



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

DANIELE SALGADO DE SOUSA

**Expressão gênica durante o desenvolvimento ocular
e regulação da assimetria de opsinas na espécie
Anableps anableps, peixe de quatro olhos**

BELÉM - PA
NOVEMBRO/2022

DANIELE SALGADO DE SOUSA

**Expressão gênica durante o desenvolvimento ocular
e regulação da assimetria de opsinas na espécie
Anableps anableps, peixe de quatro olhos**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, para obtenção do título de **Doutora em Neurociências e Biologia Celular**.

Área de concentração: Biologia Celular

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

**BELÉM, PA
NOVEMBRO/2022**

**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)**

S164e Salgado de Sousa, Daniele.
Expressão gênica durante o desenvolvimento ocular e regulação da assimetria de opsinas na espécie *Anableps anableps*, peixe de quatro olhos / Daniele Salgado de Sousa. — 2022.
98 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^ª. Dra. Patrícia Neiva Coelho Schneider
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2022.

1. *Anableps*. 2. Olhos. 3. Opsinas. 4. Retina. 5. Plasticidade. I. Título.

CDD 571.6

DANIELE SALGADO DE SOUSA

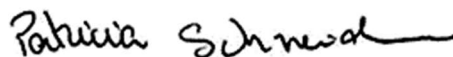
**Expressão gênica durante o desenvolvimento ocular
e regulação da assimetria de opsinas na espécie
Anableps anableps, peixe de quatro olhos**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da UFPA como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Neurociências de Biologia Celular.

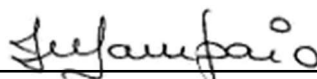
Aprovada em 30/11/2022

Belém (PA)

BANCA EXAMINADORA:



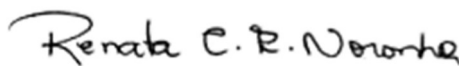
Prof^a. Dr^a. Patrícia Neiva Coelho Schneider
(PPGNBC – UFPA/LSU)
Orientadora



Prof^a Dr^a Maria Iracilda da Cunha Sampaio
(PPGBM/UFPA - Avaliador interno)



Prof^a. Dr^a. Josane de Freitas Sousa
(LSU – Avaliadora suplente)



Prof^a. Dr^a. Renata Coelho R. Noronha
(PPEAP/UFPA – Avaliadora externo)

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

- Universidade Federal do Pará - UFPA
- Laboratório de Evolução e Desenvolvimento de vertebrados - LEDvet
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
- Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular - PPGNBC

Dedico

Aos meus familiares, em especial à minha mãe Maria do Socorro Salgado, ao meu irmão Fábio Salgado, ao meu sobrinho Antônio Daniel Salgado e ao meu noivo Rebeson Moares. Sem o apoio de vocês, nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pará, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia celular (PPGNBC) e ao Laboratório de Evolução e Desenvolvimento (ICB/UFPA), sou grata pela infraestrutura, auxílio financeiro e oportunidade de cursar o doutorado em Neurociências e Biologia celular.

À Prof^a. Dr^a. Patrícia Schneider, agradeço pelos anos de orientação durante o doutorado que foram de extrema importância para o aprendizado de técnicas e conhecimentos usados na realização deste e de futuros trabalhos.

À Prof^a. Dr^a. Josane de Sousa Freitas e à Msc. Jamily Lorena de Lima Ramos pelos ensinamentos e ajuda profissional com experimentos de bancada e interpretação de dados.

Gostaria de agradecer aos membros da banca, pelas observações e contribuições que serviram para aperfeiçoar a redação deste trabalho.

Ao Instituto de Estudos Costeiros da UFPA (IECOS), representada pela Prof^a. Iracilda Sampaio; Ao Laboratório de Neuropatologia Experimental sob a coordenação da Prof^a. Elizabeth Sumi Yamada, Ao Prof^o. Rogério Gomes dos Santos (ITV) pelo auxílio logístico nas coletas, disponibilidade do uso do microscópio confocal e criostato.

Aos colegas do Laboratório de Evolução e Desenvolvimento, em especial à Dr^a Aline Dragalzew, à Dr^a. Kellen Matos e aos biólogos Rogério Correia e Rafaela Lima, pela ajuda no processamento de amostras, coleta de material biológico e experimentos de bancada.

Meu muito obrigada a todos!

RESUMO

O desenvolvimento ocular é um processo complexo orquestrado por vários eventos que incluem: especificação, morfogênese e diferenciação celular. Todos esses processos de desenvolvimento e funcionamento do olho são extremamente conservados entre as espécies de vertebrados viventes, entretanto, por vezes são observadas adaptações interessantes, como em peixes do gênero *Anableps*. Ao contrário da maioria dos peixes, que usam os olhos para a exploração de um mundo submerso, em *Anableps anableps* (Anablepidae: Cyprinodontiformes), o olho é adaptado para a percepção simultânea de um mundo acima e abaixo d'água. Essas adaptações excepcionais incluem: córneas e pupilas duplicadas, bem como retina especializada contendo regiões associadas à visão aérea e aquática simultânea, e que expressam genes de modo assimétrico. Recentemente, por análise transcriptômica dos olhos em desenvolvimento de *A. anableps*, 20 genes de opsinas não visuais foram identificados sendo assimetricamente expressos entre estágios pré e pós duplicação de córneas e pupilas. Desse modo, aqui, analisamos por hibridização *in situ* a expressão de uma opsina biestável (*Parapinopsin*) e uma neuropsina (*Opn5*) em larvas de *A. anableps*. Nossos dados mostraram que o padrão de expressão gênico destas opsinas é simétrico entre a retina dorsal e ventral, respectivamente, havendo expressão nas camadas CNE, CNI e CCG. Investigamos também a expressão de três genes de melanopsinas não visuais (*opn4x1*, *opn4x2*, *opn4m3*), uma opsina de tecido múltiplo teleóstio (*tmt1b*), e duas opsinas visuais (*lws* e *rh2-1*) nas retinas dorsal e ventral de *A. anableps*, logo após alterarmos as condições fóticas em que os peixes juvenis se encontravam. Mostramos que na transição de um ambiente de alta turbidez para um de água límpida, as opsinas alteram seus padrões de expressão gênica. Adicionalmente, por imunofluorescência, desvendamos a expressão de Lamin A/C, proteínas que fazem parte do desenvolvimento ocular em *A. anableps* e que são expressas de forma similar a de outros organismos em desenvolvimento, assim como em indivíduos adultos. Portanto, acreditamos que as informações aqui descritas elucidam muitos aspectos dos mecanismos moleculares por trás do desenvolvimento e da plasticidade adaptativa dos olhos de *A. anableps*.

Palavras-chave: *Anableps*; Olhos; Opsinas; Retina; Plasticidade.

ABSTRACT

The ocular development is a complex process orchestrated by several events that include: cell specification, morphogenesis and differentiation. All these developmental and functional processes are extremely conserved among living vertebrate species, however, unique adaptations are sometimes observed, such as in fish of the genus *Anableps*. Unlike most fishes, which use their eyes to explore a submerged world, in *Anableps anableps* (Anablepidae: Cyprinodontiformes), the eye is adapted for the simultaneous perception of a world above and below the water line. These exceptional adaptations include: duplicated corneas and pupils, as well as a specialized retina region associated with simultaneous aerial and aquatic vision, and which have asymmetrical gene expression. Recently, by transcriptomic analysis of the developing eyes of *A. anableps*, 20 non-visual opsin genes were identified to be asymmetrically expressed between pre- and post-duplication stages of corneas and pupils. Thus, here, we analyzed by *in situ* hybridization the gene expression of a bistable opsin (*parapinopsin*) and a neuropsin (*Opn5*) in *A. anableps* larvae. Our data showed that the pattern of gene expression of these opsins is symmetrical between the dorsal and ventral retina, respectively, with expression in the ONL, INL and GCL layers. We also investigated the expression of three non-visual melanopsin genes (*opn4x1*, *opn4x2*, *opn4m3*), one teleost multiple tissue opsin (*tmt1b*), and two visual opsins (*lws* and *rh2-1*) in the dorsal and ventral retinas of juvenile *A. anableps*, after changing the photic conditions in which the juvenile fish were. Then, we showed that in the transition from an environment of high turbidity to one of clear water, opsins have their expression patterns changed. Additionally, by immunofluorescence, we revealed the expression of Lamin A/C, proteins expressed as part of eye development in *A. anableps* as well as in other developing organisms, as well as in adult individuals. Therefore, we believe that the information described here elucidates many aspects of the molecular mechanisms behind the development and adaptive plasticity of *A. anableps*' eyes.

Keywords: *Anableps*; Eyes; Opsins; Retina; Plasticity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Espécies que desenvolveram especializações oculares individuais para aprimorar sua percepção do ambiente.	13
Figura 2.	Evolução do olho e a origem do olho protótipo de Darwin.....	16
Figura 3.	Morfogênese do campo ocular.....	18
Figura 4.	Esquema do desenvolvimento ocular humano e <i>zebrafish</i>	19
Figura 6.	Estrutura da córnea e do olho de <i>zebrafish</i> adulto.....	22
Figura 7.	Estrutura olho e do cristalino de <i>zebrafish</i>	23
Figura 8.	Organização esquemática da retina de vertebrados.....	25
Figura 9.	Morfologia dos cones e bastonetes.....	26
Figura 10.	Estrutura básica de uma rodopsina e sua organização na membrana dos bastonetes.....	27
Figura 11.	Transdução de sinal na retina.....	28
Figura 12.	Representação esquemática da cascata de fototransdução em fotorreceptores de vertebrados.....	29
Figura 13.	Padrão de expressão de genes de opsinas visuais na retina de larvas de <i>zebrafish</i>	31
Figura 14.	Expressão de melanopsinas (<i>opn4m-1</i> , <i>opn4m-2</i> , <i>opn4m-3</i> , <i>opn4x-1</i> , <i>opn4x-2</i>) no olho de <i>zebrafish</i> adulto.....	31
Figura 15.	Árvore filogenética esquemática da família das opsinas.....	32
Figura 16.	Relações filogenéticas entre as principais linhagens de genes de opsina de vertebrados.....	33
Figura 17.	Expressão de opsinas no olho, complexo pineal e pele de larvas de <i>Xenopus laevis</i>	34
Figura 18.	Localização e expressão de opsinas no olho de <i>Xenopus laevis</i> em desenvolvimento.....	35
Figura 19.	Análise de hibridização in situ de <i>opn5m</i> e <i>opn5m2</i> na retina de peixes medaka e <i>zebrafish</i>	36
Figura 20.	Locais de fotorrecepção em vertebrados.....	38
Figura 21.	A duração do fotoperíodo influencia a expressão da genes melanopsinas (<i>opn4a</i> e <i>opn4.1</i>)	39

Figura 22.	Sistema de troca do cromóforo A 1 /A 2 em fotorreceptores de vertebrados	41
Figura 23.	Evolução do sistema visual de ciclídeos Midas.....	42
Figura 24.	Adaptação do sistema visual de espécies de ambientes de águas rasas a profundas.....	43
Figura 25.	Vista lateral da espécie <i>Anableps anableps</i>	44
Figura 26.	Estrutura ocular de <i>Anableps anableps</i> adulto.....	45
Figura 27.	Desenvolvimento ocular em diferentes estágios larvais de <i>Anableps anableps</i>	46
Figura 28.	Morfologia interna do olho de <i>A. anableps</i>	47
Figura 29.	Caracterização morfológica do olho de <i>Anableps anableps</i>	48
Figura 30.	Expressão das opsinas visuais na retina de <i>Anableps anabelps</i> adulto.....	48
Figura 31.	Expressão assimétrica das opsinas visuais na retina de <i>Anableps anableps</i> em estágio larval.....	49
Figura 32.	Hibridização <i>in situ</i> para 3 genes melanopsina na retina de larvas e de indivíduos adultos da espécie <i>A. anableps</i>	50
Figura 33.	Coleta de <i>Anableps anableps</i>	51
Figura 34.	Desenho esquemático da coleta de olhos de <i>Anableps anableps</i> sem desenvolvimento para sequenciamento de transcriptomas.....	53
Figura 35.	Imunofluorescência para o anticorpo Anti-Lamin A/C em larvas de <i>A. anableps</i>	58
Figura 36.	Imunofluorescência para o anticorpo Anti-Lamin A/C em <i>A. anableps</i> adulto.....	59
Figura 37.	Hibridização <i>in situ</i> para os genes de opsinas não visuais: <i>parapinopsin</i> e <i> opn5</i> , na retina de larvas (estágio 2) de <i>A. anableps</i>	61
Figura 38.	Padrão de expressão gênica de opsinas visuais em <i>A. anableps</i> após 30 dias de exposição em água limpa.....	63
Figura 39.	Padrão de expressão gênica de opsinas não visuais em <i>A. anableps</i> após o período de exposição à luz dentro e fora d'água.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Identificação de espécimes capturados durante a coleta.....	52
Tabela 2.	Caracterização dos estágios de desenvolvimento ocular de <i>Anableps anableps</i>	52
Tabela 3.	Sequências dos iniciadores usados nos experimentos de PCR.....	54
Tabela 4.	Anticorpos primários utilizados nas imunofluorescências, N°. de catálogo e concentração utilizada.....	62
Tabela 5.	Comparação do padrão de expressão de <i>parapinopsin</i> e <i>opn5</i> e seus subtipos nos modelos estudados e disponíveis na literatura.....	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.1 Objetivos específicos.....	14
3. REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 A origem evolutiva do olho.....	15
3.2 Desenvolvimento ocular em vertebrados.....	17
3.3 Estrutura básica do sistema visual dos vertebrados.....	20
3.4 Diversidade de opsinas em vertebrados.....	30
3.5 Caracterização das opsinas não visuais <i>parapinopsin</i> e <i>opn5</i> em vertebrados.....	35
3.6 Ritmos biológicos e fotoperiodismo em peixes teleósteos.....	37
3.7 Mudanças na expressão de opsinas em peixes sob condições variáveis de luz.....	40
3.8 Evolução e desenvolvimento do olho de <i>Anableps anableps</i>	44
4. MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 Coletas de espécimes.....	51
4.2 Processamento das amostras.....	52
4.3 Transcriptomas dos olhos de <i>Anableps anableps</i>	52
4.4 Busca por genes de interesse.....	54
4.5 Confeção dos iniciadores para PCR.....	54
4.6 Confeção de sondas para hibridização <i>in situ</i>	55
4.7 Hibridização <i>in situ</i> : larvas e juvenil.....	55
4.8 Experimento de exposição à luz	56
4.9 Imunofluorescência.....	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO	97

1. INTRODUÇÃO

As mudanças impulsionadas pela exposição a diferentes estímulos luminosos são um dos principais promotores da diversidade do sistema visual em vertebrados (HUNT *et al.* 2014). Além dos processos visuais, a luz também induz importantes funções fisiológicas não visuais nos animais tais como o fotoperiodismo, a supressão da melatonina e a modulação do ciclo circadiano (CRONIN & JOHNSEN, 2016; LUCAS *et al.*, 2001; SULLI *et al.* 2018).

O sistema visual atua como um importante intermediário entre o organismo e seu ambiente. Assim, a capacidade visual contribui para inúmeros comportamentos necessários para sobrevivência do indivíduo, como identificação de habitat, forrageamento, reconhecimento de potenciais parceiros e predadores (LUPŠE *et al.*, 2021; VETTER *et al.*, 2021; MACIVER *et al.*, 2017).

Estudos sobre tamanho, morfologia externa e posição dos olhos podem revelar muito sobre as adaptações e estilo de vida de um animal (THOMAS *et al.*, 2020), fornecendo um indicativo sobre a história evolutiva de dada espécie (FRITSCH & ULLMANN, 2017). Em peixes, os olhos podem variar consideravelmente conforme a adaptação ao habitat, durante a ontogenia e condições ambientais relacionadas a esse processo (temperatura, nutrição, intensidade de luz) (PEREZ *et al.*, 2017; JEFFERY, 2020).

Embora todos os vertebrados compartilhem de anatomia ocular semelhante, certas espécies exibem modificações adaptativas e evolutivas de uma ou mais estruturas oculares para atender demandas visuais específicas, por exemplo, peixes saltadores da lama, também conhecido como *Mudskippers* (*Periophthalmus pusing sp*; *Periophthalmus barbarus*). Estes são peixes anfíbios que desenvolveram adaptações morfológicas e fisiológicas para combinar com seus estilos de vida únicos (Figura 1a, 1b) (FRITSCH & COLLIN, 2017; YOU *et al.*, 2014). Os olhos tubulares de *Argyropelecus spp* lhe conferem um campo binocular dorsal, e uma retina acessória, que subtende o campo visual monocular lateral (BIAGIONI *et al.*, 2016; WARRANT & LOCKET, 2004). Já *Rhynchhyalus natalensis* possui um extenso divertículo lateral em cada olho tubular e uma lente refrativa no topo de sua cabeça para ver predadores e presas. Além dessas estruturas possui uma lente e uma retina curva, semelhante a um espelho, que pode ver os feixes bioluminescentes de peixes e invertebrados (Figura 1c, 1d) (PARTRIDGE *et al.*, 2014).

Temos também estruturas oculares morfologicamente e/ou funcionalmente duplicadas, como córneas, pupilas e retina, vistas em espécies de *Anableps anableps* (Figura 1e) (PEREZ *et al.*, 2017).

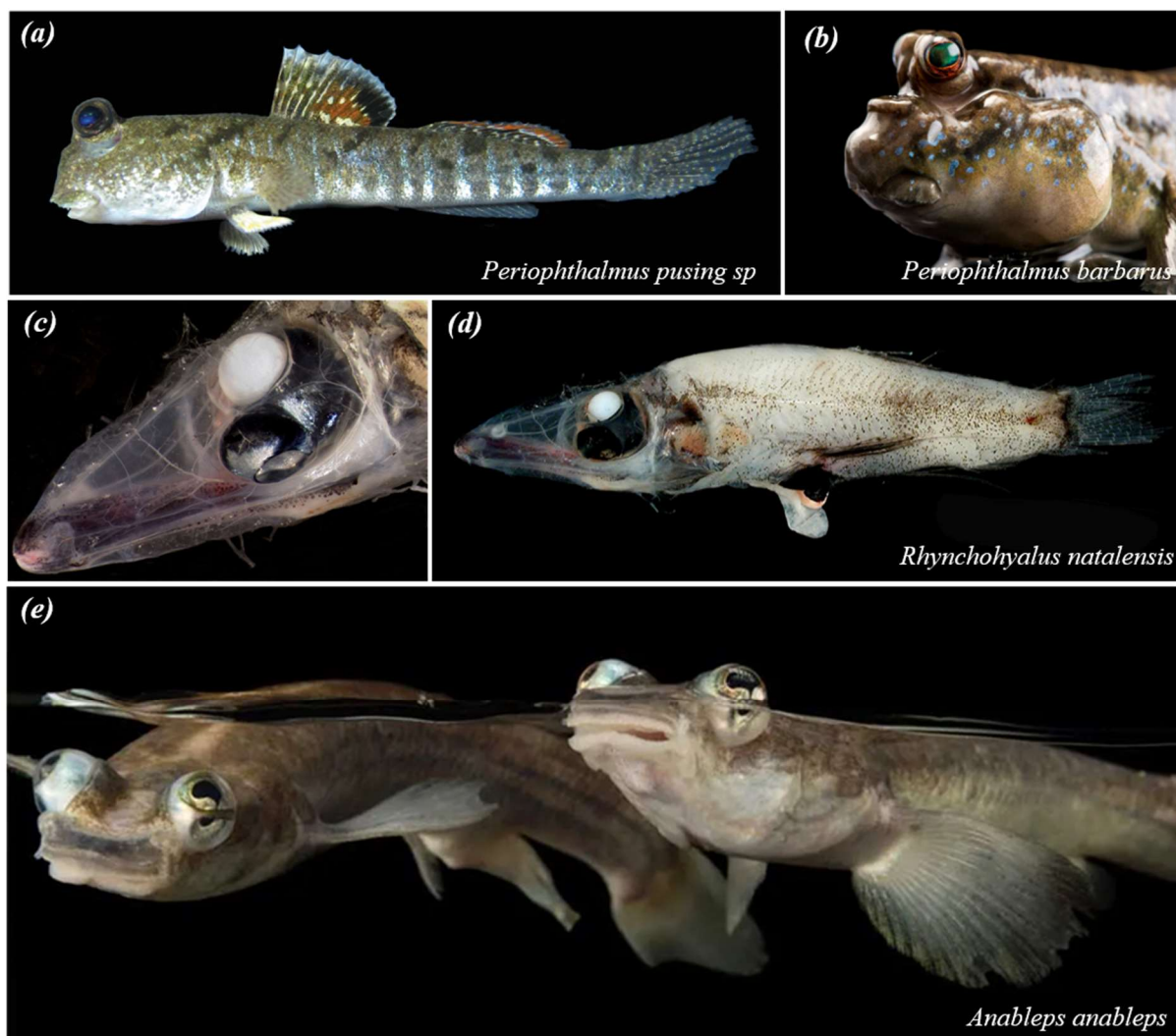


Figura 1: Espécies que desenvolveram especializações oculares individuais para aprimorar sua percepção do ambiente. (a): *Periophthalmus pusing sp*; (b): *Periophthalmus barbarus*; (c, d): *Rhynchhyalus natalensis*; (e): *Anableps anableps*. Fonte: Jaafar *et al.*, 2016; <https://www.joelsartore.com/fis030-00168/>; <https://fishesofaustralia.net.au/home/species/2086>; <https://myaquarium.com.br/peixes/peixes-de-agua-doce/peixe-de-quatro-olhos-tralhoto-anableps-anableps/>.

Anableps anableps é um organismo não-modelo que apresenta ampla distribuição na região Amazônica. Esse peixe possui uma maquinaria especial para captar luz e responder a estímulos luminosos que lhe propiciam uma visão simultaneamente aéreo-aquática (OLIVEIRA *et al.*, 2006; OWENS *et al.*, 2012). Neste contexto, foi proposto analisar a expressão de proteínas que fazem parte do desenvolvimento ocular de *A. anableps*, bem como entender a base molecular das modificações oculares vistas nessa espécie, para desvendar os mecanismos que deram origem às estruturas oculares morfologicamente duplicadas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a regulação assimétrica de opsinas visuais e não visuais na retina de *Anableps anableps* e estudar a expressão de proteínas que fazem parte do desenvolvimento ocular dessa espécie.

