morfométricos quantitativos e qualitativos, com ênfase no desenvolvimento ocular.

Em seguida, a sincronização da expansão dorsolateral do osso frontal ao longo de desenvolvimento ocular, está sendo descrita pela primeira vez nestes peixes, constituindo portanto, uma autapomorfia do gênero. Vale ressaltar que a expansão do osso frontal tem início no estágio 3 do desenvolvimento larval quando também há início da divisão da córnea e da pupila.

Também foi identificado o aparecimento de um septo interorbital cartilaginoso não descrito em outros peixes até o momento.

A descrição do desenvolvimento da retina mostrou diferença na densidade das camadas entre as porções dorsal e ventral da mesma. Esta começa a ser mais evidente a partir do estágio 3, quando também há o início da divisão das estruturas.

Por fim, a presença da proteína HH3 fosforilada nas CMZs, mostrou que o desenvolvimento da retina em larvas de *A. anableps* é similar ao já descrito para outros peixes. Estes resultados terão grande impacto no campo de desenvolvimento ocular, podendo revelar a base molecular por trás da divisão das estruturas oculares em *A. anableps*. Com isso acreditamos ter em mãos as condições ideais para transformar o *A. anableps* em um organismo-modelo regional para estudos de Biologia do Desenvolvimento e Evolução.

Esta pesquisa foi realizada sob licença do Ministério do Meio Ambiente (MMA) 12773-1 e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Pará (UFPa).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acampora, D.; Gulisano, M.; Simeone, A. Otx genes and the genetic control of brain morphogenesis. **Mol Cell Neurosci.** v.13, p. 1-8. 1999.

Acampora, D.; Postiglione, M.P.; Avantaggiato, V.; Di Bonito, M.; Simeone, A. The role of Otx and Otp genes in brain development. **Int J Dev Biol.** v.44, p. 669-677. 2000.

Acampora, D.; Gulisano, M.; Broccoli, V.; Simeone, A. Otx genes in brain morphogenesis. **Prog Neurobiol.** v.64, p. 69-95. 2001.

Albensi, B. C. & Powell, J. H. The differential optomotor response of the four-eyed fish *Anableps anableps*. **Perception.** v.27, p. 1475-1483. 1998.

Alunni, A.; Menuet, A.; Candal, E.; Pénigault, J. B.; Jeffery, W. R.; Taux, S. R. Developmental Mechanisms for Retinal Degeneration in the Blind Cavefish-*Astyanax mexicanus*. **The Journal of Comparative Neurology.** v. 505, p. 221–233. 2007.

Bejarano-Escobar, R.; Blasco, M.; Martín-Partido, G.; Francisco-Morcillo, J. Molecular characterization of cell types in the developing mature, and regenerating fish retina. **Rev. Fish Biol. Fisheries.** v. 24, p. 127-158. 2014.

Candal, E.; Anadón, R.; DeGrip, R.; Rodríguez-Moldes, I. Patterns of cell proliferation and death in the developing retina and optic tectum of the brown trout. **Developmental Brain Research.** v.154, p. 101-119. 2005.

Castro, R. M. C. & Castro, M. M. C. Proposta de uma nomenclatura osteológica para characiformes (Pisces: ostariophysii). **Bol. Mus. Par. Emílio Goeldi sér. Zool.** v. 3, n. 1, p. 25-32. 1987.

Cavalcante, A. N.; Santos, N. B.; Almeida, Z. S. Biologia reprodutiva de tralhoto, *Anableps anableps*, na Baía de São Marcos, Maranhão, Brasil. **Bol. Inst. Pesca, São Paulo.** v.38, n. 4, p. 285-296. 2012.

Cervigón, F.; Cipriani, R.; Fischer, W.; Garibaldi, L.; Hendrickx, M.; Lemus, A. J.; Márquez, R.; Poutiers, J. M.; Robaina, G.; Rodriguez, B. Guia de campo de las especies comerciales marinas y de água salobres de la costa septentrional

de Sur América. **Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.** p. 513. 1992.

Ferreiro-Galve, S.; Rodríguez-Moldes, I.; Anadón, R.; Candal, E. Patterns of cell proliferation and rod photoreceptor differentiation in shark retinas. **Journal of Chemical Neuroanatomy.** v.39, p. 1–14. 2009.

Ghedotti, M. J. Phylogeny and classification of the Anablepidae (Teleostei: Cyprinodontiformes). IN: Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P. Lucena, Z. M. S. & Lucena, C. A. S. (eds.). Phylogeny and classification of Neotropical fishes. **EDIPUCRS,** Porto Alegre, Brazil. p. 561-582. 1998.