2.2 Objetivos específicos

- i. Caracterizar o padrão de expressão de genes envolvidos no processo de desenvolvimento da córnea em olhos de *A. anableps*;
- ii. Caracterizar o padrão de expressão das opsinas não visuais *opn5* e *parapinopsin* na retina em larvas de *A. anableps*;
- iii. Comparar o padrão de expressão das opsinas não visuais *opn5* e *parapinopsin* na retina de larvas e adultos de *A. anableps*;
- iv. Verificar se alterações no estímulo luminoso externo influenciam o padrão de expressão gênica de opsinas visuais (*rh2-1* e *lws*) em *A. anableps* juvenis;
- v. Verificar se alterações no estímulo luminoso externo influenciam o padrão de expressão gênica de opsinas não visuais (*opn4x1*, *opn4x2*, *opn4m3* e *tmt1b*) em *A. anableps* juvenis.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A origem evolutiva do olho

Explicar de que forma ocorreu a evolução de um órgão tão complexo como o olho sempre foi um grande desafio para biólogos evolucionistas, até mesmo para Charles Darwin (GEHRING & IKEO, 1999). Portanto, desvendar o mistério de qual organismo desenvolveu um olho primordial se tornou um grande problema, posto que o processo de fossilização não mineraliza esse tipo de tecido. Ainda que em restos fósseis dos primeiros Artrópodes cambrianos (Trilobitas) possamos encontrar estruturas sensoriais internas de um olho composto, não é possível identificar seu preenchimento, como extratos celulares e tecidos solidificados (SCHOENEMANN, 2018), inviabilizando a formação de hipóteses sobre seu funcionamento.

Apesar disso, a comparação entre olhos compostos datados de aproximadamente 500 milhões de anos com artrópodes modernos mostram semelhanças que sugerem desempenhos visuais sejam similares (SCHOENEMANN *et al.*, 2017). Da mesma maneira, o achado de Trilobitas do período Cambriano indica que a evolução ocular se desenvolveu paralelamente à explosão Cambriana e aumento de predação entre os animais desse período (SHUBIN, TABIN & CARROLL, 2009).

Os principais aparelhos visuais estudados são de pancrustáceos e vertebrados, que apresentam não apenas diferenças marcantes em forma, mas em função e ontogenia (BUSCHBECK & HAUSER, 2009; HALDER *et al.*, 1995; HENZE & OAKLEY, 2015). Curiosamente, os mecanismos genéticos utilizados durante o desenvolvimento ocular são semelhantes, pois os fatores de transcrição *eyeless* em *Drosophila melanogaster*, e seus ortólogos em vertebrado *Pax6* são responsáveis pela formação e especificação de vários tipos de olhos (HALDER *et al.*, 1995).

Várias teorias de como os olhos se originaram e evoluíram baseiam-se na grande diversidade conhecida dos sistemas visuais (NILSSON, 2009). Um esquema hipotético mostra que vários tipos de olhos evoluíram de um arquétipo ancestral comum. Como primeiro passo, ocorreu a evolução de células sensíveis à luz com seus receptores de luz (opsinas). Sob o controle do gene mestre *Pax6*, as células fotorreceptoras se combinaram com as células pigmentares para formar um órgão, olho protótipo. Através de vários eventos evolutivos, diferentes olhos surgiram a partir de protótipos, tais como: olhos compostos de insetos; olhos do tipo câmeras encontrados em vertebrados; e uma variedade de tipos de olhos de moluscos, desde os olhos primitivos semelhantes a câmeras de *Cardium*, o olho *Pecten*, o olho composto

de Arca, para o olho de um cefalópode altamente evoluído, que se assemelha a um olho do tipo câmara de semelhante a de vertebrados (Figura 2) (GEHRING & IKEO, 1999).

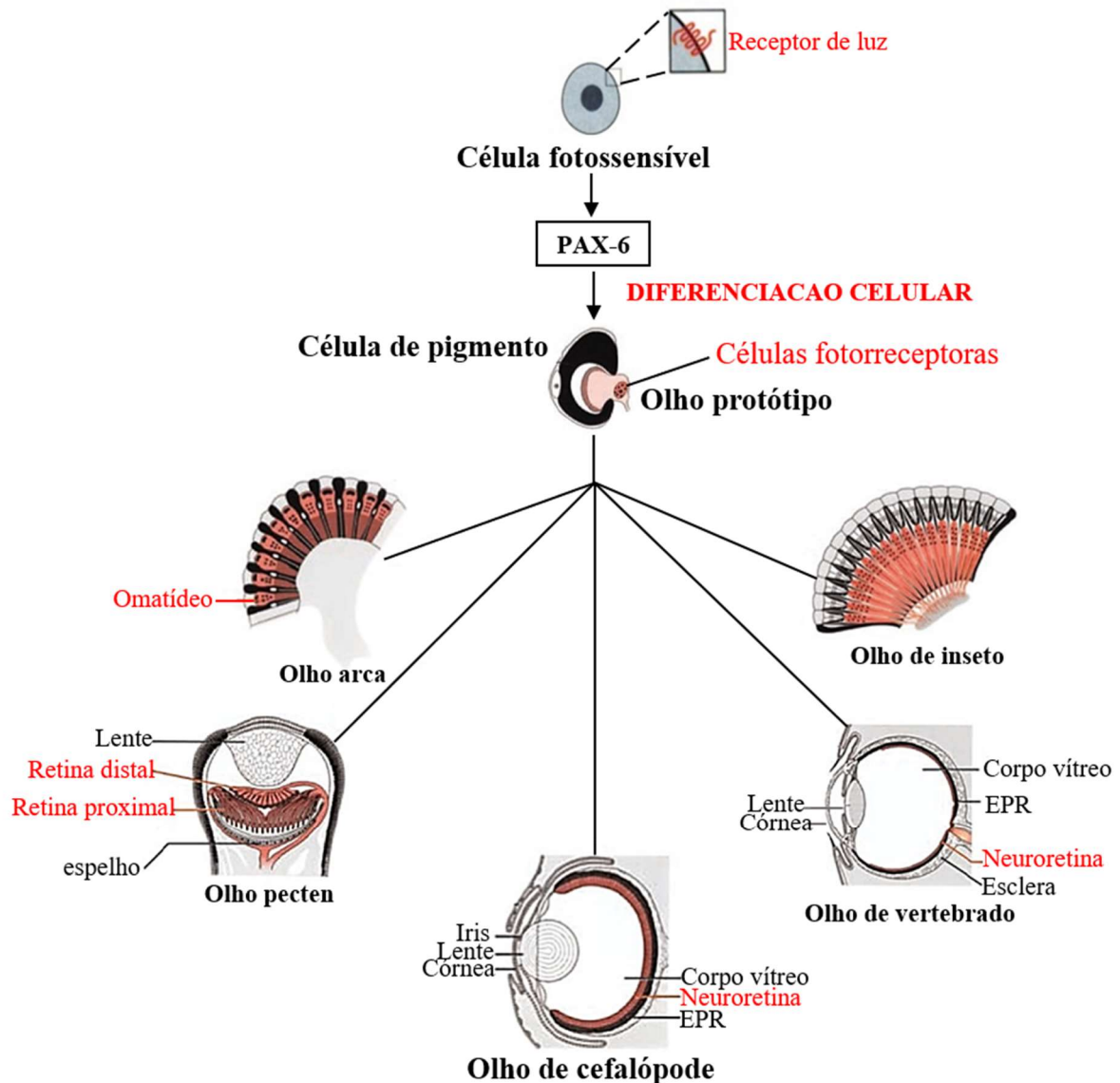


Figura 2: Evolução do olho e a origem do olho protótipo de Darwin. Os genes *Pax6* de vários filões de animais são capazes de induzir o desenvolvimento ectópico do olho, indicando que *Pax6* é um gene de controle mestre para a morfogênese do olho. Propõe-se que os vários tipos de olhos encontrados nos vertebrados sejam derivados de um protótipo comum, monofileticamente, por um mecanismo chamado evolução intercalar. Adaptado de Gehring & Seimiya (2010).

Embora os olhos sejam morfologicamente distintos, os mecanismos moleculares subjacentes ao seu desenvolvimento são bem conservados, contribuindo do mesmo modo para a formação de olhos em muitos animais com visão (ZHU *et al.*, 2017). Algumas vezes são observadas adaptações interessantes como resultado da resposta ao ambiente. Por exemplo, a perda total ou parcial da visão em *cavefish* (*Astyanax mexicanus*), assim como duplicações morfológicas de estruturas oculares (KRISHNAN & ROHNER, 2017; SCHWAB *et al.*, 2001).

A tentativa de duplicação dos olhos é um evento raro observado em poucas linhagens de peixes, como, como *Dialommus fuscus* e *Dialommus macrocephalus*, também conhecido como “*Rockskipper*”. Esses peixes são predadores terrestres e possuem uma córnea dividida verticalmente que lhes permite permanecer na posição vertical com parte da córnea dentro e fora da água (SCHWAB *et al.*, 2001).

Outro exemplo notável é o *Bathylchnops exilis*, uma espécie mesopelágico que habita profundidades entre 600 a 3000 metros e possui protuberâncias incomuns que brotam de seus olhos, cada uma das quais têm lentes bem desenvolvidas e uma retina. Sugere-se que o propósito destes olhos extras seja a detecção de ameaças vindas de baixo, posto que esses olhos estão apontados para para o fundo do oceano (SCHWAB *et al.*, 2001; PARTRIDGE *et al.*, 2014).

Inovações morfológicas no sistema visual exigem mudanças moleculares na regulação da fotorrecepção e distribuição de células fotorreceptoras. A composição de bastonetes e cones desempenham um papel importante na sensibilidade espectral em peixes teleósteos (OKANO *et al.*, 1994; COLLIN, 2009; SATO *et al.*, 2018). Espécies do gênero *Anableps* apresentam uma adaptação extrema do sistema visual. Com um olho parcialmente duplicado e visão simultânea aérea-aquática, o *Anableps* consiste em um modelo único para entender as bases genéticas da duplicação ocular (OWENS *et al.*, 2012, PEREZ *et al.*, 2017, SCHWAB *et al.*, 2001).

3.2 Desenvolvimento ocular em vertebrados

O desenvolvimento do olho dos vertebrados é rigidamente controlado por padrões de expressão gênica espaço-temporal e interações entre as camadas germinativas embrionárias (Figura 3) (EINTRACHT *et al.*, 2020). É um processo complexo de eventos orquestrados por especificação, morfogênese e diferenciação de tecidos em diversas células especializadas que são regulados por fatores intrínsecos ou extrínsecos que ajudam a especificar qual tecido se tornará o olho e qual tecido se tornará o cérebro (ZAGOZEWSKI *et al.*, 2014).

Em vertebrados, o sistema óptico deriva de quatro fontes embrionárias: neuroectoderme do prosencéfalo, mesoderme intercalado, ectoderma de superfície e crista neural (FUJIMURA, 2016; JOLY *et al.*, 2016; HARADA *et al.*, 2007). À medida que o campo ocular se desenvolve após a gastrulação, ocorre a expressão coordenada dos fatores de transcrição *Pax6*, *Otx2*, *Rax*, *Six6*, *Six3* e *Lhx2* (Figura 3a) (ZUBER *et al.*, 2003; MUENKE & COHEN, 2000), que são expressos nas regiões precursoras da vesícula óptica para o desenvolvimento de cada tipo de célula (Figura 3b) (HEAVNER & PEVNY, 2012; GIGER & HOUART, 2018).

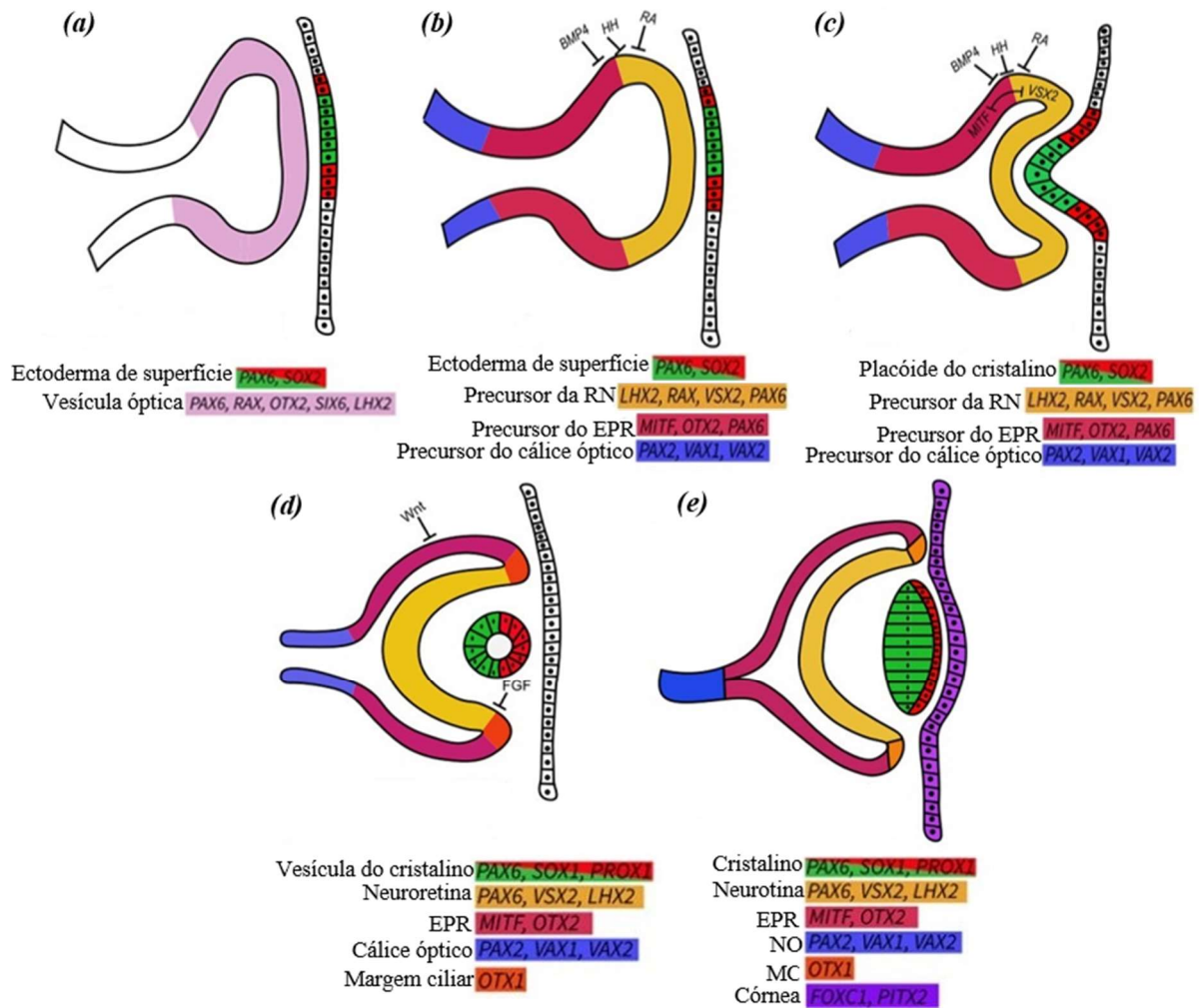


Figura 3: Morfogênese do campo ocular. (a) Após a divisão do campo ocular, ocorre o aprofundamento dos sulcos ópticos e evaginação da vesícula óptica. A vesícula óptica recém-formada expressa os fatores de transcrição do campo ocular. (b) A ação das vias de sinalização determina regiões precursoras da vesícula óptica caracterizadas por padrões únicos de expressão gênica. (c) As interações entre a vesícula óptica, o ectoderma de superfície e o mesênquima extraocular causam a invaginação do cálice óptico. As interações MITF e VSX2 criam limites entre o epitélio pigmentar da retina (EPR) e a neuroretina (NR) nas taças ópticas em desenvolvimento. O cristalino começa a se formar a partir do ectoderma de superfície. (d) Após a formação do cálice óptico, as vias *Wnt* e *FGF* direcionam a diferenciação EPR/NR e a definição clara dessas regiões por meio da formação da margem ciliar (MC). A vesícula do cristalino se forma à medida que o cristalino oco se desprende do ectoderma da superfície. (e) As fibras do cristalino se estendem para formar o cristalino a partir da vesícula oca do cristalino. A córnea se forma a partir do ectoderma superficial subjacente. NR e EPR são claramente definidos e separados pelas margens ciliares, enquanto o nervo óptico se forma a partir da convergência do pedúnculo óptico. Adaptado de Eintracht et al. (2020).

Conforme o desenvolvimento progride, cada vesícula óptica e ectoderma de superfície se espessa dando origem aos placódios que em seguida se invagina para formar o cálice óptico e fosso da lente, respectivamente (Figura 3c). A porção proximal da vesícula óptica recém-formada expressa os genes *Pax2*, *Vax1* e *Vax2* que são responsáveis pela formação do pedúnculo óptico (STANKE *et al.*, 2010 ; PATEL & SOWDEN, 2019). A relação

entre *Mitf* e *Vsx2*, juntamente com a sinalização *Fgf*, impulsiona o estabelecimento da neuroretina e do epitélio pigmentar da retina (Figura 3d) (CAPOWSKI *et al.*, 2014).

Proximo do final do desenvolvimento, as interações entre o cristalino e o cálice óptico induzem a formação da córnea a partir do ectoderma de superfície, onde os fatores de transcrição *Pitx2* e *Foxc1* são expressos no mesênquima periocular que regulam o desenvolvimento da córnea (Figura 3e) (DAVIES *et al.*, 2009; SNELL & LEMP, 2013; HARA *et al.*, 2019). Nessa etapa, as células mesenquimais da crista neural migram para o ectoderma de superfície e a vesícula do cristalino para formar gradualmente o estroma, epitélio e endotélio da córnea (LWIGALE, 2015). A terceira onda de migração de células mesenquimais também contribui para a formação da íris (EGHRARI *et al.*, 2015).

À medida que o desenvolvimento do olho atinge sua complexidade máxima por meio de uma série de indução e eventos morfogenéticos orquestrados por genes específicos, essa formação permanece amplamente conservada entre diferentes espécies de vertebrados (CAVODEASSI *et al.*, 2018). A exemplo disso, podemos citar o desenvolvimento ocular em *zebrafish* que se assemelha muito ao de humanos e outros vertebrados (Figura 4) (SCHMITT & DOWLING, 1994).

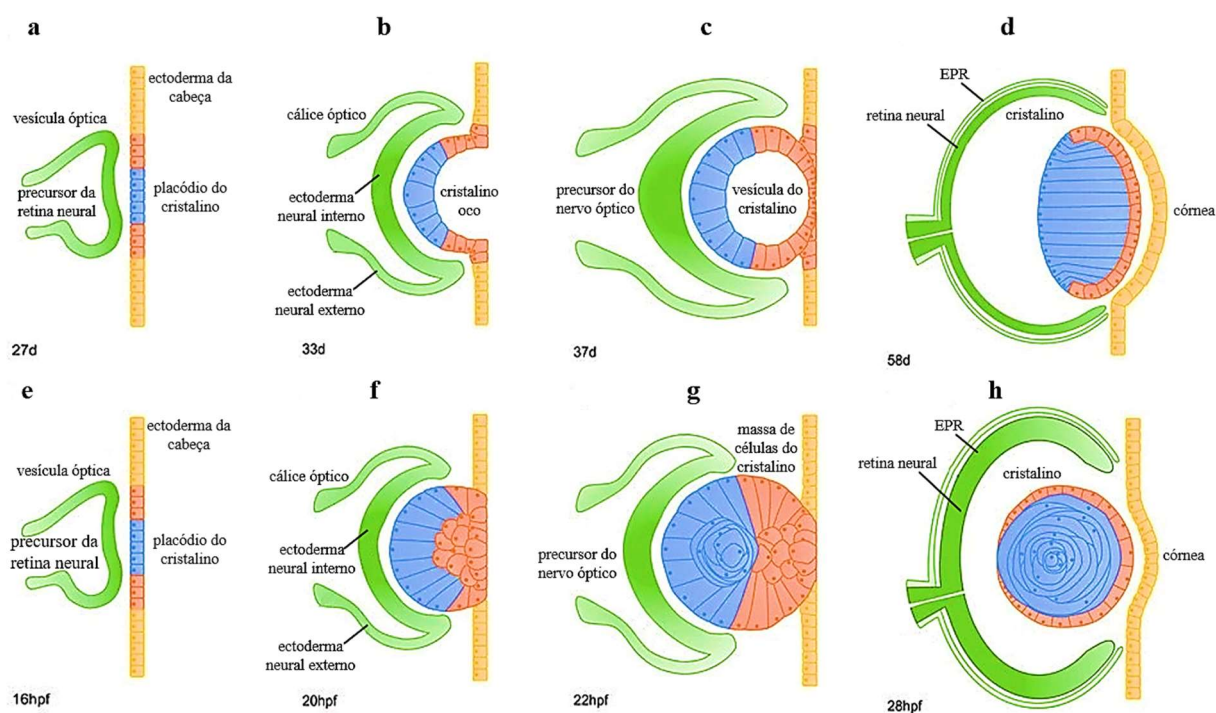


Figura 4: Esquema do desenvolvimento ocular humano e *zebrafish*. O placódio do cristalino e a vesícula óptica são formados assim que o campo ocular se divide (a, e). A vesícula óptica invagina formando a bicamada do cálice óptico (b, f). A camada interna diferencia em retina neural, enquanto que a camada externa se torna o epitélio pigmentado da retina (EPR). O cristalino desenvolve simultaneamente ao desenvolvimento da retina no homem e no *zebrafish*. O placódio do cristalino invagina e forma inicialmente uma estrutura esférica oca (em humanos) (c) ou uma massa sólida (*zebrafish*) (f, g). Em ambos, a córnea desenvolve-se quando o ectoderma da cabeça fecha após a separação da vesícula ou da massa densa de células do cristalino, respectivamente (d, h). Adaptado de Richardson *et al.* (2017).

Ambos se desenvolvem a partir de três tecidos embriológicos distintos: neuroectoderma, que dá origem à retina neural, epitélio pigmentar da retina, haste óptica, músculos dilatadores e esfínterianos da íris e corpo ciliar; Ectoderma de superfície, que forma o cristalino e, posteriormente, os epitélios da córnea; Por fim, o mesênquima, que se origina das células da crista neural formando o endotélio e o estroma da córnea, estroma da íris, músculos, vasculaturas ciliares e esclera (RICHARDSON *et al.*, 2017; QUINN & WIJNHOLDS, 2019).

Durante o desenvolvimento, há a formação de vesículas ópticas pela invaginação do diencéfalo em direção ao ectoderma da cabeça, ocasionando a formação do placódio do cristalino (TAMM, 2010; GILBERT, 2014). Interações coordenadas entre o neuroepitélio, o ectoderma de superfície e o mesênquima extraocular levam à formação de um cálice óptico de duas camadas, onde a camada externa se tornará o epitélio pigmentar da retina (EPR) e a camada interna se tornará a retina neural (RN) (CAVODEASSI *et al.*, 2018; FUHRMANN, 2010; HARADA *et al.*, 2007). A vesícula do cristalino se destaca do ectoderma da cabeça que posteriormente se une e diferencia-se em epitélio da córnea (RICHARDSON *et al.*, 2017). No decorrer desse processo, as estruturas distais do olho são fisicamente conectadas ao cérebro pela haste óptica que acabará por se remodelar para dar origem ao nervo óptico (PATEL & SOWDEN, 2019).

3.3 Estrutura básica do sistema visual dos vertebrados

Nos vertebrados em geral, o olho é o principal órgão sensorial da visão. Sua função é transmitir informações sobre o ambiente, absorvendo o estímulo luminoso e transformando-o em estímulo químico, e assim ativando diferentes vias para processamento de informações desde a retina até o sistema nervoso central (SNC) (DUQUE-CHICA, 2015; PRASAD & GALETTA, 2018).

Em humanos, essa estrutura é composta basicamente de uma camada externa (córnea e esclera); camada média (pupila, coróide, corpo ciliar e íris); e região interna (retina). Internamente estão o humor aquoso, líquido aquoso claro que fornece nutrientes para o cristalino e a córnea; o cristalino, que apresenta poder refrator consideravelmente menor do que a córnea; e o humor vítreo, substância gelatinosa que compõe cerca de 80% do volume do olho (Figura 5) (PURVES *et al.*, 2010). Como uma câmera, o olho é capaz de refratar a luz e produzir uma imagem que pode estimular respostas neurais e permitir a capacidade de ver, esse mecanismo acontece quando a luz incide no olho através da córnea, viaja pelas estruturas oculares até chegar na retina (BEIER *et al.*, 2021; QUINN & WIJNHOLDS, 2019; SQUIRE *et al.*, 2008).

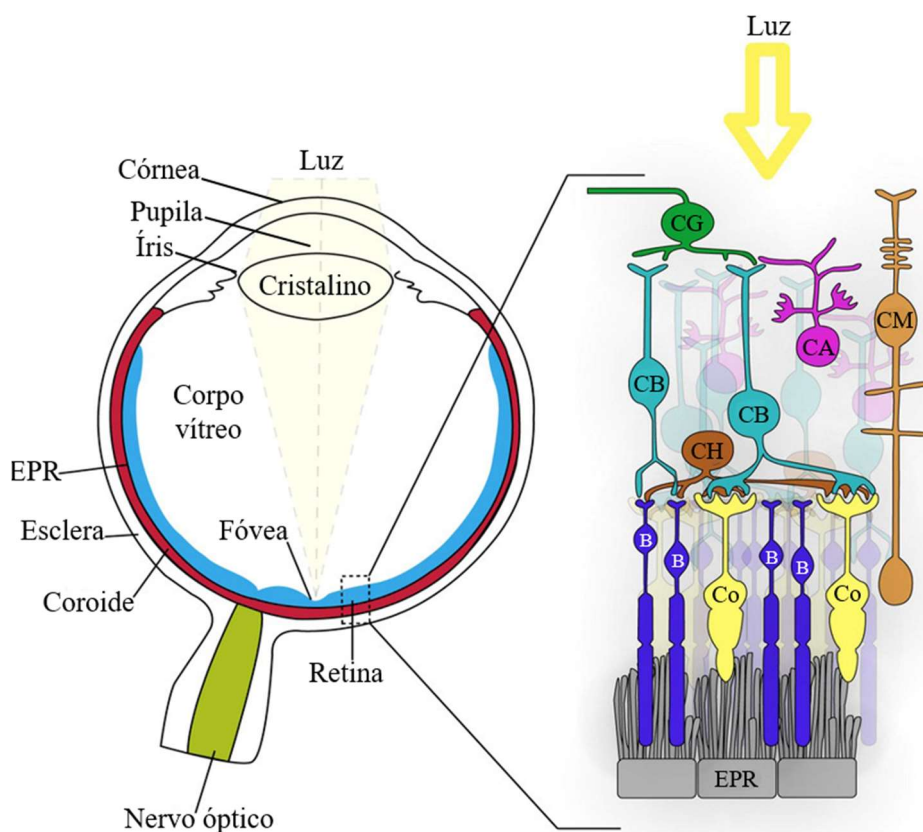


Figura 5: Representação esquemática do olho e da retina dos vertebrados. As estruturas básicas que compõem o olho de vertebrados são: córnea, pupila, íris, cristalino, corpo vítreo, esclera, coróide, fóvea, retina, epitélio pigmentar da retina (EPR) e nervo óptico. O olho é envolto em duas camadas: a coróide e a esclera. Quando a luz incide no olho, é refratada pela córnea através da pupila, cuja a dilatação é controlado pela íris. A íris, corresponde a parte externa pigmentada do olho que regula a quantidade de luz que será transferida para a região interna, enquanto a lente focaliza a luz através do corpo vítreo na superfície proximal da retina. A retina é composta por: células fotorreceptoras denominadas cones (Co) e bastonetes (B); células horizontais (CH), células amácrinas (CA) e células bipolares (CB), células ganglionares (CG). Os axônios das CG formam o nervo óptico. As principais células gliais da retina são as células de Müller (CM) que suportam a atividade neural da retina. Adaptado de Díaz et al. (2016).

Todas essas estruturas são altamente especializadas e diferem entre si em relação à anatomia, função, localização, metabolismo e fonte de suprimento de nutrientes, que no olho pode ser o plasma sanguíneo ou o humor aquoso (KRYCZKA *et al.*, 2014). Embora os olhos de todos os vertebrados sejam construídos de acordo com um modelo geral, sua homologia entre diferentes espécies é evidente em vários aspectos, tais como: desenvolvimento, arquitetura neural, fiação sináptica, fisiologia celular e marcadores moleculares, no entanto, sua estruturação sempre se baseia no mesmo princípio básico (CHOW & LANG, 2001; ZUBER *et al.*, 2003).

Como parte dos componentes oculares dos vertebrados, na região anterior do olho, encontra-se a córnea (DHOUAILLY *et al.*, 2014). Essa estrutura cumpre dupla função, atuando como uma capa protetora e transparente que envolve as partes internas do olho, e como uma lente refrativa que focaliza a luz de volta à retina neurosensorial (WINKLER *et al.*, 2015).

Estruturalmente, a córnea é organizada em diferentes camadas. No *zebrafish* adulto, a córnea tem aproximadamente 20 μm de espessura e contém todas as cinco principais camadas da superfície da córnea humana: epitélio, camada de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio (Figura 6) (ZHAO *et al.*, 2006; SRIDHAR, 2018).

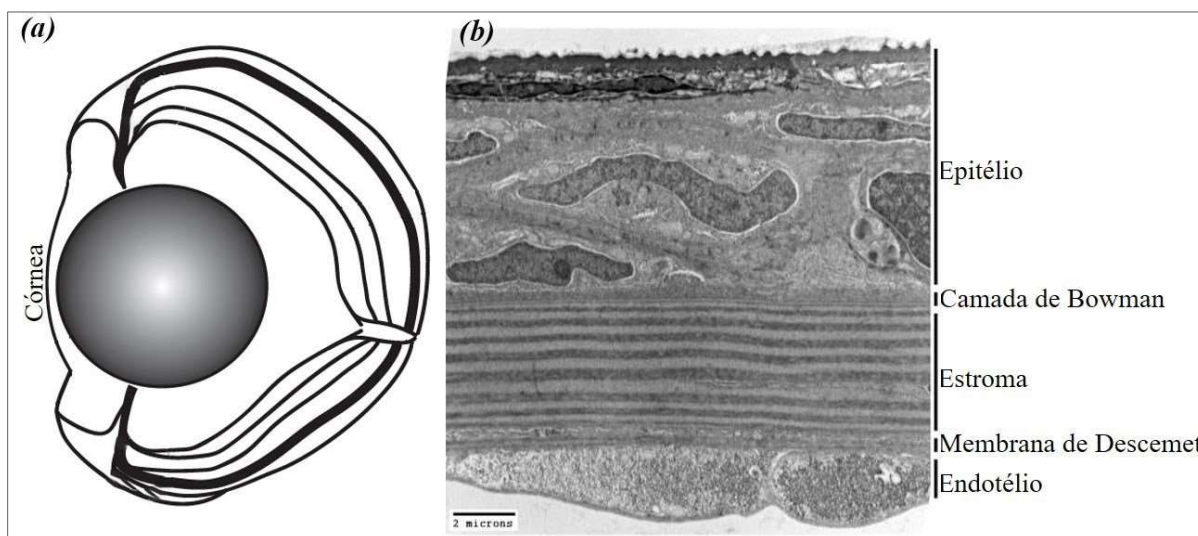


Figura 6: Estrutura da córnea e do olho de *zebrafish* adulto. (a) Desenho esquemático da córnea de *zebrafish* adulto. (b) Seção central das cinco camadas da córnea: epitélio; camada de Bowman; estroma; membrana de Descemet e endotélio. Barra de escala = 2 μm . Adaptado de Gestri *et al.* (2012); Vihtelic *et al.* (2005).

O epitélio é a camada mais externa da córnea e, portanto, está constantemente exposta ao meio ambiente, essa camada mantém a superfície da córnea lisa e fornece uma barreira contra agentes biológicos externos e danos químicos (GUÉRIN *et al.*, 2021). Abaixo dessa camada de células e de sua membrana basal encontra-se a camada de Bowman, uma malha acelular relativamente fina composta por fibrilas de colágeno que é contínua com o aspecto anterior do estroma (HAMMOND *et al.*, 2020).

Abaixo da camada de Bowman, encontra-se o estroma, composto, em sua maioria, de tecido conjuntivo, queratócitos e fibrilas de colágeno (ESPANA & BIRK, 2020; HAMMOND *et al.*, 2020; NOTARA *et al.*, 2018). O estroma fornece propriedades exclusivas que são necessárias para sua função, incluindo transparência e vascularidade, bem como propriedades mecânicas necessárias para a resistência e manutenção da forma (DELMONTE *et al.*, 2011; DEPALLE *et al.*, 2016). Posterior ao estroma, encontra-se a membrana de Descemet que conecta o endotélio ao lado posterior do estroma. Trata-se de uma matriz densa e espessa, relativamente transparente que permite a entrada de nutrientes e macromoléculas, além de fornecer adesão para a monocamada de células endoteliais que atuam na integridade da córnea, bem como na manutenção da transparência dessa estrutura (EGHRARI *et al.*, 2015; LWIGALE, 2015; SAIKIA *et al.*, 2018; DE OLIVEIRA & WILSON, 2020).

Por fim, a camada mais interna da córnea, o endotélio, que consiste de uma monocamada de células hexagonais metabolicamente ativas que separa a córnea do ambiente aquoso do olho interno (HAMMOND *et al.*, 2020; PERIS-MARTÍNEZ *et al.*, 2021). O principal papel do endotélio é regular a hidratação do estroma, promovendo o transporte do excesso de fluidos para fora do estroma através de bombas iônicas e cotransportadores (BONANNO, 2012; SRINIVAS, 2010).

De modo geral, vertebrados têm a córnea como uma adaptação evolutiva, pois algumas modificações estruturais parecem ter se desenvolvido no início da evolução dos vertebrados, enquanto outras desenvolveram-se mais tarde, devido pressões ambientais específicas (COLLIN & COLLIN, 2000).

Posterior à córnea, encontra-se o cristalino, um sistema óptico complexo que proporciona altos níveis de qualidade de imagem e mantém a transparência por grande parte da vida útil dessa estrutura (BASSNETT & ŠIKIĆ, 2017). Em peixes, a morfologia do cristalino se difere a de mamíferos (Figura 7), seu formato confere, confere um alto poder de refração que é alcançado por dois meios: primeiro pela forma esférica e segundo por um gradiente acentuado de índice de refração (KRÖGER, 2013). Embora o cristalino seja composto por apenas dois tipos de células, seu papel fisiológico é refratar a luz na retina e esta função deve ser mantida inicialmente à medida que o olho se desenvolve (HAGEN *et al.*, 2019.; SUGIYAMA *et al.*, 2011).

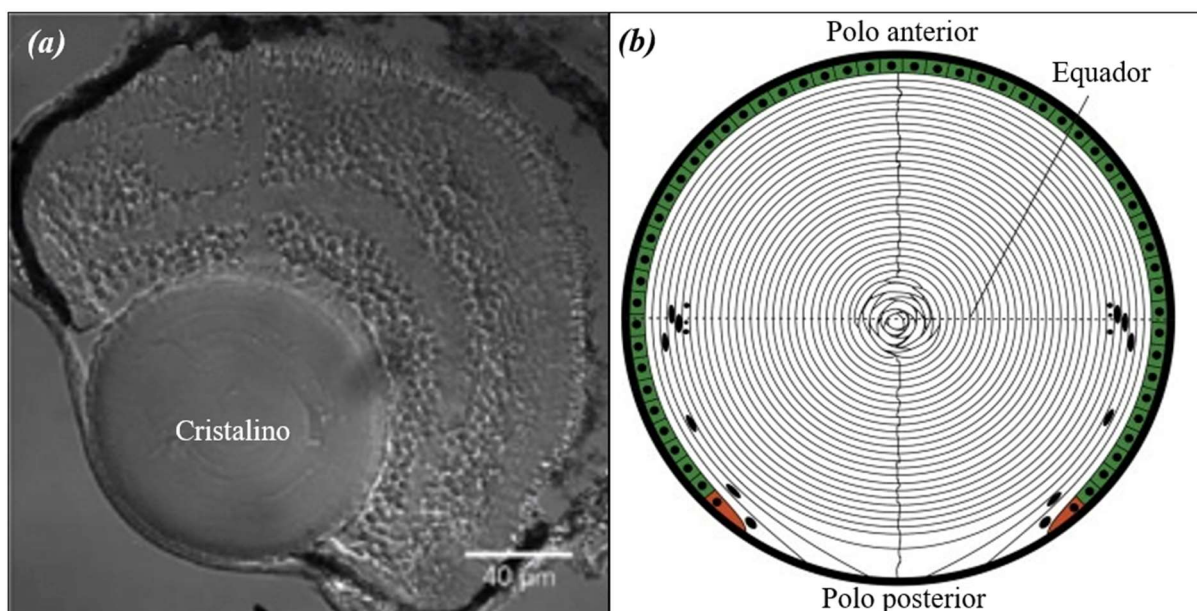


Figura 7: Estrutura olho e do cristalino de zebrafish. (a) Anatomia do olho de *zebrafish* imagem (b) Desenho esquemático de um cristalino de peixe em corte axial mostrando a cápsula fibrosa do cristalino (preto), o epitélio do cristalino metabolicamente ativo (verde), a zona de proliferação (vermelho) e camadas de células de fibra do cristalino. As suturas da lente com conexões de ponta a ponta das células de fibra da lente são mostradas como linhas verticais irregulares. O núcleo embrionário de um cristalino de peixe consiste em camadas de células mal ordenadas. Adaptado de Angueyra & Kindt, 2018; Kröger (2013).

O seu alto índice de refração e transparência ao longo da vida dependem do arranjo preciso das células de fibra do cristalino, que são sobrepostas às gerações anteriores de células de fibra de forma concêntrica (CHENG *et al.*, 2013). Essas células compõem a maior parte do cristalino e são formadas pela diferenciação de células epiteliais encontradas no equador da lente, esse processo envolve a degradação de todas as organelas intracelulares ligadas à membrana e a expressão de proteínas chamadas cristalinas (CVEKL *et al.*, 2014.; SONG *et al.*, 2009).

No caso dos peixes, o cristalino e córnea juntos focalizam a luz na retina, uma estrutura que faz parte do sistema nervoso central e exhibe circuitos neurais complexos que convertem a atividade elétrica em potenciais de ação que são transmitidos ao cérebro através dos axônios do nervo óptico (VORONTSOVA *et al.*, 2019; MAHLER *et al.*, 2013; PURVES *et al.*, 2010).

A retina encontra-se altamente conservada em vertebrados, com características anatômicas e fisiológicas quase idênticas em vários táxons. Todos os vertebrados têm uma retina que contém três camadas, consistindo em fotorreceptores (bastonetes e cones), uma camada nuclear interna (contendo os corpos celulares dos neurônios de processamento) e uma camada de células ganglionares contendo os corpos celulares das células ganglionares, os neurônios de projeção da retina (Figura 8) (MAHABADI & AL KHALILI, 2021; STENKAMP, 2007).

De forma detalhada, sua estrutura apresenta dez camadas distintas de neurônios interconectados por sinapses que se subdividem em três tipos básicos: células fotorreceptoras (cones e bastonetes), células neuronais e células gliais de Müller. As camadas mais próximas da parte anterior frontal da cabeça em direção à parte posterior da cabeça são as seguintes: membrana limitante interna (MLI), camada de fibra nervosa (CFN) e camada de células ganglionares (CCG) que são os neurônios de saída que conectam o olho ao cérebro e são responsáveis por toda a percepção visual em mamíferos (QUINN & WIJNHOLDS, 2019; MAHABADI *et al.*, 2021). Seus corpos celulares são distribuídos em camadas nucleares: a camada plexiforme interna (CPI), camada nuclear interna (CNI), camada plexiforme externa (CPE), camada nuclear externa (CNE) e membrana limitante externa (MLE). Mais externamente, a retina contém o epitélio pigmentar (EPR), que é responsável pelo transporte de nutrientes e elementos circulantes para os fotorreceptores. Logo abaixo, encontra-se a porção do segmento externo (SE) onde os fotorreceptores (cones e bastonetes) estão localizados e projetados para o epitélio pigmentar da retina adjacente (MAHABADI *et al.*, 2021; MASRI *et al.*, 2021; RICHARDSON *et al.*, 2017; STENKAMP, 2015).

Além disso, existem outros tipos de células gliais que servem para manter a homeostase da retina, os astrócitos e a micróglia, que além de fornecer suporte estrutural, estão envolvidos no metabolismo, na fagocitose de detritos neuronais, na liberação de certos neurotransmissores, fatores tróficos e captação de K^+ (VECINO *et al.*, 2016).

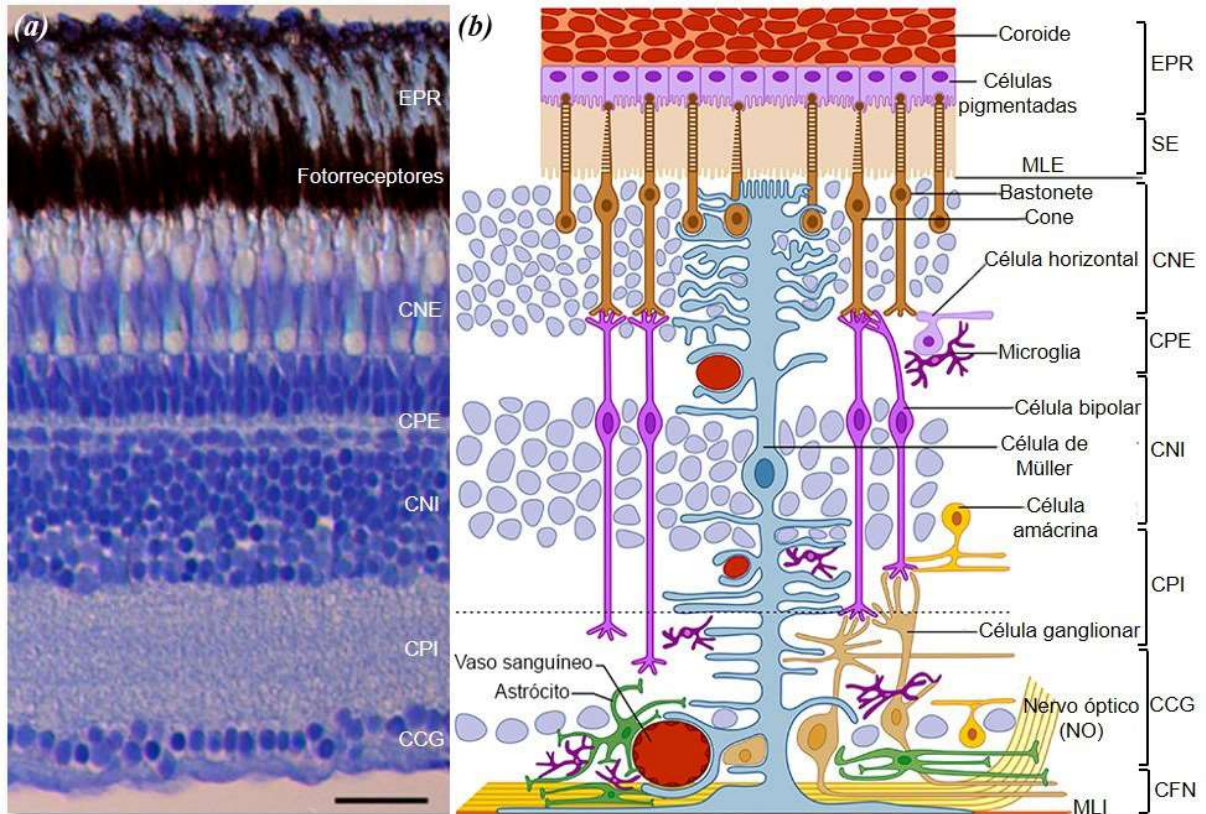


Figura 8: Organização esquemática da retina de vertebrados. (a) Microfotografia de um corte transversal da retina de um *zebrafish* adulto, mostrando a organização da retina em camadas retiniais celulares e sinápticas composta por: CCG, CPI, CNI, CPE, CNE, camada de fotorreceptores (cones e bastonetes) e EPR. Barra de escala = 25µm. (b) A retina consiste em diversas células localizadas em camadas específicas. Os corpos celulares de fotorreceptores de bastonete e cone (marrom) estão localizados na CNE. Ambos os fotorreceptores realizam sinapses no CPE com células bipolares (roxas) e horizontais (lilás), que, por sua vez, apresentam seus corpos celulares na porção externa da CNI, bem como células amácrinas (amarelas) e células de Müller (azuis). As células bipolares (roxas) entram em contato com cones fazendo sinapses. Os axônios das células ganglionares formam a camada de fibra nervosa (CFN). Os três tipos de células gliais (Müller, astrócitos e microglia) são encontrados em diferentes camadas da retina. Os astrócitos (verdes) são restritos à parte interna da retina, na CFN e CCG, e têm relação próxima com os vasos sanguíneos. Finalmente, as células de Müller estendem radialmente por toda a retina, formando a membrana limitante interna (MLI) e a membrana limitante externa (MLE). Os processos das células de Müller interagem com quase todos os tipos de células da retina, incluindo vasos sanguíneos, exibindo um papel crucial na fisiologia deste tecido. Adaptado de Gramage *et al.* (2014); De Campos (2020).

A retina apresenta duas classes de fotorreceptores, os bastonetes e cones, os bastonetes que detectam baixas intensidades de luz e cones que codificam cores e funções durante a visão diurna (SQUIRE *et al.*, 2008). Tanto os bastonetes quanto os cones diferem entre si quanto a morfologia e função, são altamente compartimentados, possuem cinco regiões principais: segmento externo (SE), cílios de conexão (CC), segmento interno (SI), região nuclear e região sináptica (Figura 9) (SONODA *et al.*, 2016).