Goldman, D. Müller Glial Cell Reprogramming And Retina Regeneration. **Nature Reviews/ Neuroscience.** v.15, p.431-442, 2014.

Gregory, W. K. Fish skulls: a study of the evolution of natural mechanisms. **Transactions of the American Philosophical Society,** v.33, n.2, p. 95-481. 1933.

Kardong, K. V. **Vertebrates: Comparative Anatomy, Function, Evolution..** Mc Graw Hill Education, 7^a Edition, p. 795. 2014.

Kiernan, J.A. **Histological and histochemical methods: Theory and Practice.** Scion Publishing Limited, 4^a Edition. p. 606. 2008.

Kuratani, S. & Ota, K. G. Primitive Versus Derived Traits in the Developmental Program of the Vertebrate Head: Views From Cyclostome Developmental Studies. **Journal of experimental zoology (Mol Dev Evol).** v. 310, p. 294-314. 2008.

Lamb, T. D. Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and Retina. **Progress in Retinal and Eye Research,** v. 36, p. 52-119. 2013.

Leuzinger, S.; Hirth, F.; Gerlich, D.; Acampora, D.; Simeone, A.; Gehring, W.J.; Finkelstein, R.; Furukubo-Tokunaga, K.; Reichert, H. Equivalence of the fly orthodenticle gene and the human OTX genes in embryonic brain development of Drosophila. **Development.** v.125, p. 1703-1710. 1998.

- Logan, C.Y. & Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. **Annu Rev Cell Dev Biol.** v.20, p. 781-810. 2004.
- Mattox, G. M. T.; Britz, R.; Toledo-Piza, M. Skeletal development and ossification sequence of the characiform *Salminus brasiliensis* (Ostariophysi: Characidae). **Ichthyol. Explor. Freshwaters**, v. 25, N. 2, p.103-158. 2014).
- Miller, R. R. Ecology, Habits And Relationships Of The Middle American Cuatro Ojos, *Anableps dowi* (Pisces : Anablepidae). **American Society Of Ichthyologists And Herpetologists.** v.1, p. 82 – 91, 1979.
- Oliveira, V. A.; Fontoura, N.F.; Montag, L. F. A. 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.
- Otteson, D. C. & Hitchcock, P. F. Stem cells in the teleost retina: persistente neurogenesis and injury-induced regeneration. **Vision Res.** v.43. 2003.
- Owens, G.L., Windsor, D.J., Mui, J., and Taylor, J.S. A fish eye out of water: ten visual opsins in the four-eyed fish, *Anableps anableps*. **PLoS One** 4. 2009.
- Owens, G. L.; Rennison, D. J.; Allison, W. T.; Taylor, J. S. 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. **Biol Lett.** v.8, p. 86-89. 2012.
- Parenti, L. R. A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). **Bulletin of the American Museum of Natural History.** v.168, n. 4, p. 335-357. 1981.
- Pereira, C.R., Barcellos, L.J.G., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M., Ritter, F. E Silva, L.B. Embryonic And Larval Development Of Jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), A South American Catfish. **Braz. J. Biol.** v.66, n. 4, p.1057-1063, 2006.
- Puelles, E.; Annino, A.; Tuorto, F.; Usiello, A.; Acampora, D.; Czerny, T.; Brodski, C.; Ang, S. L.; Wurst, W.; Simeone, A. *Otx2* regulates the extent,

identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain.

Development. v.131, p.2037-2048. 2004.

Regan, C. T. The osteology and classification of the Teleostean fishes of the order Microcyprini. **The Annals and Magazine of Natural History**, eight series, v.7, n.40, p. 320-327. 1911.

Saidel, W. M. & Fabiane, R. S. Optomotor response of *Anableps anableps* depends on the field of view. **Vision Research.** v.38, p.2001-2006. 1998.

Schwab, I. R.; Roth, A.; Blankenship, T. N.; Fitzgerald, P. G. Evolutionary Attempts at 4 eyes in vertebrates. **Tr Am Ophth Soc.** n. 99, p. 145-157. 2001.

Shan-Rong Shi, M. D., Cheng, L., Llana, P., Laurie, T., Andrew, Y., Ryan, C., Richard, J. C., Clive, R. T. Evaluation of the Value of Frozen Tissue Section Used as "Gold Standard" for immunohistochemistry. **Am J Clin Pathol.** v. 129, p.358-366. 2008.

Sivak, J. G. Optics of the eye of the "four-eyed fish" (*Anableps anableps*). **Vision Res.** v.16, p. 531-534. 1976.

Taylor, W. R. & G. C. van Dyke. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. **Cybium**, v.9, p.107-119. 1985.