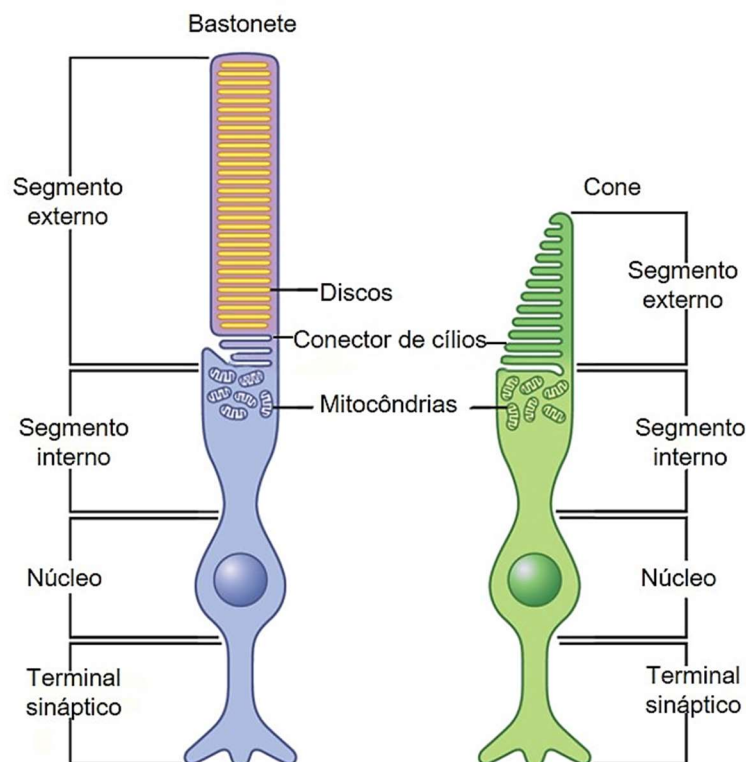


Figura 9: Morfologia dos cones e bastonetes. Os cones e bastonetes apresentam a mesma estrutura básica, sendo composta por: SE dos bastonetes contém uma pilha de discos cercados por uma membrana plasmática, enquanto a de cones resulta do dobramento de sua membrana plasmática. Um cílio conector que conecta os SE e SI. Já o SI contém a maquinaria metabólica necessária para o funcionamento dessas células nervosas. O diagrama também mostra o núcleo e a terminação sináptica. Adaptado de Salesse (2017).

Os bastonetes são muito mais sensíveis à luz podendo sinalizar a absorção de um único fóton, sendo responsáveis pela visão sob iluminação fraca. Já os cones são menos sensíveis à luz e sua resposta à estímulos luminosos é relativamente mais rápida do que a dos bastonetes (ASTERITI *et al.*, 2015; MOLDAY & MORITZ, 2015; MAHABADI *et al.*, 2021). Essas são células presentes em quase todos os animais e podem ser classificadas em dois tipos: ciliares e microvilares, a primeira é formada por invaginações de membrana no SE, resultando em estruturas semelhantes a discos compactos (FAIN *et al.*, 2010). Esses discos criam uma grande área de superfície com as membranas contendo uma alta concentração de pigmentos visuais que participam da cascata de fototransdução (GILLIAM *et al.*, 2012).

Nos vertebrados, o fotopigmento principal é a rodopsina, o pigmento visual encontrado nos bastonetes. É composta de uma opsina, uma proteína de membrana na forma de um aglomerado de α -hélices que atravessam a membrana, e um cromóforo derivado da vitamina A chamado de retinal (uma molécula que absorve luz) (Figura 10) (TSAI *et al.*, 2019).

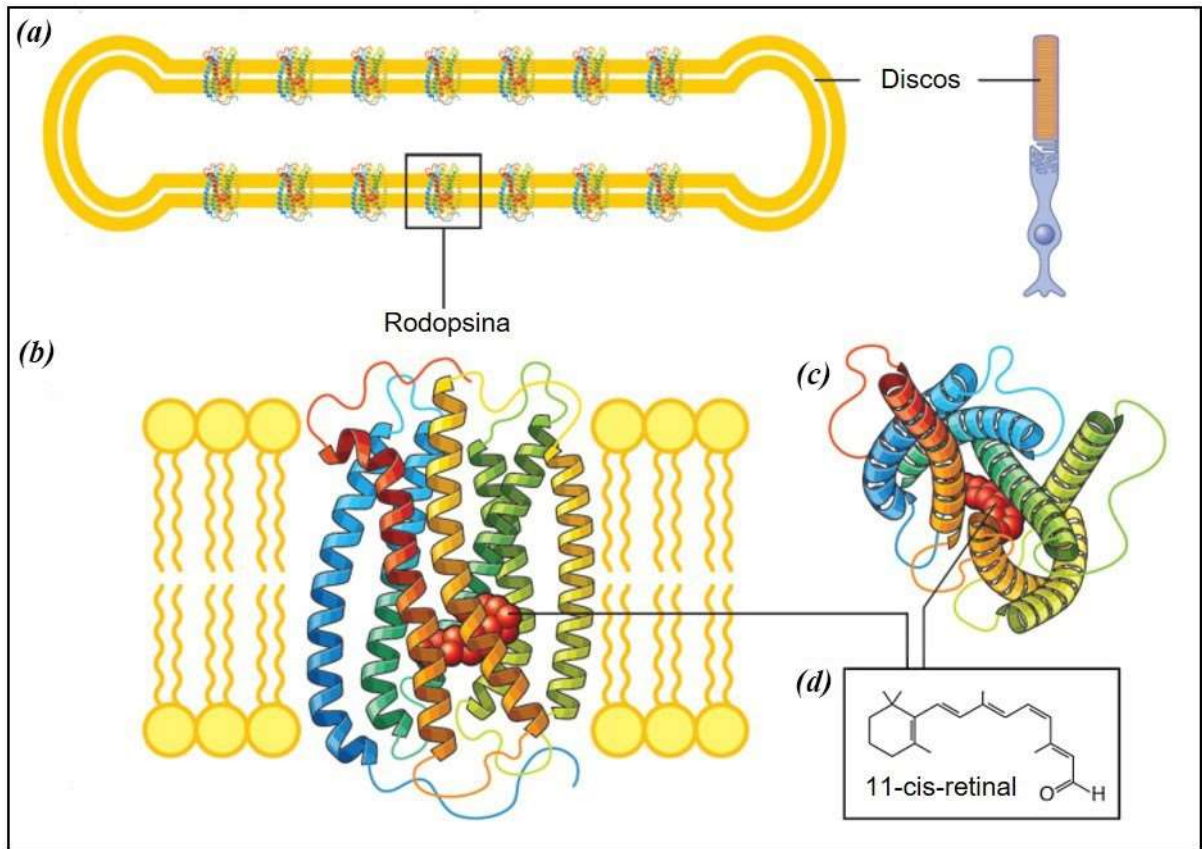


Figura 10: Estrutura básica de uma rodopsina e sua organização na membrana dos bastonetes. (a) Esquema de um disco rígido mostrando a rodopsina incorporada à membrana (a rodopsina é responsável por 95% das proteínas transmembranares nos discos). (b) Estrutura da rodopsina, obtida a partir de suas coordenadas estruturais, sendo composta de uma parte proteica, a opsina, e um pequeno composto que absorve luz, o retinal. A opsina tem 348 aminoácidos. Ela atravessa a membrana do disco do bastonete por sete vezes. O retinal é covalentemente ligado a uma lisina na sétima região transmembrana da proteína. (c) Estrutura da rodopsina vista de cima. (d) Estrutura da retina 11-*cis*-retinal (os traços mostram sua posição na estrutura da rodopsina). A absorção de luz pelo 11-*cis* retinal causa uma rotação em torno da ligação dupla. Como o retinal adota a configuração mais estável *all-trans*, isso provoca uma alteração conformacional na porção proteica e desencadeia os eventos subsequentes de transdução visual. Adaptado de Salesse (2017).

No reino animal, a fototransdução é mediada pela sinalização $G_{\alpha t}$ e $G_{\alpha q}$, utilizadas pelas células fotorreceptoras ciliares e rabdoméricas (LAGMAN *et al.*, 2015). Tal processo tem início com a transformação de energia luminosa em sinais elétricos que serão conduzidos aos centros visuais via nervo óptico (KAMKAR *et al.*, 2018). De forma detalhada, a cascata de fototransdução é constituída pela absorção de fótons pelos pigmentos visuais presentes na membrana das células fotorreceptoras e pelas alterações conformacionais moleculares resultantes de um estado de repouso para um estado de sinalização após a absorção de luz, que, por conseguinte, ativa a proteína G (PALCZEWSKI, 2012; SHICHIDA & MATSUYAMA, 2009).

Todo o processo ocorre nos subcompartimentos ciliares das células sensoriais (cones e bastonetes) e depende da ativação de receptores acoplados à proteína G para fechar canais catiônicos controlados por nucleotídeos cíclicos em fotorreceptores para produzir uma

hiperpolarização da célula (ABBAS & VINBERG, 2021). Isso eventualmente resulta no declínio da concentração intracelular de *GMPc* e fechamento dos canais de íons $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ controlados por *GMPc* na membrana plasmática dos bastonetes (Figura 11) (MAHROO, 2012).

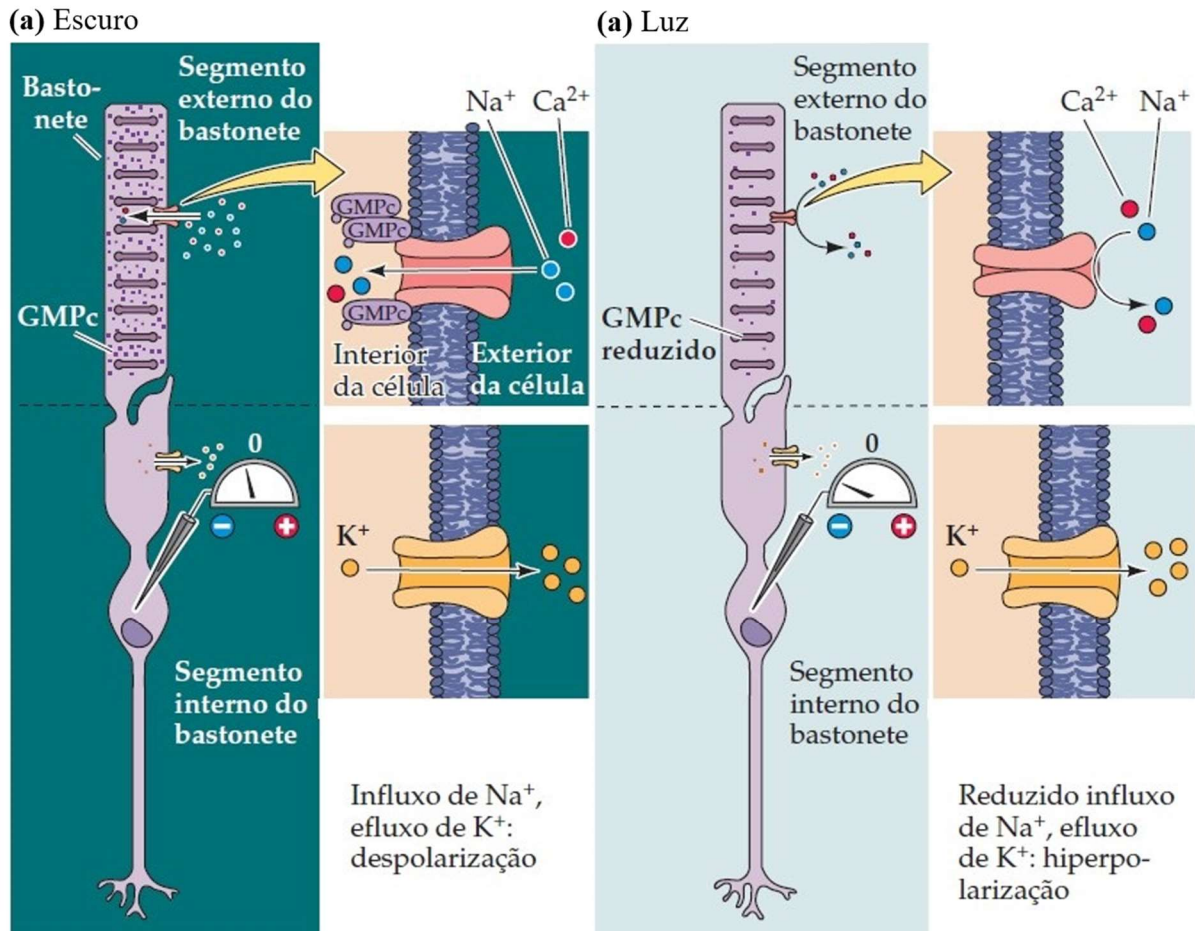


Figura 11: Transdução de sinal na retina. Canais ativados por *GMPc* cíclico na membrana do segmento externo são responsáveis pelas mudanças induzidas pela luz na atividade elétrica dos fotorreceptores (um bastonete é mostrado neste diagrama simplificado, mas o mesmo esquema aplica-se aos cones). (A) No escuro, os níveis de *GMPc* no segmento externo são altos; essa molécula liga-se a canais permeáveis ao sódio na membrana, mantendo-os abertos e permitindo que o sódio entre (assim como outros cátions), desse modo despolarizando a célula. (B) A absorção de fótons leva a uma diminuição nos níveis de *GMPc*, ao fechamento dos canais de cátions e à hiperpolarização do receptor. Adaptado de Purves et al., (2010).

A cascata de fototransdução de sinal em fotorreceptores ocorre nos segmentos externos dos bastonetes, é iniciada quando a rodopsina absorve um fóton e induz uma alteração conformacional no cromóforo 11-*cis*-retinal, que é isomerizado em *all-trans*-retinal, fazendo com que o receptor seja ativado por uma opsina (Figura 12a e 12b) (LAMB *et al.*, 2020). Esse processo desencadeia a troca de GDP por GTP na proteína G, que leva a um aumento na hidrólise de *GMPc* por um complexo PDE (fosfodiesterase). A concentração reduzida de *GMPc* fecha os canais controlados por *GMPc*, que normalmente estão abertos no escuro, e despolarizam o potencial de membrana da célula devido ao influxo de Na^+ e Ca^{2+} . Assim, a

absorção de fótons leva a uma pequena hiperpolarização graduada no potencial de membrana (Figura 12c). O deslocamento das subunidades α β γ permitem que o GMPc seja reduzido a GMP, fechando os canais, causando uma hiperpolarização do fotorreceptor (PAHLBERG & SAMPATH, 2011).

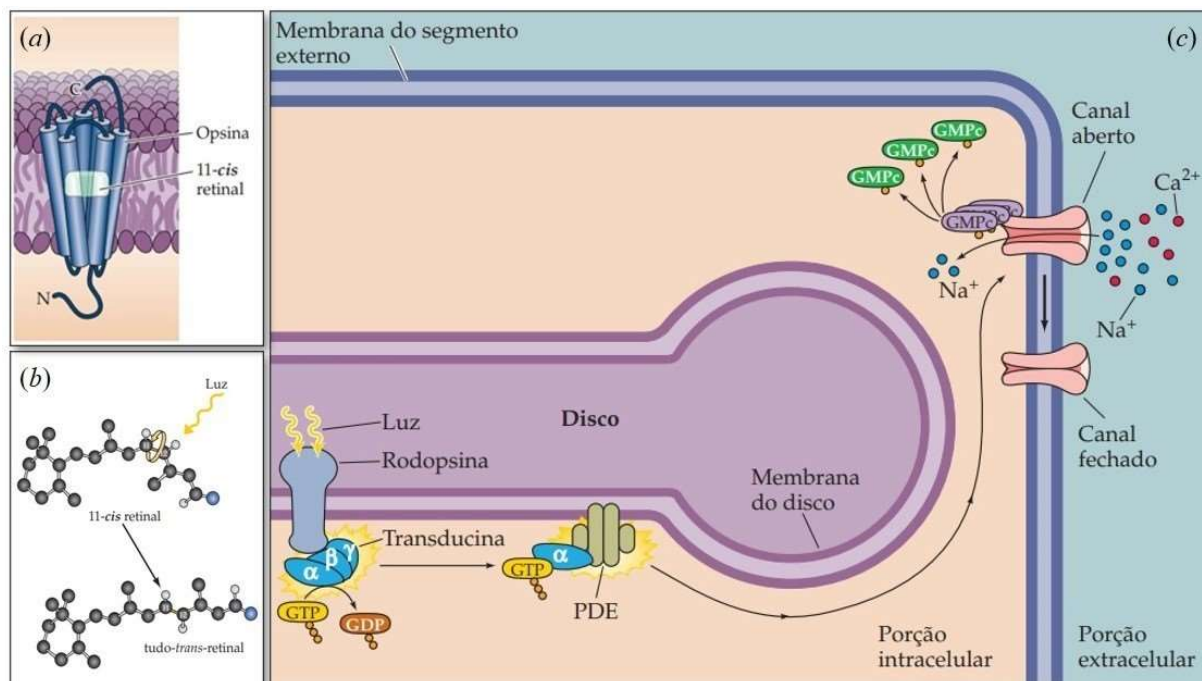


Figura 12: Representação esquemática da cascata de fototransdução em fotorreceptores de vertebrados. (a) A rodopsina está localizada na membrana dos discos do segmento externo do fotorreceptor. Os sete domínios transmembranares da opsinina cercam a molécula de retinal, sensível à luz. (b) A absorção de um fóton de luz pelo retinal leva à mudança em sua configuração, de isômero 11-cis para *all-trans*. (c) A cascata do segundo mensageiro da fototransdução. A mudança isomérica do retinal ativa a transducina, a qual ativa a fosfodiesterase (PDE). A fosfodiesterase hidrolisa o GMPc, reduzindo sua concentração no segmento externo e levando ao fechamento de canais na membrana do segmento externo. Adaptado de Purves et al. (2010).

Como característica marcante da fototransdução em vertebrados os fotorreceptores utilizam isoformas distintas da maioria dos componentes proteicos da cascata de transdução (INGRAM *et al.* 2016). Em cada caso, a isoforma é codificada por um gene diferente. A fototransdução, portanto, representa um sistema evolutivo único, onde um mesmo processo utiliza conjuntos diferentes de genes em diversas classes de células (LAMB & HUNT, 2017; KOCH *et al.*, 2015).

Além das células fotorreceptoras mencionadas, há uma terceira classe de fotorreceptores não canônicos na retina dos mamíferos, chamados de células ganglionares retiniais, intrinsecamente fotossensíveis. Tal classe de células se difere de outros neurônios da retina por suas respostas à luz serem conduzidas não apenas por sinais sinápticos derivados de fotorreceptores clássicos (bastonetes e cones), mas também por fototransdução autônoma, mediada pela proteína melanopsina (SONODA *et al.*, 2016.; KIM *et al.*, 2021). Portanto, além de fornecer informação para processamento de imagem, a retina dos mamíferos contém várias

opsinas envolvidas na sincronização da fotorrecepção e dos ritmos circadianos (QUINN & WIJNHOLDS, 2019).

3.4 Diversidade de opsinas em vertebrados

A adaptação fisiológica ou evolutiva de alguns organismos aquáticos é uma etapa necessária para superar estresses físicos e químicos severos decorrentes dos mais variados ambientes (CHEN & MAYDEN, 2010). A evolução e divergência funcional das opsinas na retina de peixes são ótimos exemplos para estudar este aspecto, especialmente sobre a evolução funcional que acompanha a duplicação de genes (COLLIN & DARWIN, 2005).

Na maioria dos vertebrados a luz é captada por meio de opsinas, que participam do processo de formação de imagem e de processos biológicos críticos, como sazonalidade, fotoperiodismo e reparo de DNA (KELLEY & DAVIES, 2016; XIE *et al.*, 2019; INGA & WHITMORE, 2019; FONTINHA *et al.*, 2021).

As opsinas pertencem à família de proteínas receptoras acopladoras à proteína G, que estão ancorados por meio de seus domínios transmembranares que são capazes de formar um complexo fotossensível ligando-se a um cromóforo retinal (MUSILOVA *et al.*, 2021). A maioria das opsinas pertencem a dois grandes grupos, opsinas do tipo rabdomérico (r-opsinas, mais comuns em invertebrados) que se caracteriza pela topologia das microvilosidades apicais, pela ativação da cascata de sinalização do fosfoinositol (Gq) e pela despolarização da membrana em resposta à luz. O segundo, o tipo ciliar (c-opsinas, mais comum em vertebrados) é caracterizado por membranas estendidas para formar uma topologia de cílio modificado, cascatas de sinalização de nucleotídeos cíclicos (Gs, Gt e Go) e hiperpolarização em resposta à luz (BECKER *et al.*, 2016; ISOLDI *et al.*, 2005; GOJOBORI & INNAN, 2009).

Estudos filogenéticos mostram que os genomas de peixes teleósteos codificam 20 opsinas de classes diferentes, enquanto répteis, pássaros e anfíbios também apresentam uma alta diversidade genômica de opsinas. Em *zebrafish* (*Danio rerio*) são encontrados 42 genes de opsinas diferentes, sendo 10 opsinas visuais (dentre elas *Lws1*, *Lws2*, *Rh2-1*, *Rh2-2*) (Figura 13) e 32 opsinas não visuais (DAVIES *et al.*, 2015, MUSILOVA *et al.*, 2021, TAKECHI & KAWAMURA, 2005).

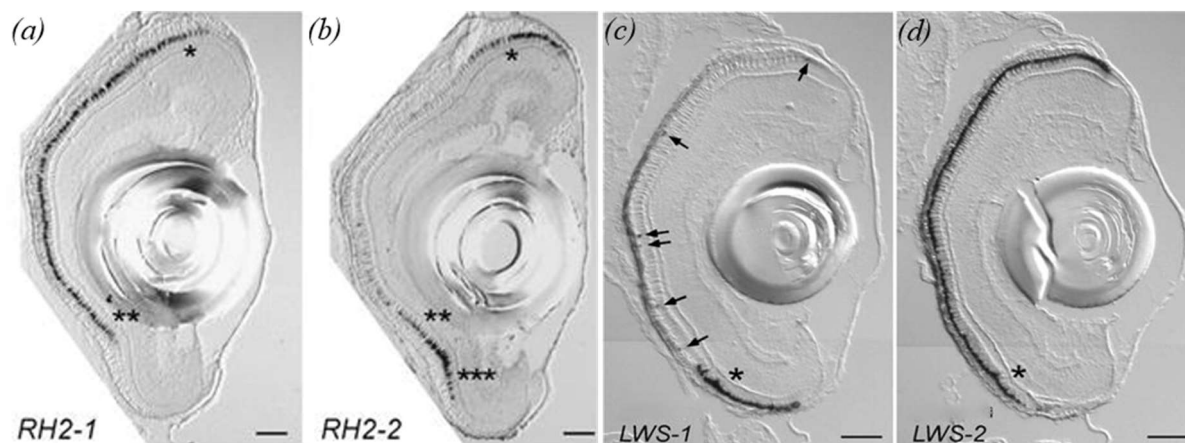


Figura 13: Padrão de expressão de genes de opsinas visuais na retina de de larvas de *Zebrafish*. Hibridização *in situ* de seções de olhos de larvas em desenvolvimento mostram a expressão de genes de opsina visuais (*Lws-1*, *Lws-2*, *Rh2-1* e *Rh2-2*). (a, b) HIS de seções transversais de olhos de larvas de *zebrafish* mostram a expressão de *Rh2-1* e *Rh2-2* ao longo da retina. As estrelas simples, estrelas duplas e estrelas triplas são marcadores de posição que mostram a localização correspondente entre as seções. (c, d) mostram a expressão de *Lws-1* e *Lws-2* (B). As setas em (c) indicam os sinais de hibridização esparsos de *Lws-1*. As localizações correspondentes entre as duas seções são indicadas com uma estrela. Barras de escala 50 µm (a, b, c, d). Adaptado de Takechi & Kawamura (2005).

Durante a evolução, vários eventos de duplicação de genes levaram ao aumento de membros da família das opsinas visuais (DAVIES *et al.*, 2012). Da mesma forma, foram identificadas duas linhagens ancestrais de genes de melanopsinas que se distribuem diferencialmente na retina neural do olho do *Zebrafish* (Figura 14) (DAVIES *et al.*, 2011).

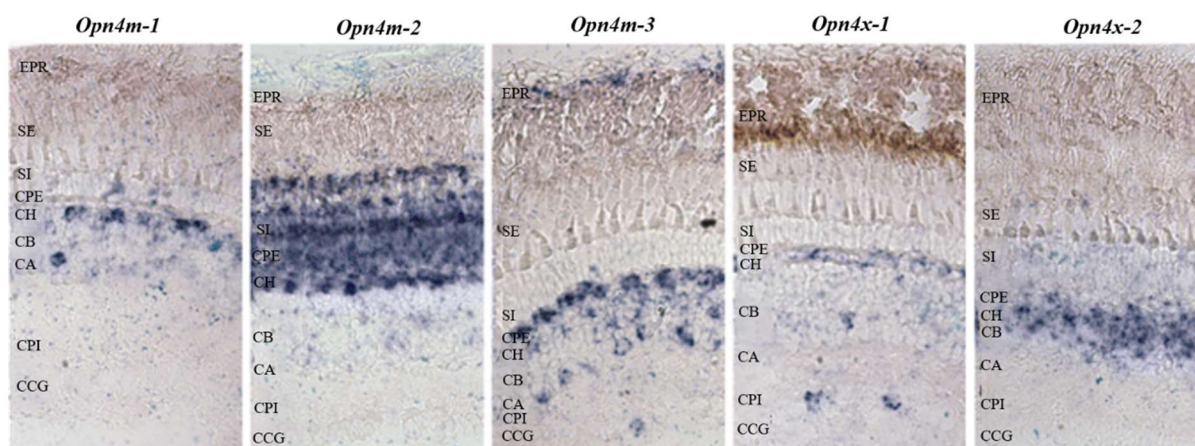


Figura 14: Expressão de melanopsinas (*opn4m-1*, *opn4m-2*, *opn4m-3*, *opn4x-1*, *opn4x-2*) no olho de *Zebrafish* adulto. Todos os cinco genes foram detectados na camada nuclear interna (CNI), com células horizontais (CH) expressas predominantemente em *Opn4m-2* e em menor extensão em *Opn4m-3* e *Opn4x-1*. Nas células bipolares (CB), *Opn4m-1* foi fortemente expressa, com os outros quatro transcritos sendo detectados em menor grau. Nas células amácrinas (CA) baixos níveis de expressão foram observados em *Opn4m-1*, *Opn4m-3* e *Opn4x-1*. Em um pequeno subconjunto de células ganglionares da retina (CCG), *Opn4x-1* e *Opn4m-3* foram os únicos transcritos de melanopsina a serem detectados. A maioria das CCG não expressou nenhuma isoforma de melanopsina. No epitélio pigmentar da retina (EPR), *Opn4m-3* foi a única melanopsina expressa. Adaptado de Davies et al. (2011).

Mais de 2.000 tipos de opsinas foram identificados até agora, sendo estas classificadas em três grupos (Figura 15): opsinas visuais e não visuais de vertebrados (acopladas a proteína G_i), opsinas visuais de invertebrado/*Opn4* (acoplada a proteína G_q), opsinas de invertebrados acopladas a G_o , opsinas *Opn3*, *Tmt* e encefalopsina (acopladas a G_i/G_o), neuropsina *Opn5* (acoplada a G_i) e opsina cnidária (acoplada a G_s), por fim outros dois grupos classificados como retinocromo e peropsina (OAKLEY & PLACHETZKI, 2010; YAMASHITA *et al.*, 2010; TERAOKA *et al.*, 2012; TERAOKA *et al.*, 2014).

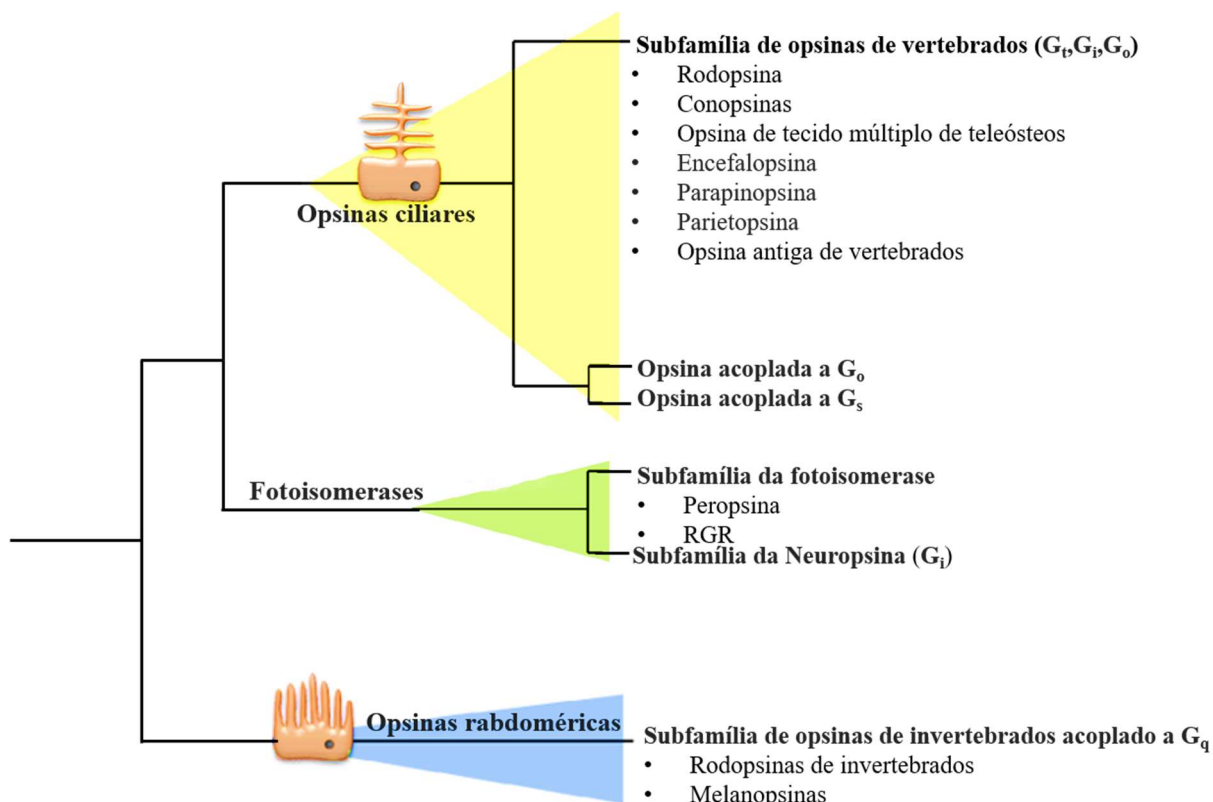


Figura 15: Árvore filogenética esquemática da família das opsinas. Existem três grupos: opsinas ciliares e opsinas rbdoméricas. Adicionalmente, pode ser referido também um grupo variado não definido mais intimamente relacionado com as c-opsinas, que inclui as opsinas da fotoisomerase. Os tipos de opsina ciliar e rbdomérico provavelmente divergiriam antes que os bilaterais surgissem. Adaptado de Borges (2012).

Em vertebrados é possível encontrar até cinco tipos de opsinas visuais que absorvem luz em diferentes comprimentos de onda e que medeiam etapas essenciais para discriminação de cores e formação de imagens (LAMB & HUNT *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2015). Quatro linhagens de genes de opsina são vistos em cones, uma classe de onda média a longa (*LWS*) sensível à região espectral verde a vermelho (490–570 nm), uma classe de ondas curtas (*SWS1*) sensível à região espectral ultravioleta (350–400 nm), uma classe de ondas curtas (*SWS2*) sensível à região espectral violeta-azul (410–490 nm), uma classe de ondas médias (*RH2*) sensível à região espectral verde (480–535 nm), ambos são responsáveis pela visão fotópica.

Por fim, uma quinta linhagem do gene da opsina RH1 expresso apenas em bastonetes, responsáveis pela visão monocromática de luz fraca (escotópica) (Figura 16) (YOKOYAMA, 2008; YOKOYAMA *et al.*, 2000; BOWMAKER & HUNT 2006 ; BOWMAKER *et al.*, 2008).

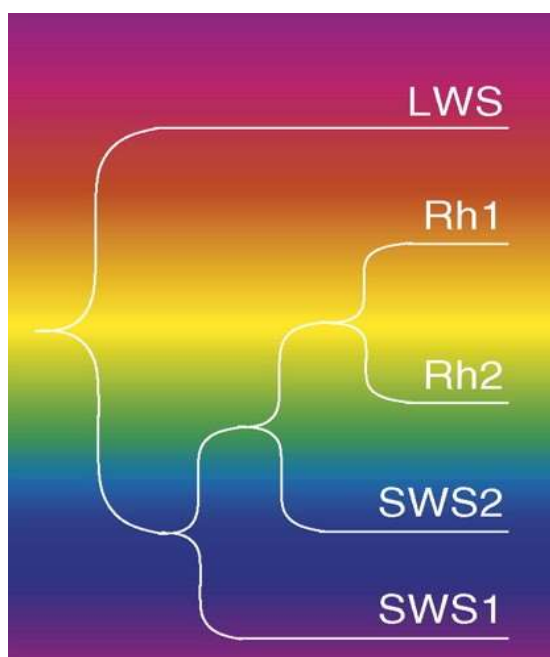


Figura 16: Relações filogenéticas entre as principais linhagens de genes de opsina de vertebrados. Uma série de quatro eventos de duplicação de genes produziu progressivamente os genes de opsina LWS, SWS1, SWS2, Rh2 e Rh1 de vertebrados. A posição de cada ramo no espectro de cores no fundo se aproxima da sensibilidade espectral de cada opsina: LWS (cone vermelho) 510–560 nm; SWS1 (cone UV) 360–430 nm; SWS2 (cone azul) 440–460 nm; Rh2 (cone verde) 470–510 nm; e Rh1 (haste) ~500 nm. Adaptado de Trezise & Collin (2005).

Há ainda um grupo de opsinas não visuais conhecidas como opsinas pineais, que podem ser encontradas em tecidos extraoculares como cérebro, pele, coração, fígado (AVIVI *et al.*, 2004; HUNT *et al.*, 2014).

Vertebrados não mamíferos apresentam uma gama de opsinas visuais (*opn2*; *Rh1*); opsinas sensíveis de baixo comprimento de onda (*opn1lw*; *Lws*); opsinas tipo I sensíveis a comprimentos de onda curtas (*opn1sw1* ; *Sws1*); opsinas tipo II sensíveis a comprimentos de onda curta (*opnsw2* e *Sws2*); Opsinas pineais, também conhecidas como opsinas não visuais (pinopsina: *opnp*, opsina antiga de vertebrados: *opnva*, *parapinopsin*: *opnpp* e *pareietopsin*: *opnpt*); neuropsinas (*opn5*), sendo este o único gene de neuropsina presente em mamíferos, parálogos *opn6*, *opn7* e *opn8*) e subgrupos (*opn5m* e *opn5m2*) pode ser encontrado amplamente em vertebrados de peixes a mamíferos. Além destes, duplicações adicionais foram encontradas em *X. laevis* (*opn6a*, *op6b*, *opn7a* e *opn7b*), também foi identificado fotoisomerase na retina (*rgr*) e homólogo da rodopsina *rrh* (conhecida como peropsina); melanopsinas (*opn4*: conhecido como *opn4m* e *opn4b*: também conhecida como *opn4x*) (Figura 17) (BERTOLESI *et al.*, 2020; BERTOLOSE *et al.*, 2021; BERTOLESI *et al.*, 2022; SATO *et al.*, 2016).

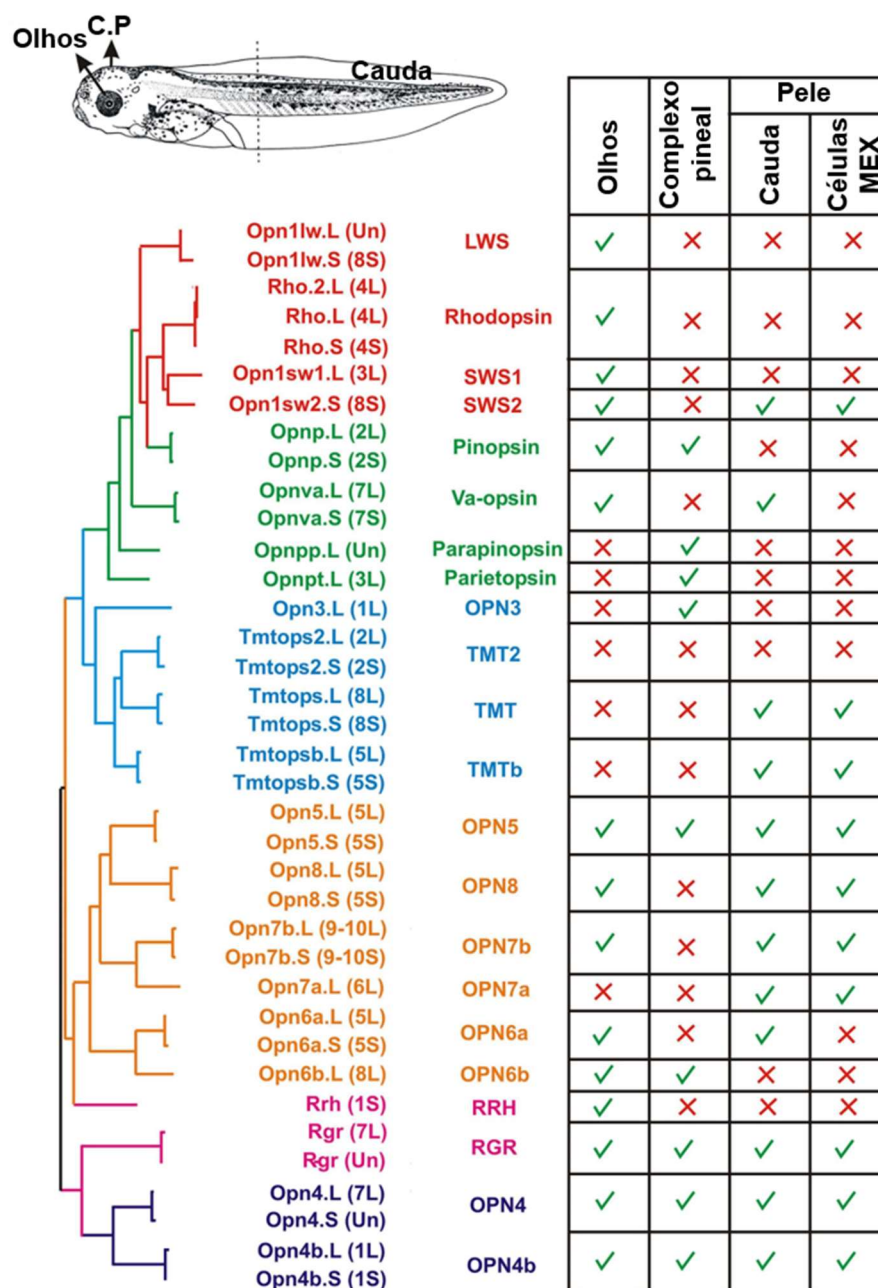


Figura 17. Expressão de opsinas no olho, complexo pineal e pele de larvas de *Xenopus laevis*. As opsinas foram identificadas no genoma de *X. laevis*, no complexo pineal, olhos e cauda. As sequências das opsinas foram comparadas e uma análise filogenética foi realizada pelo método de máxima verossimilhança. As opsinas visuais (vermelho); opsinas pineais (verde); opsinas não visuais (azul); neuropsinas (laranja); fotoisomerases (rosa) e melanopsinas (roxa) podem ser observadas conforme suas respectivas cores. Na tabela, mostra o resumo da expressão de opsinas no olho, no complexo pineal, cauda e células MEX. Adaptado de Bertolesi et al. (2022).

Dentre as opsinas não visuais, a melanopsina (*opn4m*) é a mais explorada até hoje e tem sido implicada no fotoarrastamento do relógio circadiano e na constrição pupilar em mamíferos (ROLLAG *et al.*, 2010). A expressão de *opn5* em olhos, complexo pineal e pele em larvas *Xenopus laevis* também foi caracterizado. Curiosamente a estrutura da retina de *Xenopus* é muito semelhante à encontrada em outros vertebrados, e diferentes opsinas são expressas em diversas camadas do olho dessa espécie (Figura 18) (BERTOLESI *et al.*, 2022).

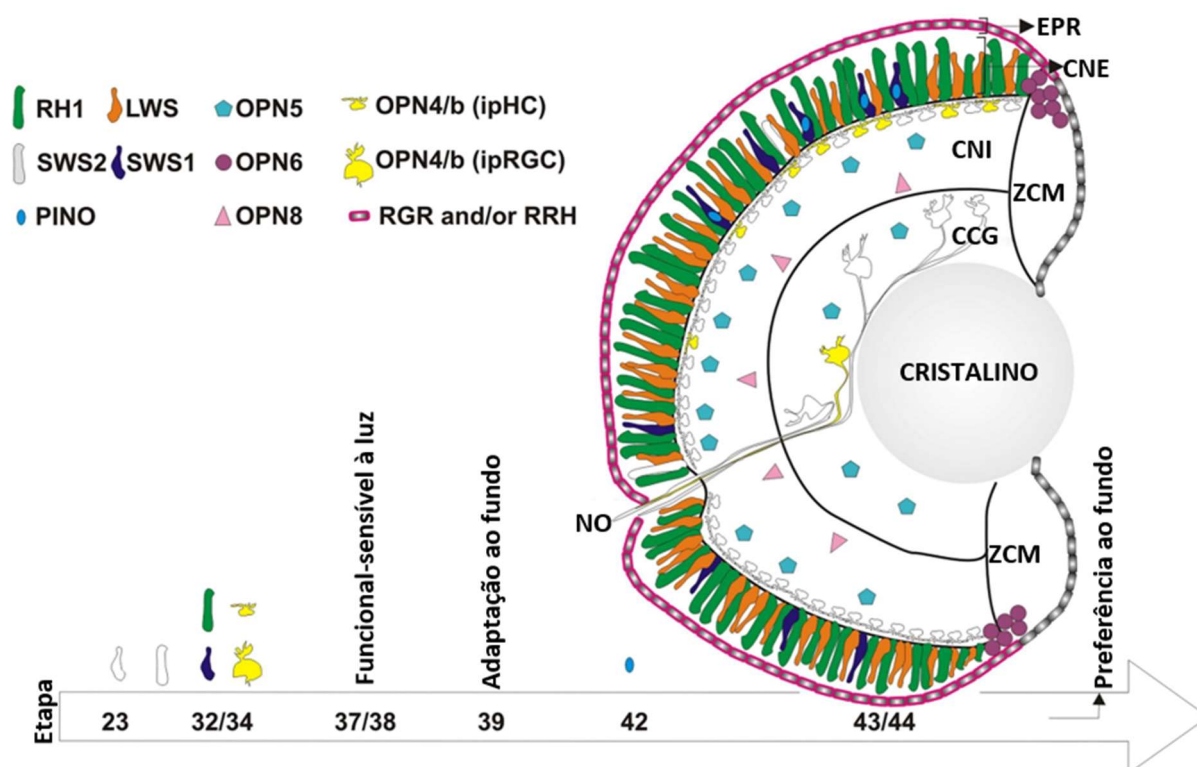


Figura 18: Localização e expressão de opsinas no olho de *Xenopus laevis* em desenvolvimento. Esquema da retina central mostrando a expressão de opsinas em fotorreceptores na CNE em bastonetes (*Rh1*; verde e *Sws2*; branco) e cones (*Lws*; laranja e *Sws1*, azul). A pinopsina (azul claro) é sempre coexpressa dorsalmente com algumas células positivas para *sws1*. A melanopsina (amarelo) é expressa tanto por células horizontais intrinsecamente fotossensíveis (ipHC) localizadas dorsalmente na CNI, quanto por uma população menor na CCG. *Opn5* (magenta) é expresso por células na porção externa da CNI e na CCG, enquanto *Opn8* (rosa) está presente em células da CNI, provavelmente células amácrinas. As células que expressam *Opn6* (roxo) ficam no limite da ZCM proliferativa e da CNE. *Rgr* e *Rrh* (rosa) são expressos pelo EPR, mas excluídos da ZCM. Uma linha do tempo de desenvolvimento é esquematizada com uma seta na parte inferior, com o surgimento da expressão de opsinas ou respostas comportamentais específicas indicadas. Adaptado de Bertolesi et al. (2022).

3.5 Caracterização das opsinas não visuais *parapinopsin* e *opn5* em vertebrados

Análises espectroscópicas indicam que a *parapinopsin* é um pigmento sensível aos raios UV, expressa nas células fotorreceptoras do olho de *Iguana iguana* (WADA et al., 2012). Já a neuropsina (*Opn5*) foi imunolocalizada na retina interna de mamíferos (KOJIMA et al., 2011; YAMASHITA et al., 2014), e nas células ganglionares da retina de camundongos (YAMASHITA et al., 2010; BUHR et al., 2015) bem como nas células da CNI, CCG e CPI (NIETO et al., 2011; BERTOLESI et al., 2022). Vários estudos apontam que essas opsinas podem estar relacionadas a processos de fotoisomerização (KOYANAGI et al., 2015; SATO et al., 2016; CHEN et al., 2001).

O padrão de expressão espacial de *opn5* na retina de *zebrafish* e humanos já foi estudado (DAVIES et al., 2015; TARTTELIN et al., 2003). Em peixes com nadadeiras raiadas (*zebrafish*, medaka e gar manchado) diferentes subtipos de opsinas *opn5m* e *opn5m2* apresentam expressão na retina ventral e dorsal (Figura 19) (SATO et al., 2016). As diferenças

na distribuição espacial de *opn5* podem ter surgido por meio de pressões evolutivas associadas às necessidades visuais terrestres e aquáticas (BADEN *et al.*, 2020).

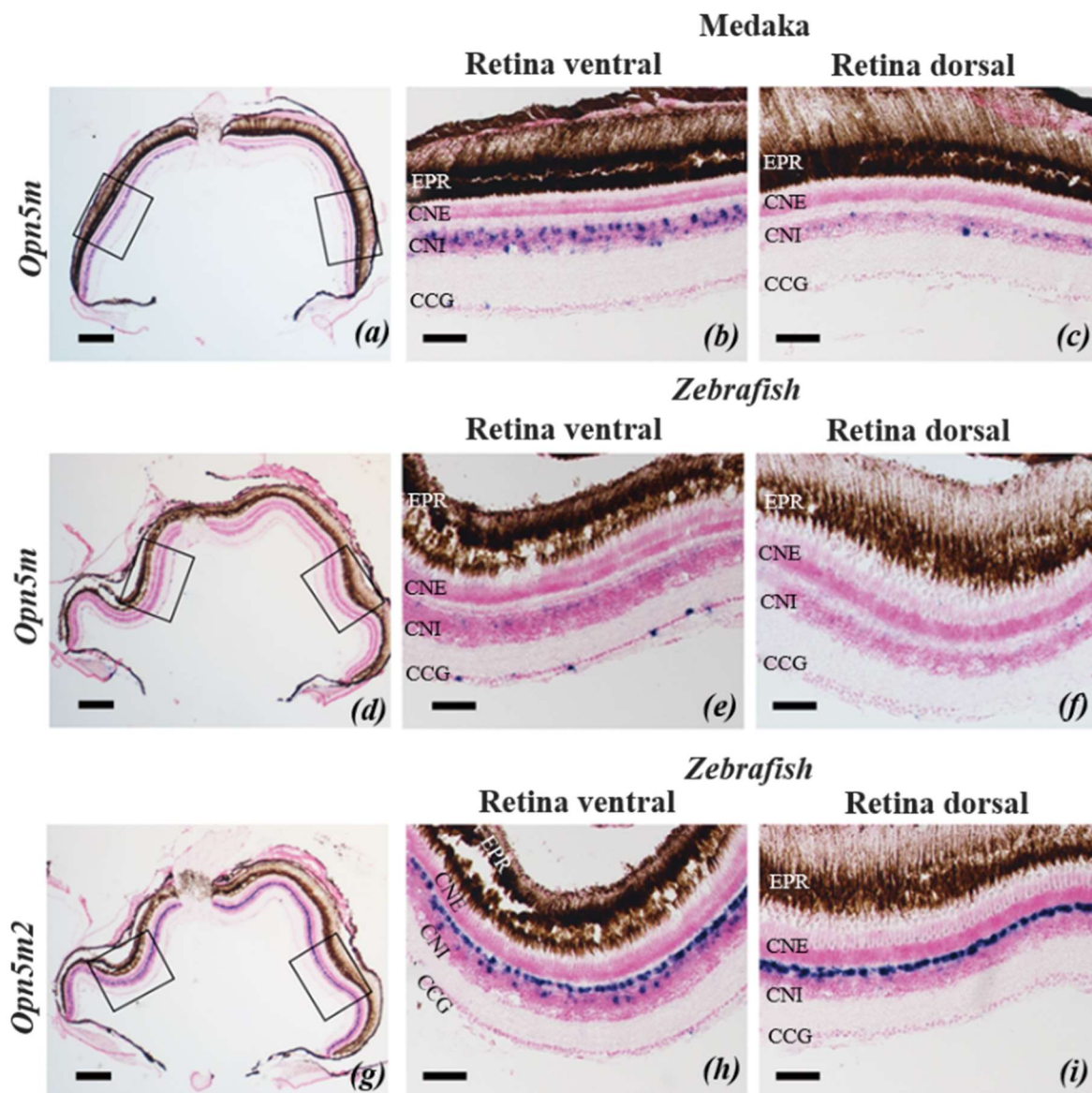


Figura 19: Análise de hibridização *in situ* de *Opn5m* e *Opn5m2* na retina de peixes medaka e zebrafish. (a) Seções frontais de retina de medaka mostram a expressão de *Opn5m*. (b, c) Vistas ampliadas das áreas em caixa, (b) Na retina ventral, *Opn5m* são expressas especificamente nas CNI (c) já na retina dorsal, *Opn5m* são expressas somente na CNI. (d) Seções frontais da retina de zebrafish mostram detecção de *Opn5m*. (E, F) Vistas ampliadas das áreas em caixa, (e) Retina ventral expressa *Opn5m* nas CNI e CCG, (f) Retina dorsal sem marcação. (g) Seções frontais da retina de zebrafish mostram a expressão de *Opn5m2* (h, i) Seções ampliadas das áreas em caixa, nas regiões ventral e dorsal a expressão de *Opn5m2* pode ser visualizada nas células horizontais de ambas as retinas dorsal e ventral. EPR, epitélio pigmentado da retina; CNE, camada nuclear externa; CNI, camada nuclear interna; CCG, camada de células ganglionares. Barra de escala: A, D, G: 200 μ m; B, C, E, F, H, I: 50 μ m. Adaptado de Sato *et al.* (2016).

A sinalização sato, ritmos comportamentais (OTA *et al.*, 2018) e regulação do desenvolvimento de vasos hialóides no olho (NGUYEN *et al.*, 2019). Em mamíferos, a expressão de *opn5* indica que essa neuropsina possa desempenhar alguma função na detecção

de luz. Em contrapartida, a expressão no cérebro parece excluir tal papel, já que a fotorrecepção extraocular não é encontrada em mamíferos (TARTTELIN *et al.*, 2003).

Em cérebros de camundungo a expressão de *opn5* na glândula pineal é semelhante às de opsinas de bastonetes e cones (TARTTELIN *et al.*, 2003). Porém, há relatos que a expressão de *opn5* no olho e no cérebro pode fornecer novas informações sobre os possíveis papéis das opsinas na fotorrecepção interna da retina e/ou vias não dependentes de luz em mamíferos (BUHR *et al.*, 2015). Nesses animais a expressão de *opn5* na retina pode ter uma vantagem seletiva na manutenção da via de sinalização de luz para fotoarrastamento na retina e na via de sinalização de luz para o SNC por razões atualmente desconhecidas (BUHR *et al.*, 2015). Ademais, a expressão de *opn5* na retina também pode desempenhar um papel na fotorrecepção relacionada ao comportamento sazonal em mamíferos (HAZLERIGG & WAGNER, 2006).

Embora sua função exata na retina seja desconhecida, esses fotopigmentos podem cooperar com opsinas clássicas no processo de captura de fótons e regeneração de cromóforos, ou mesmo estar diretamente envolvidos em tarefas que exijam responsividade fóptica precisa (NIETO *et al.*, 2011). Ao contrário da maioria das opsinas visuais, as opsinas não visuais são formadas por pigmentos biestáveis que transitam entre os estados claro e escuro apenas por meio da exposição à luz, em vez de exigir entrada externa para retornar ao estado escuro (KOYANAGI *et al.*, 2014; FUJIYABU *et al.*, 2022).

3.6 Ritmos biológicos e fotoperiodismo em peixes teleósteos

O ciclo circadiano é um mecanismo de temporização fisiológico altamente conservado entre os vertebrados que regula processos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais, ao longo do ciclo de 24 horas do dia (KELLEY & DAVIES, 2016; SINGH & KUMAR, 2018.; ZHENG *et al.*, 2021). Exerce uma profunda influência em várias respostas fisiológicas dos animais, tais como, padrão de sono/vigília, alimentação, atividade das ondas cerebrais, produção de hormônios, entre outras atividades biológicas relacionadas ao ciclo diário (SINGH & KUMAR, 2018). Também regula a transcrição rítmica de milhares de genes de relógio molecular que proporcionam a coordenação de uma ampla gama de processos, incluindo metabolismo, função imunológica e reparo de DNA (PANTAZOPOULOS *et al.*, 2018; LOWREY & TAKAHASHI, 2004).

Em peixes, assim como em outros vertebrados, a maioria dos processos comportamentais e fisiológicos exibem ritmos acionados por relógios moleculares que permitem a esses animais explorar os desafios e oportunidades oferecidos pela natureza

periódica do ambiente (VATINE et al., 2011; LABRECQUE & CERMAKIAN, 2015; PARTCH et al., 2014).

Em contraste, no caso dos peixes, nenhuma relação direta do relógio mestre foi identificada, em vez disso, a retina e a glândula pineal dos peixes, apresentam tecidos com células fotorreceptoras clássicas com semelhanças estruturais e funcionais (ZHDANOVA & REEBS, 2006; COX & TAKAHASHI, 2019; TOYAMA *et al.*, 2009). Além disso, outros tecidos e órgãos, como a glândula pineal, regiões do cérebro profundo, órgãos internos e osciladores periféricos situados na pele (Figura 20) (AVIVI *et al.*, 2004; MURE, 2021).

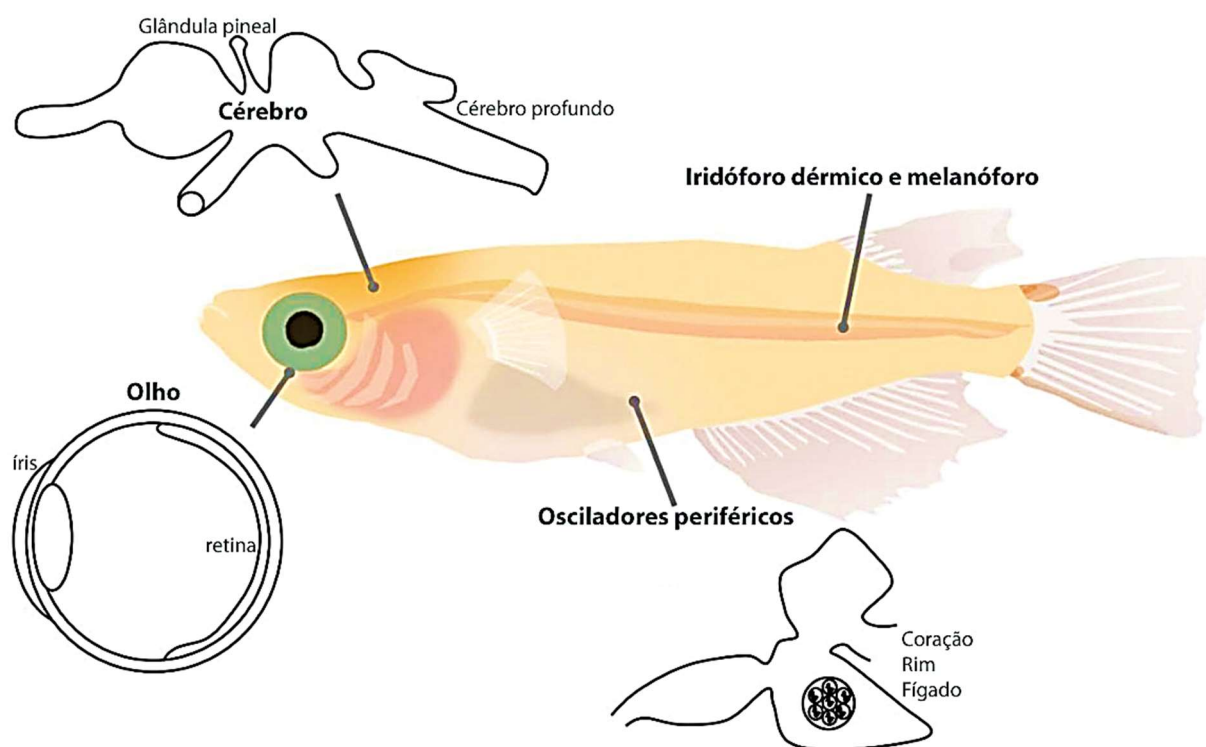


Figura 20. Locais de fotorrecepção em vertebrados. Assim como os fotorreceptores clássicos dentro da retina do olho, a fotorrecepção direta na íris também foi descrita. Em espécies não mamíferas, o complexo pineal também contém fotorreceptores, podendo ocorrer fotorreceptores em regiões bastante internas do cérebro. Adaptado de Borges (2012).

Curiosamente, as oscilações circadianas auto-sustentadas pela expressão gênica e função celular também são encontradas na retina de peixes (CAHILL, 1996; NIE *et al.*, 2018). No caso de *zebrafish*, foi observado que a duração do fotoperíodo altera a expressão de dois genes *melanopsina*, *opn4a* e *opn4.1*, na retina (Figura 21) (MATOS-CRUZ *et al.*, 2011). Além disso, existem evidências de que várias moléculas encontradas em fotorreceptores da retina de vertebrados também foram detectadas nos fotorreceptores pineais de diferentes peixes. Estas são conhecidas como opsinas não visuais, consideradas um fotopigmento circadiano responsável pelo ajuste do relógio biológico (PHILP *et al.*, 2000).

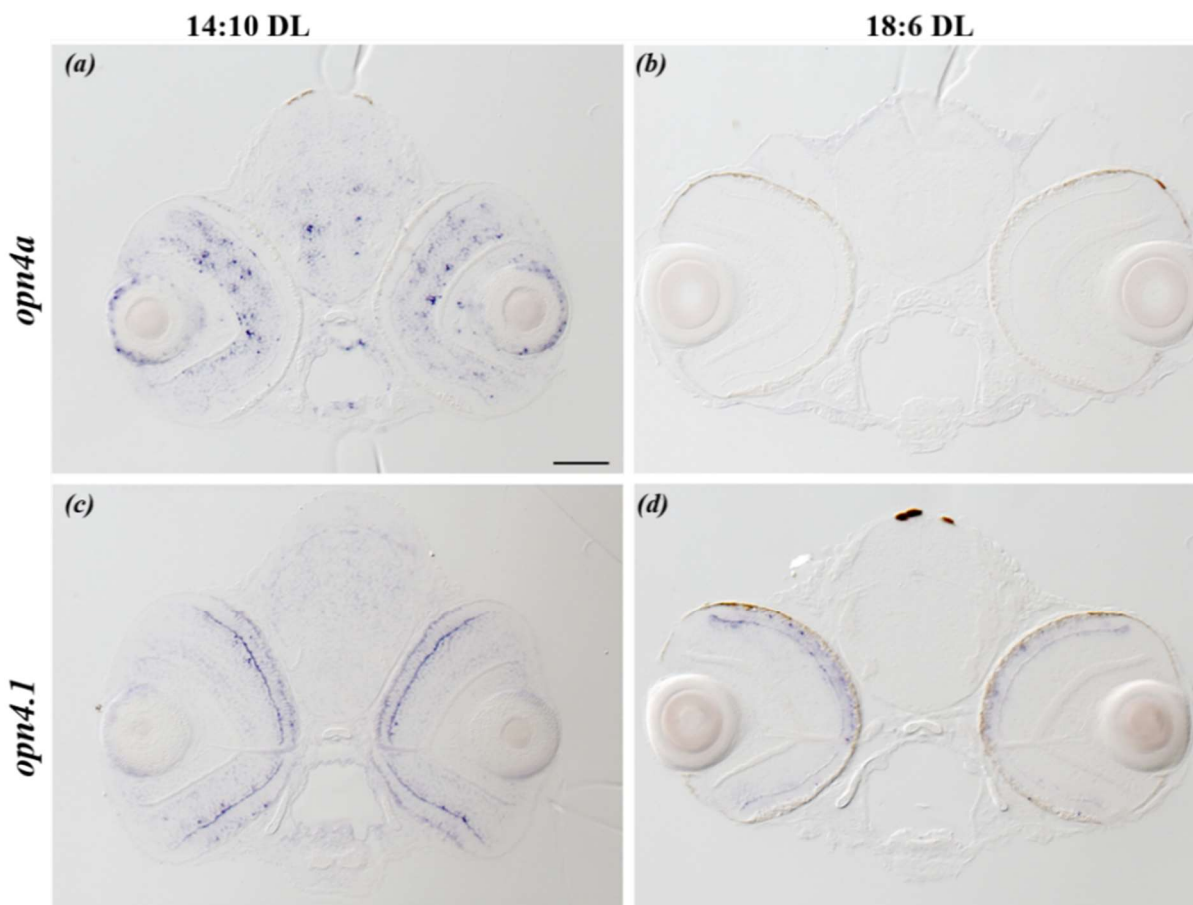


Figura 21. A duração do fotoperíodo influencia a expressão de genes *melanopsinas* (*opn4a* e *opn4.1*). Larvas de *zebrafish* expostas a dias longos (DL). (a, c) 14:10, horas de luz/escuro); (b, c) 18:6, horas de luz/escuro. As larvas mantidas em um ciclo luz/escuro 14:10 apresentaram transcritos em regiões discretas da camada nuclear interna da retina (21a, 21c). A expressão de *opn4.1* foi aumentada nas camadas de células fotorreceptoras (21c). No entanto, *opn4a* e *opn4.1* foram apenas expressos de forma reduzida em larvas mantidas em um ciclo claro/escuro 18:6 (Figuras 21b, 21d). Adaptado de Matos-Cruz et al. (2011).

Estudos com diferentes teleósteos indicaram que os espectros de luz e fotoperíodos também alteram a expressão de opsinas visuais em linguado senegalês (*Solea senegalensis*) durante a ontogenia (FRAU *et al.*, 2020). Um fenômeno semelhante também apresentou influência no crescimento larval, desenvolvimento, sobrevivência e ritmos de eclosão da referida espécie (BLANCO-VIVES *et al.*, 2010; BLANCO-VIVES *et al.* , 2011).

Do mesmo modo, o fotoperíodismo altera o desenvolvimento dos olhos, pigmentação e expressão de opsinas na retina de *Amphilophus astorquii* (KARAGIC *et al.*, 2018). Na espécie *Takifugu alboplumbeus*, a expressão de algumas melanopsinas são reguladas pelo relógio circadiano e podem desempenhar efeitos fisiológicos importantes para a espécie (KITAHASHI *et al.*, 2021). Isto posto, torna-se evidente a influência do fotoperíodo nos ritmos biológicos dos peixes, afetando vários aspectos fisiológicos necessários à sobrevivência (BLANCO-VIVES *et al.*, 2012).

3.7 Mudanças na expressão de opsinas em peixes sob condições variáveis de luz

Compreender a relação entre o ambiente visual e a habilidade visual é uma questão central na ecologia sensorial. Enquanto alguns aspectos da visão dos vertebrados são conservados outros variam significativamente, resultando nas diversas capacidades dos animais em detectar contraste, movimento, detalhes e cor (CRONIN *et al.*, 2014).

Desta forma sistemas visuais em peixes diversificam-se, variando em morfologia, fisiologia e sensibilidade espectral (HUNT *et al.*, 2014; CARLETON *et al.*, 2020). Os fotorreceptores são geralmente ajustados para tarefas visuais específicas e/ou para seu ambiente fótico, de acordo com a profundidade ou cor da água, garantindo o desempenho ideal (CARLETON *et al.*, 2020). Mecanismos evolutivos atuantes nos genes codificadores de opsinas podem influenciar a sensibilidade espectral dos fotorreceptores (LUEHRMANN *et al.*, 2018).

Determinadas espécies podem passar por mudanças ontogenéticas, implicando também na mudança da expressão de opsinas. Essa estratégia permite rápida adaptação a mudanças ambientais (WANG *et al.*, 2021). Mudanças e evolução adaptativa das sequências gênicas de opsinas podem ser observadas nas espécies: *Oncorhynchus mykiss*, que mudam a expressão de opsina de *Sws1* para *Sws2* durante o período juvenil; *Pleuronectes americanus* apresenta apenas *Rh2* expressa na retina pré-metamórfica, enquanto *Rh1*, *Sws2* e *Lws* também são expressos na retina pós-metamórfica (CHENG & FLAMARIQUE, 2007; MADER & CAMERON, 2004).

Dentre as adaptações ópticas interessantes encontradas em espécies de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e em guppies (*Poecilia reticulata*) durante o desenvolvimento, temos que a luz ambiental desempenha um importante fator na modulação e plasticidade fenotípica no sistema visual ao longo de seus desenvolvimentos (HORNSBY *et al.*, 2013; EHLMAN *et al.*, 2015). Certos mecanismos afetam a sensibilidade espectral do pigmento visual, incluindo mudanças no cromóforo ou sequência da opsina. Influenciada por duplicações ou perdas de genes de opsina sua expressão pode alterar-se (YOKOYAMA *et al.*, 2008; CARLETON *et al.*, 2020).

Em peixes teleósteos, os cromóforos A1/A2 do fotorpigmento podem mudar em diferentes fases da vida ou estações do ano como um ajuste da sensibilidade espectral (Figura 22) (TEMPLE *et al.*, 2006). Cerca de um quarto de todas as espécies de vertebrados utilizam o cromóforo A2 durante uma parte de seu ciclo de vida ou sob certas condições ambientais. A

utilização de A₂ representa, portanto, um importante e difundido mecanismo de plasticidade sensorial nos animais (CORBO, 2021).

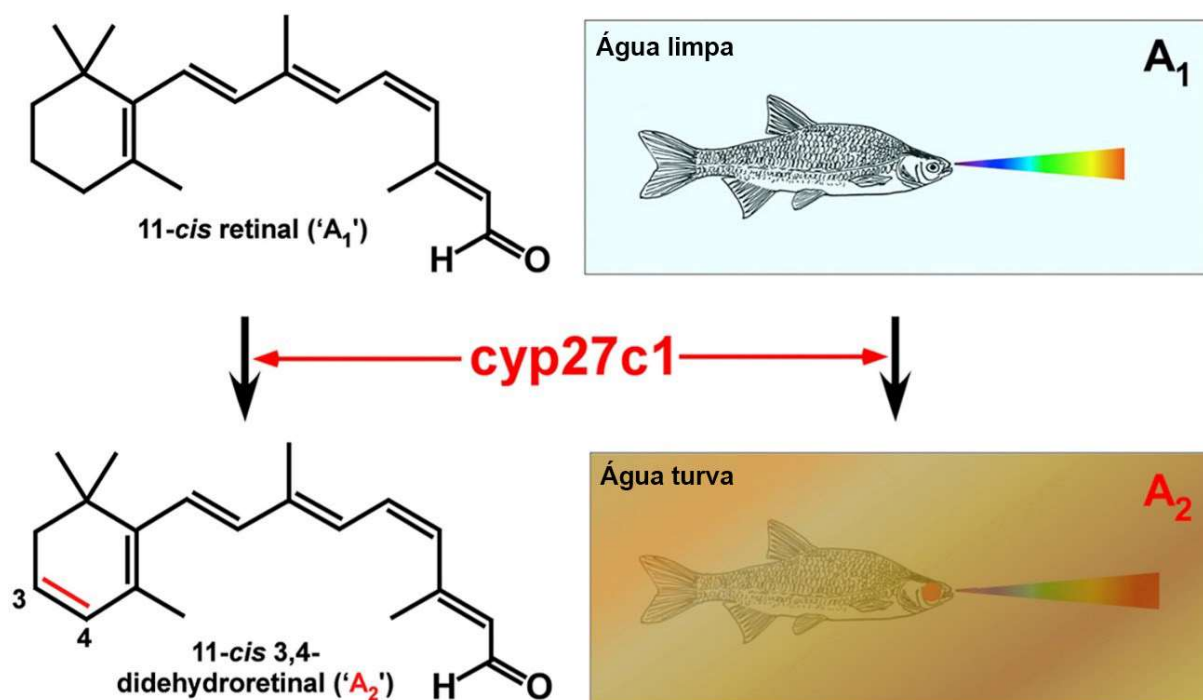


Figura 22: Sistema de troca do cromóforo A₁/A₂ em fotorreceptores de vertebrados. As células fotorreceptoras da retina de vertebrados contêm pigmentos visuais, proteínas de sete transmembranas acoplada à proteína G, a opsina, e um cromóforo 11-cis retinal ('A₁') ou 11- cis 3,4-didesidretinal ('A₂'). A enzima cyp27c1 converte A₁ em A₂ no epitélio pigmentar da retina. A substituição de A₁ por A₂ em um pigmento visual muda a sensibilidade espectral para o vermelho e amplia a banda de absorção às custas da diminuição da fotossensibilidade. O uso de pigmentos visuais à base de vitamina A₂ está fortemente associado à ocupação de habitats aquáticos de águas turvas em que a faixa do espectro de luz corresponde à frequência de onda é desviada para o vermelho. Ao modular a proporção A₁/A₂ na retina, um organismo pode ajustar dinamicamente a sensibilidade espectral do sistema visual para melhor corresponder aos comprimentos de onda predominantes de seu ambiente. Adaptado de Corbo (2021).

As mudanças induzidas pela luz são os principais condutores da diversidade do sistema visual em vertebrados (HUNT *et al.*, 2014). Peixes que se dispersaram e se adaptaram a habitats com profundidades diferentes de seu ambiente original, incluindo lagos e rios de água doce, recifes marinhos e costeiros, zonas pelágicas e mar profundo, adaptaram-se a condições fóticas tão diferentes permitindo ajustes em seus sistemas visuais (LUEHRMANN *et al.*, 2018; CRONIN & DOUGLAS, 2014).

A exemplo disso, peixes ciclídeos que habitam lagos das crateras Apoyo e Xiloá na Nicarágua, possuem um sistema visual com impressionante sensibilidade, apresentando expressão e coexpressão do gene opsina. A sensibilidade visual desses peixes desloca-se para comprimentos de onda mais curtos se comparados com populações ancestrais dos grandes lagos turvos. Tal divergência de sensibilidade é impulsionada por mudanças no uso de cromóforos, expressão diferencial de opsina, coexpressão de opsina e, em menor grau, pela variação da sequência de codificação de opsina (Figura 23) (TORRES-DOWDALL *et al.*, 2017).

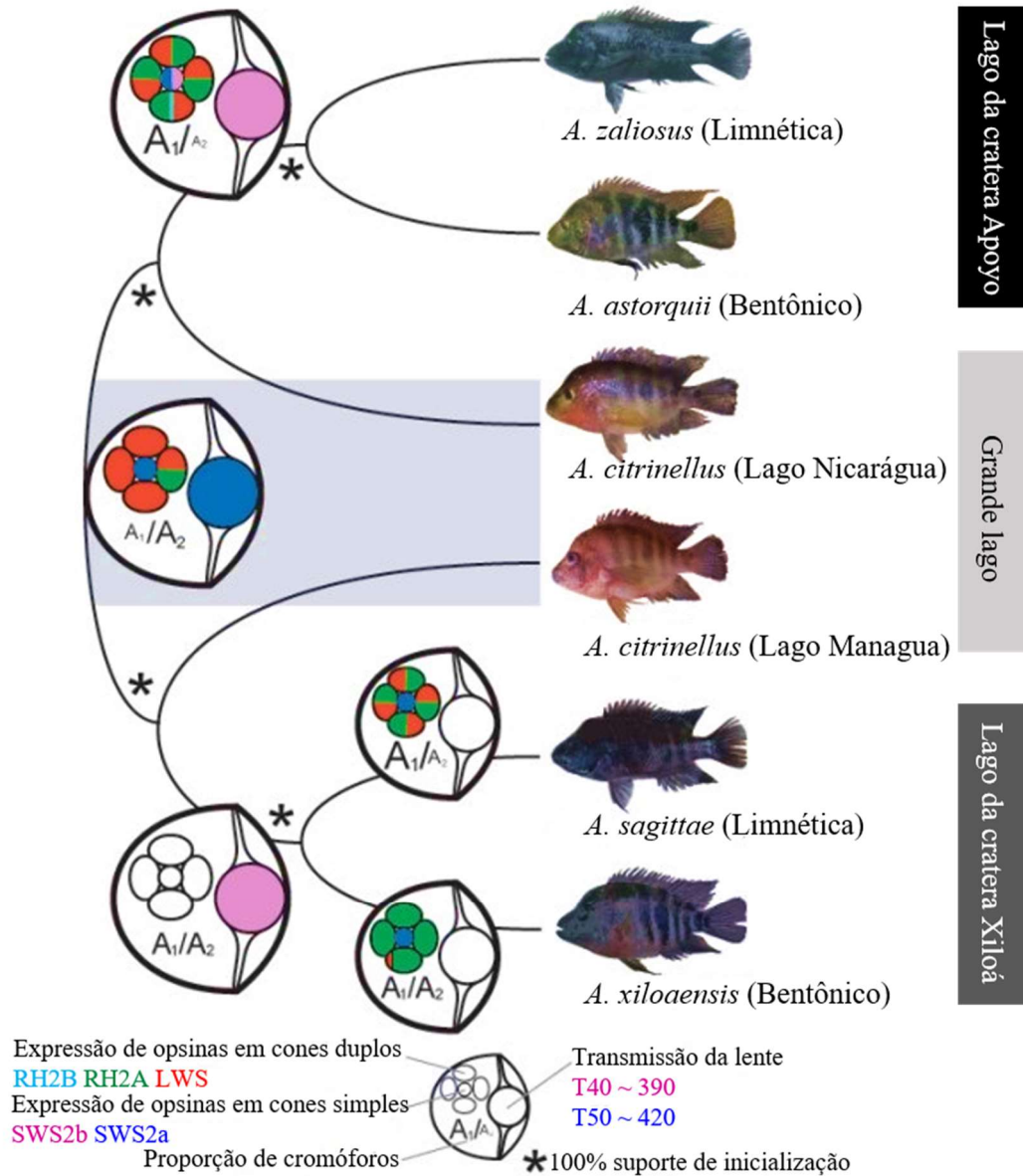


Figura 23. Evolução do sistema visual de ciclídeos Midas. A evolução do sistema visual ocorreu paralelamente nos dois lagos claros de crateras Apoyo e Xiloá após sua colonização nos grandes lagos turvos da Nicarágua e Manágua, respectivamente. Alterações fenotípicas na expressão de opsina, uso de cromóforos e transmitância da lente são vistas nestas espécies. Nos peixes de ambos os lagos da cratera, as lentes tornaram-se mais transmissivas, a expressão de RH2A aumentou e a de LWS diminuiu. Em todas as espécies de lagos da cratera, exceto para *A. xiloaensis*, o uso de cromóforos mudou de A2 para A1. Adaptado de Torres-Dowdall et al. (2017).

Assim, muitas espécies podem modular a sensibilidade espectral em níveis baixos de luminosidade, enquanto outras espécies que vivem em grande profundidade possuem pigmentos visuais deslocados para o espectro de comprimento de onda azul. Em outros casos, espécies que habitam áreas superiores do mar, onde a luz solar durante o dia está acima dos limiares fotópicos possuem mais cones para melhorar a visão diurna (Figura 24) (HOFMANN et al., 2009).

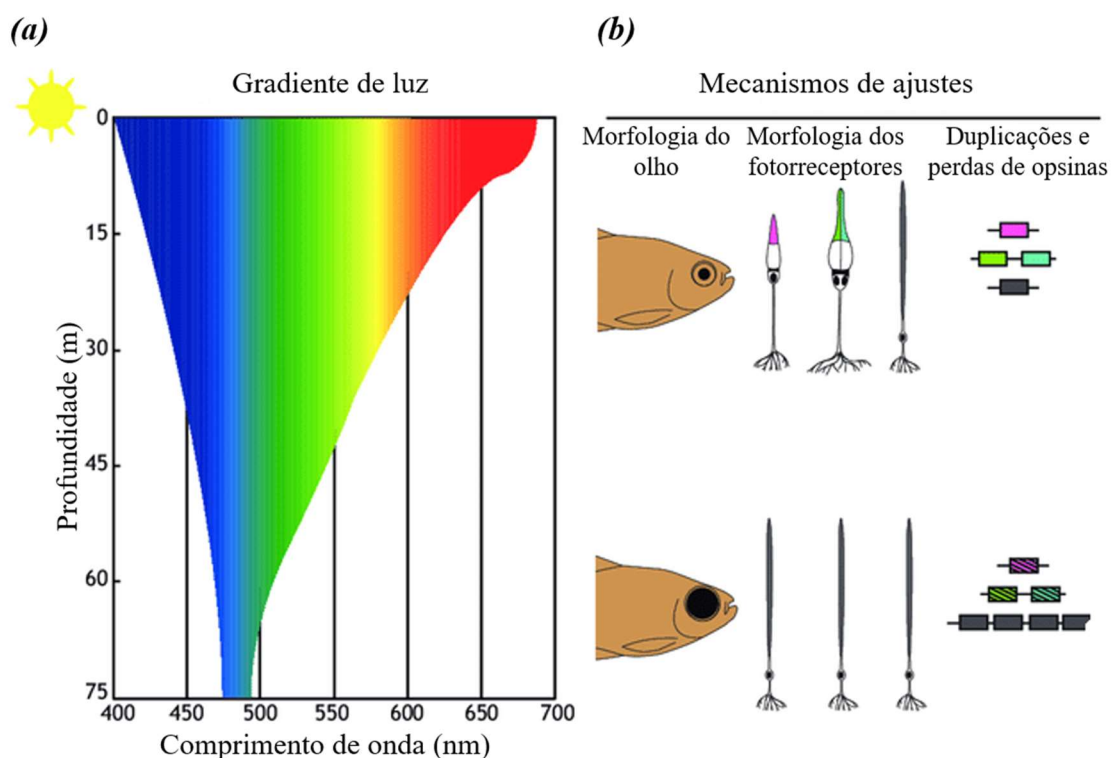


Figura 24: Adaptação do sistema visual de espécies de ambientes de águas rasas a profundas. (a) A adaptação em oceanos profundos e lagos pode ser extrema, pois o espectro de luz diminui em intensidade e o azul muda com a profundidade. (b) Com o aumento da profundidade, os peixes mudam a morfologia de cones e bastonetes da retina. O tamanho dos olhos também pode aumentar à medida que os peixes se adaptam a ambientes escuros. Adaptado de Carleton et al. (2020).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a sensibilidade espectral de bastonetes e cones em peixes. Uma delas postula que mudar a sensibilidade do fotorreceptor em direção ao espectro de luz disponível otimiza a captura de fótons pela retina (LYTHGOE *et al.*, 1994). Outra hipótese afirma que em relação ao espectro da luz de fundo, os valores do comprimento de onda do fotorreceptor variam com o aparecimento de alvos visuais, por exemplo presas (MUNZ & MCFARLAND, 1973). Finalmente, uma terceira hipótese diz que a sensibilidade espectral de bastonetes pode ter comprimento de onda menor em relação ao espectro da luz subaquático (CRONIN *et al.*, 2014).

Portanto, o ajuste das sensibilidades espectrais dos fotorreceptores para tarefas visuais específicas é uma característica de peixes que se dispersaram e se adaptaram a diferentes habitats de pouca ou muita incidência luminosa (LUEHRMANN *et al.*, 2018). Tal ajuste é facilitado por vários mecanismos, incluindo mudanças estruturais, variação no número e distribuição de fotorreceptores, e alterações fisiológicas nos fotopigmentos (BOWMAKER, 2008; BUSSEROLLES *et al.*, 2014; SIEBECK & MARSHALL, 2001; TAYLOR *et al.*, 2015; WAGNER *et al.*, 2005).

3.8 Evolução e desenvolvimento do olho de *Anableps anableps*

Anableps anableps (Linnaeus, 1758) comumente conhecido por seu nome indígena “tralhoto” ou peixe de quatro olhos, é um teleósteo vivíparo considerado um excelente sistema para se estudar inovações morfológicas do seu aparato ocular (Figura 25) (IKEDA *et al.*, 2005).



Figura 25: Vista lateral de *Anableps anableps*. Fonte: <https://www.istockphoto.com/br/fotos/anableps-anableps>.

O gênero *Anableps* inclui três espécies de peixes: *A. anableps*, *A. microlepis* e *A. dowi*, e fazem parte da ordem *Cyprinodontiformes*, da família *Anablepidae*, que são distribuídas em toda região Neotropical, que vai desde o sul do México até o sudeste da América do Sul, incluindo o Delta do Rio Amazonas, Brasil (NOVAES & ANDREATA, 1996).

A. anableps habita estuários, em regiões de águas turvas entre marés, águas costeiras oceânicas, também podendo ser encontrado em águas rasas do litoral, sendo menos frequentes em ambientes marinhos abertos (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Vivem em bandos numerosos e não migram grandes distâncias ficando em ambientes de baixa salinidade (KRUMME *et al.*, 2014; WATANABE *et al.*, 2014). São considerados como uma espécie bioindicadora, principalmente por sua baixa ocorrência em ambientes antropicamente impactados (CAVALCANTE *et al.*, 2012).

Na espécie *A. anableps*, machos e fêmeas são sexualmente dimórficas devido seu modo de fertilização interno e de desenvolvimento direto. Machos apresentam uma nadadeira anal modificada com um gonopódio tubular e fêmeas apresentam um tecido placentário (BURNS, 1991; MEISNER & BURNS, 1997; TURNER, 1950). Por ser um peixe de água salobra e habitar áreas de mangue, *A. anableps* apresenta adaptações que lhe permitem saltar para fora da água e capturar presas, principalmente em bancos de lama (MICHEL *et al.*, 2015). Em colunas de água ou em substratos, alimenta-se de detritos, algas vermelhas, insetos, peixes e caranguejos *Grapsidae* (BRENNER & KRUME, 2007).

Dentre as alterações na morfologia ocular de *A. anableps* quando comparados a olhos de outros peixes, destacam-se duplicações de córnea, retina e pupila (Figura 26a). Indivíduos

dessa espécie possuem olhos com morfologia esférica dividida horizontalmente. A íris é exibida pela metade, criando uma abertura pupilar para a visão aéreo-aquática (SCHWAB *et al.*, 2001).

O cristalino é piriforme e está posicionada de modo que o eixo maior sirva à visão aquática e o eixo menor sirva à visão aérea. Esse arranjo do cristalino ajuda essa espécie a compensar a perda de poder de refração da córnea ventral na água em comparação com a da córnea dorsal no ar (SIVAK, 1976; SWAMYNATHAN *et al.*, 2003). Já a retina dorsal recebe a luz do meio aquático e a retina ventral do ambiente aéreo (Figura 26b) (OWENS *et al.*, 2012).

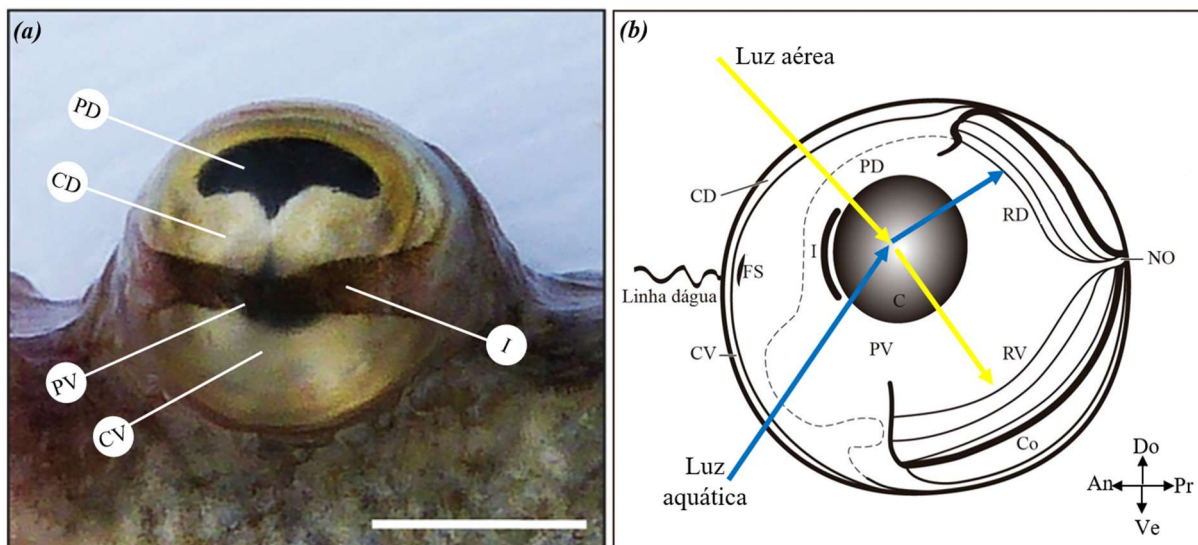


Figura 26: Estrutura ocular de *Anableps anableps* adulto. (A) A morfologia do olho mostra a PD (pupila dorsal); CD (córnea dorsal); PV (pupila ventral); CV (córnea ventral). (B) Esquema da recepção da luz aérea (setas amarelas) e luz do ambiente aquático (setas azuis) no olho de *A. anableps*. EPR (epitélio pigmentado da retina); CNE (camada nuclear externa); CNI (camada nuclear interna); CCG (camada de células ganglionares); NO (nervo óptico); RD (retina dorsal); RV (retina ventral); Co (Coróide); C (cristalino); I (íris); FP (faixa pigmentada); Do (dorsal); Ve (ventral); An (anterior); Pr (proximal). Escala: 0.5 cm (a). Adaptado de Perez *et al.* (2017).

Além dessas alterações, outras inovações morfológicas foram observadas nos olhos de *A. anableps* em relação aos olhos de peixes com visão estritamente aquática. Por exemplo, as córneas dorsal e ventral de larvas e adultos se diferem em espessura, eixo de curvatura e composição de proteínas solúveis em água (Figura 27a, 27b) (SIVAK, 1976; KANUNGO *et al.* 2004). Essa diferença na espessura das córneas dorsal e ventral (Figura 27c, 27e), se dá por conta da concentração de glicogênio que é 15 vezes mais elevado no epitélio corneano dorsal, o que lhe permite uma maior capacidade de retenção de água, o que provavelmente ajuda as células dessa região a resistir à dessecação o que promove uma ação protetora contra radiação UV (SWAMYNATHAN *et al.*, 2003).

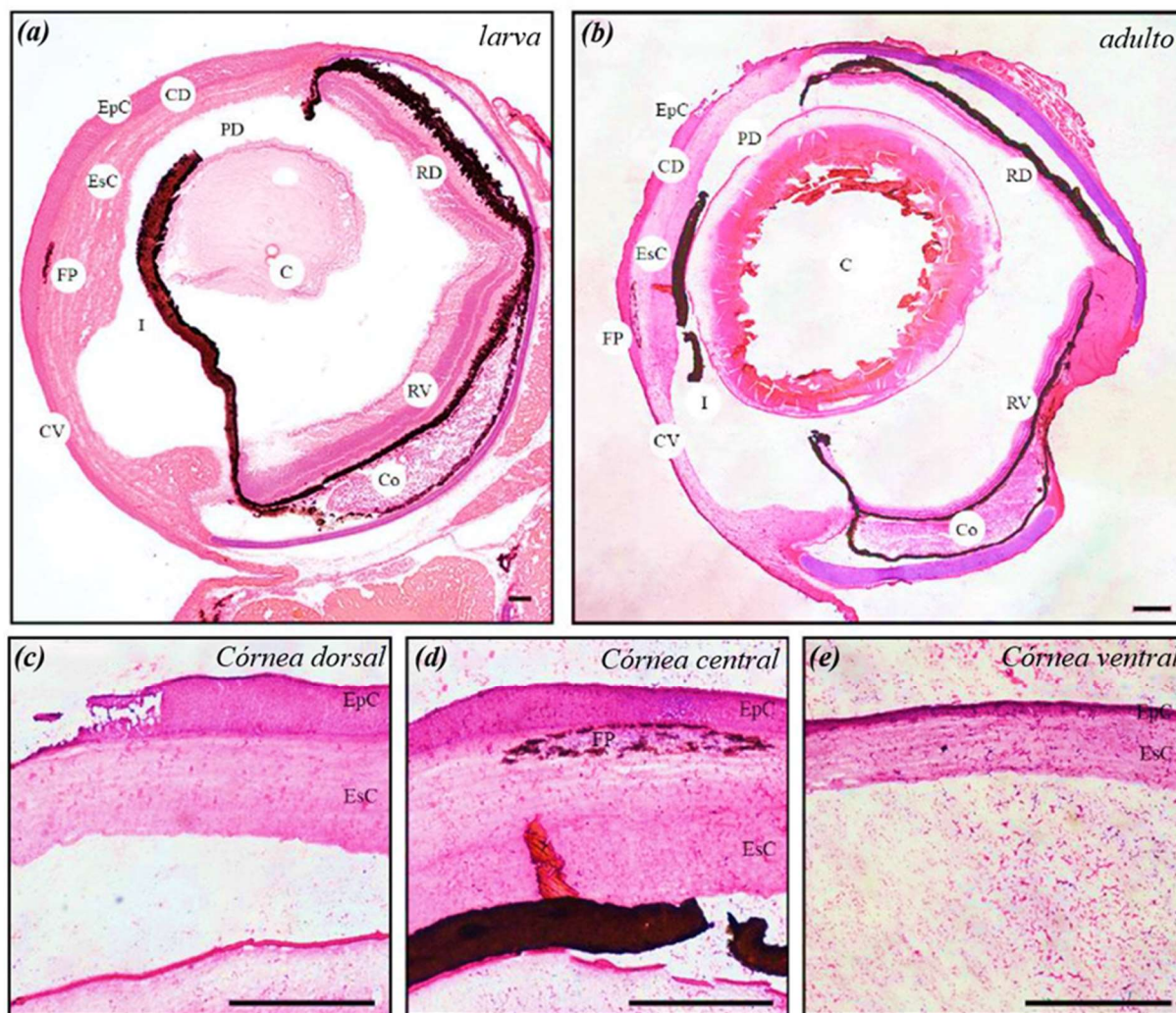


Figura 27: Morfologia interna do olho de *A. anableps*. Coloração por Hematoxilina e Eosina. (a) olho de larva um pouco antes do nascimento (estágio 6). (b) Olho de *A. anableps* adulto. Regiões da córnea de olho do adulto: dorsal (c), central (d) e ventral (e). PD, pupila dorsal; CD, córnea dorsal; EpC, epitélio da córnea; EsC, estroma da córnea; CV, córnea ventral; RD, retina dorsal; RV, retina ventral; Co, Coróide; C, cristalino; I, íris; FP, faixa pigmentada. (A) escala: 200 μ m. Adaptado de Perez et al. (2017); (B-E) escala:0,5 mm; cedido por Maysa Araujo.

Já o estroma é mais espesso somente na região da córnea central, coincidindo com a região da íris que se encontra na região central do olho (Figura 27d). Uma faixa de células pigmentadas (FP) está presente na parte anterior do estroma dividindo as córneas dorsal e ventral. Duas abas horizontais da íris dividem a pupila em uma pupila aérea maior (dorsal) e uma pupila aquática menor (ventral) (SWAMYNATHAN *et al.*, 2003). Todas essas modificações já estão presentes nas larvas antes do nascimento.

O desenvolvimento ocular de *A. anableps* está completo ao nascimento das larvas. Nos estágios iniciais, os olhos são compostos por apenas uma córnea e uma pupila (Figura 28 a-b). Conforme o desenvolvimento larval progride, ocorre o início da constrição da pupila e o aumento da intensificação da pigmentação mediana do olho. Ao fim do desenvolvimento e

pouco antes do nascimento, as larvas já possuem olhos com morfologia similar à de espécimes adultos com duas córneas e duas pupilas (Figura 28) (PEREZ *et al.* 2017).

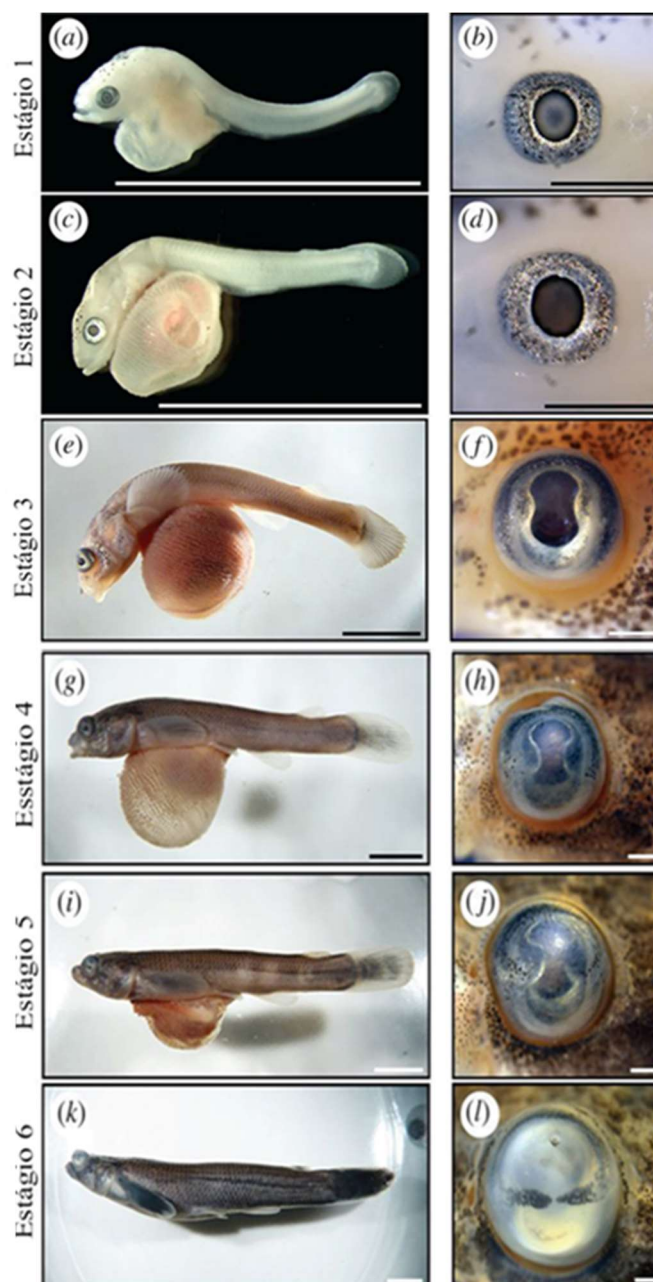


Figura 28: Desenvolvimento ocular em diferentes estágios larvais de *Anableps anableps*. (a,b) Estágio 1; (c,d) Estágio 2; (e,f) Estágio 3, onde ocorre o início da expansão lateral da íris; (g,h) Estágio 4; (i,j) Estágio 5, com pigmentação na região central da córnea; (k,l) Estágio 6, com córnea e pupila duplicadas. Painéis a direita são imagens aproximadas da região ocular em cada estágio. Escalas: 5mm (a-k), 500 μ m (b, d, f, h, j, l). Fonte: Adaptado de Perez et al. (2017).

Quando o desenvolvimento dessa espécie está completo (estágio 6), a retina já se encontra bem organizada com suas respectivas camadas celulares (Figura 29a), porém com diferenças na espessura da CNI em relação a CNE nas porções ventral e dorsal do olho de *A. anableps* (Figura 29b, 29c) (PEREZ *et al.*, 2017).

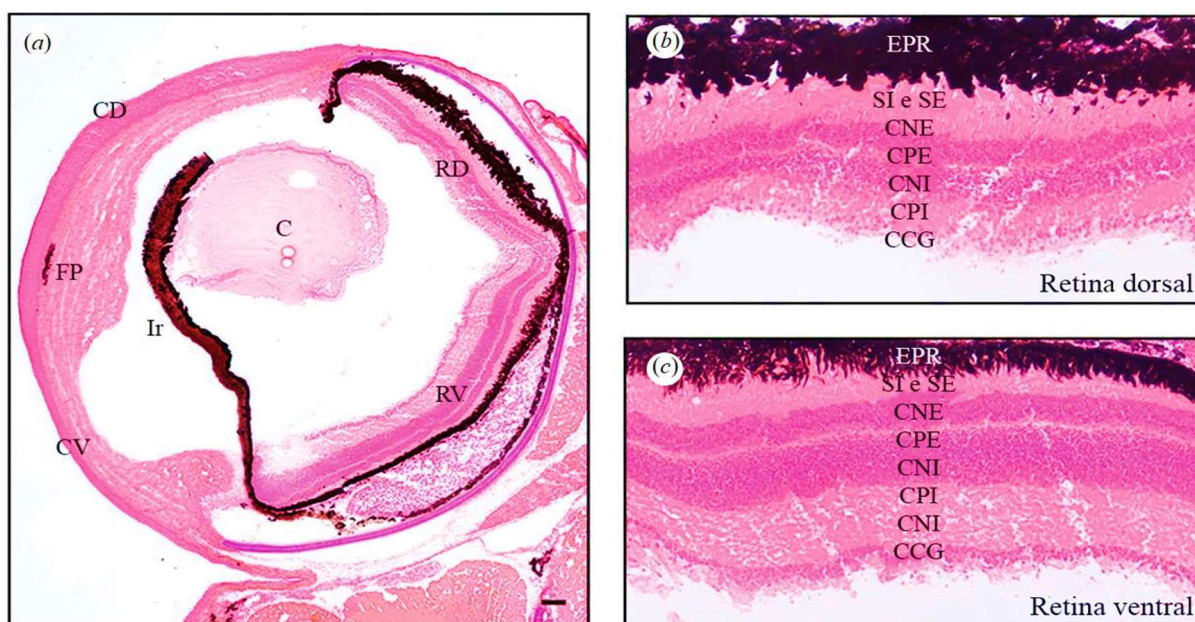


Figura 29: Caracterização morfológica do olho de *Anableps anableps*, coloração por Hematoxilina & Eosina. (a) retina de *A. anableps* no estágio 6. (b) região dorsal da retina (c) região ventral da retina. DR, retina dorsal; VR, retina ventral; FP, faixa pigmentada; C, Cristalino; Ir, íris; CD, córnea dorsal; VC, córnea ventral; EPR, pitélio pigmentado da retina; SI, segmento interno; SE, segmento externo; CNE, camada nuclear externa; CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interno; CPI, camada plexiforme interno; CCG, camada de células ganglionares. Escala: 200 um. Fonte: Adaptado de Perez et al. (2017).

A. anableps possui um repertório de 10 opsinas visuais, sendo elas: *sws1*, *sws2a*, *sws2b*, *rh2-1*, *rh2-2*, *lws*, *s180α*, *s180β*, *s180γ*, *s180δ*, *rh1* expressas ao longo da retina. Em indivíduos adultos, as opsinas visuais *sws2b*, *sws1* e *rh2-2* são expressas ao longo de toda a retina. Entretanto, *rh2-1* tem expressão restrita a porção ventral, e *lws* (sem distinção de subclasses) encontra-se apenas na região dorsal (Figura 30).

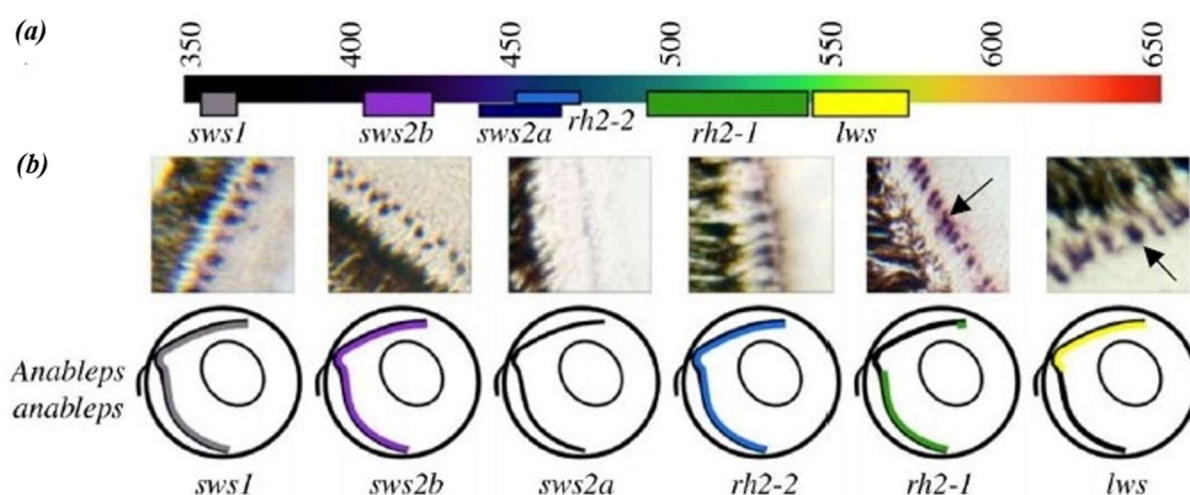


Figura 30: Expressão das opsinas visuais na retina de *Anableps anableps* adulto. (a) Espectro de luz visível de humanos, e comprimentos de ondas. (b, c) Regiões coloridas na retinados diagramas representam o padrão de expressão gênica, com respectivos painéis de seções da retina após hibridização *in situ* com sondas de RNA para cada opsin em (b) *A. anableps*. Setas indicam células marcadas logo abaixo do epitélio pigmentado da retina que expressam *lws* e *rh2-1* em *A. anableps*. Adaptado de Owens et al. (2012).

Em estudos recentes realizados pelo nosso grupo de pesquisa, evidenciaram por hibridização *in situ* e qPCR em larvas de *A. anableps* (estágio 6) a expressão de *rh1*, *rh2-1*, *rh2-2*, *sws2b* e *lws* na retina dorsal e ventral (Figura 31), com *rh2-1* e *lws* exibindo perfil assimétrico independente do contato visual com o meio externo, indicando que a expressão dessas opsinas é geneticamente determinado (PEREZ *et al.*, 2017).

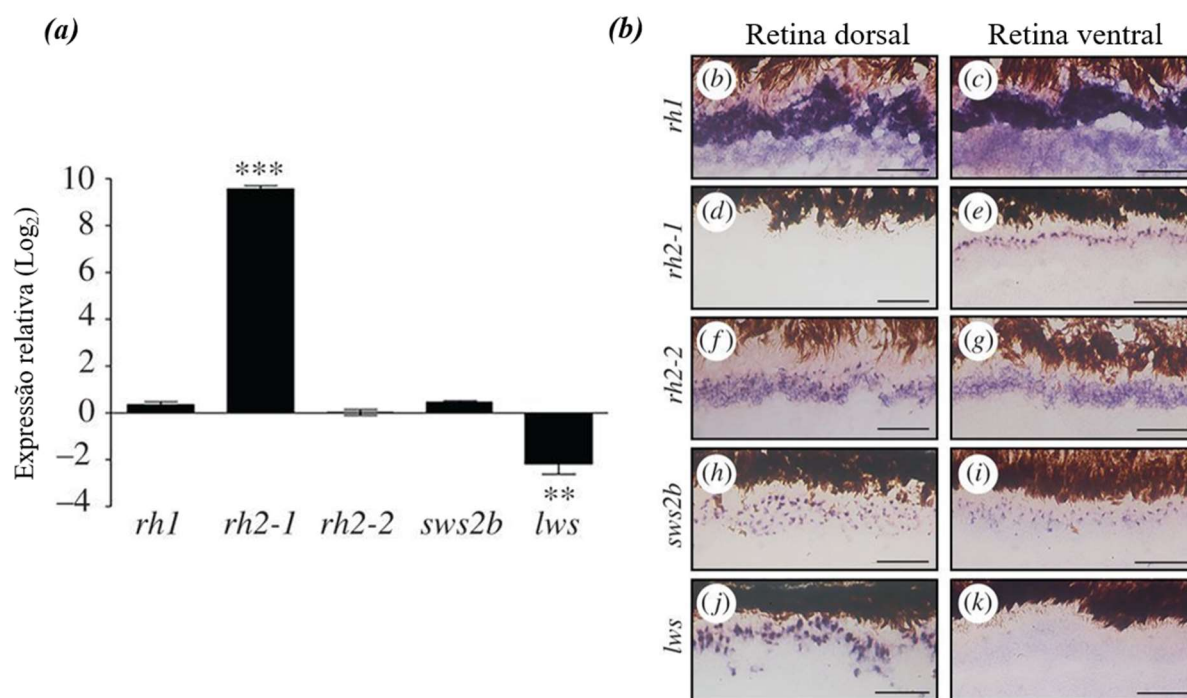


Figura 31. Expressão assimétrica das opsinas visuais na retina de *Anableps anableps* em estágio larval. (a) Análise do padrão de expressão de cinco opsinas visuais na retina ventral, em relação à retina dorsal, conforme determinado por qPCR. Os valores de expressão relativa foram determinados usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. As barras representam a média na escala de $\log_2 \pm$ desvio padrão das réplicas biológicas e técnicas ($n = 9$; três réplicas biológicas e três técnicas). O teste *t* de Student foi utilizado para avaliar a significância estatística entre as amostras (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). (b – k) hibridações *in situ* de opsinas visuais em cortes de olhos de larvas de *A. anableps* (estágio 6): *rh1* (b, c), *rh2-1* (d, e), *rh2-2* (f, g), *sws2b* (h, i) e *lws* (j, k). A coluna da esquerda mostra o padrão de expressão em porções da retina dorsal, bem como a coluna da direita na retina ventral. Barras de escala: 0,05 mm. (l – o). As crioseções têm 20 μm de espessura. Barras de escala: 50 μm (b – k) e 200 μm (l – o). Adaptado do PEREZ *et al.* (2017).

Através da transcriptoma do olho de *A. anableps*, também foi possível identificar um repertório de 20 genes de opsinas não visuais, sendo eles *tmt1b*, *tmt3a*, *tmt3b*, *opn3*, *opn5*, *opn6a1*, *opn6a2*, *opn7b*, *opn7c-d*, *opn8b*, *rrh*, *rgr1*, *Rgr2*, *va-1*, *parapinopsina-2*, *o4pn4m1*, *opn4m2*, *opn4m3*, *opn4x1*, *opnx2*. Sendo estes avaliados posteriormente por hibridização *in situ*, onde mostraram expressão assimétrica especial e temporal dos genes na retina de *A. anableps* (MARILUZ, 2019).

Além destes, também foi verificado por hibridização *in situ* o padrão de expressão de opsinas não visuais *tmt1b*, *opn4m3*, *opn4x1* e *opn4x2* na retina de larvas (Figura 32)

(SALGADO *et al.*, 2022). Neste estudo foi visto que *opn4x1*, *opn4x2* e *tmt1b* são expressos uniformemente na camada nuclear externa (CNE), camada nuclear interna (CNI) e camada de células ganglionares (CCG) nas regiões da retina dorsal e ventral (Figuras 32a-b, 32c-d, 32g-h). A expressão de *opn4m3* não foi detectada por hibridização *in situ* no estágio (Figura 32e-f).

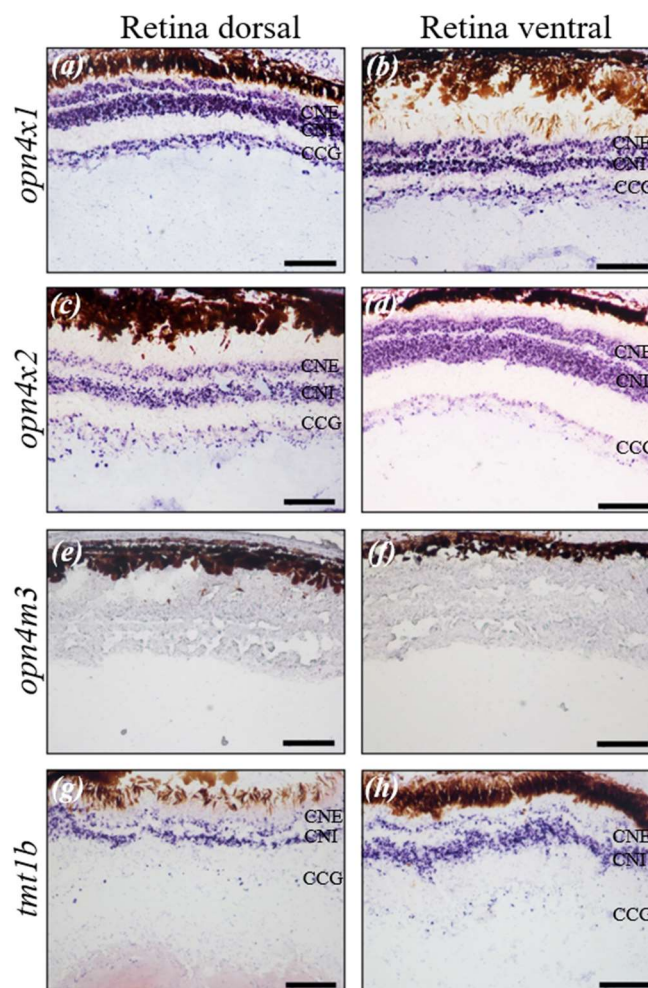


Figura 32: Expressão gênica de opsina não visual na retina larval de *Anableps anableps*. Hibridações *in situ* para o *pn4x1* (a, b), *opn4x2* (c, d), *opn4m3* (e, f) e *tmt1b* (g, h) foram realizadas em olhos de larvas coletadas antes do nascimento. Seções da retina dorsal estão à esquerda e retina ventral à direita. CNE (camada nuclear externa); CNI (camada nuclear interna); GCG (camada de células ganglionares). Barras de escala: 0,05 mm. Adaptado de Salgado et al. (2022).

Esses achados sugerem que *A. anableps* possui um padrão de regulação dos genes de opsinas não visuais, diferente de outros vertebrados aquáticos, o que se presume estar fortemente relacionado a sua estrutura ocular diferenciada, com estruturas duplicadas e adaptadas para receber estímulos de dois ambientes simultaneamente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coletas de espécimes

Para os procedimentos desse trabalho houveram expedições no furo da Ostra, Município de Bragança, Pará, Brasil (Figura 33a). Foram coletados indivíduos juvenis, adultos incluindo fêmeas grávidas de *Anableps anableps* (Tabela 1), utilizando-se de redes de arrasto (40mm x 40mm) (Figura 33b).



Figura 33: Coleta de *Anableps anableps*. (A) Mapa da região de coleta no município de Bragança, ao Norte do estado do Pará/Brasil. (B) Coleta de *A. anableps* sendo realizada com rede de arrasto. Adaptado de Amorim & Costa, (2018).

Os animais foram transportados em água com aeração até o Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Estudos Costeiros-UFPa, (campus Bragança), onde foram processados. A licença de coleta (47206-1 - IBAMA/SISBIO) foi aprovada pelo Comitê de Ética para Pesquisa Animal da Universidade Federal do Pará (número do protocolo: 037-2015).

No total, 52 fêmeas grávidas foram sacrificadas através de procedimento padrão de laboratório para peixes e anfíbios com uso de triclaína dissolvida em água (MS 222, Sigma; 2g/1litro) e as larvas no estágio 2 foram removidas e mantidas em RNAlater (Sigma) ou fixados a 4% paraformaldeído por 24hrs seguido de desidratação. Para a obtenção de larvas foi realizado um corte sagital-ventral nas fêmeas grávidas com a posterior remoção dos ovários. As larvas obtidas foram lavadas em 1x PBS (tampão fosfato-salina) e fixadas em paraformaldeído 4% (PFA) diluído em 1x PBS *overnight* a 4°C. Na sequência, 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 visando a conservação das estruturas teciduais.

Tabela 1- Identificação de espécimes capturados durante a coleta.

Adultos (Fêmeas grávidas)	Larvas (estágio 2)	Juvenil	Total de amostras
25	21	06	52
27	14	05	46

4.2 Processamento das amostras

Amostras de olhos de larvas, juvenil e adulto (conforme as características da tabela 2) para histologia foram removidas e congeladas imediatamente em Tissue-tek O.C.T™ em gelo seco e etanol 100% e armazenadas à -80°. Posteriormente, foram feitas criosecções sagitais das amostras biológicas em Criostato (Leica CM1850) a 20µm em lâminas Colorfrost Plus® (Fisher Scientific). Em seguida, as secções de tecidos foram 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 até serem utilizadas na hibridização *in situ* e imunofluorescência.

Tabela 2: Caracterização dos estágios de desenvolvimento ocular de *Anableps anableps*.

Estágio de desenvolvimento	Características do olho
Estágio 2	Olhos com pigmentação, ausência de divisão das estruturas oculares. Aumento da pigmentação na região dorsal da cabeça.
Juvenil (espécimes nascidos a pouco tempo)	Córneas e pupilas completamente divididas, com presença de faixa pigmentada na região mediana do olho.
Adulto	Córneas e pupilas completamente divididas, com presença de faixa pigmentada na região mediana do olho.

4.3 Transcriptomas dos olhos de *Anableps anableps*

O transcriptoma do olho em desenvolvimento de *A. anableps* (estágios 2, 3 e 4) correspondentes aos períodos pré-duplicação, em duplicação e pós 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 °C para extração de RNA. O RNA total foi obtido utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies) de acordo com o protocolo do fabricante. Estas amostras de RNA dos três estágios (Figura 34) foram utilizadas na confecção de bibliotecas e sequenciamento de RNA (RNA-Seq). O sequenciamento foi realizado através da plataforma Hiseq Illumina. Todas as etapas supracitadas foram realizadas anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, mais detalhes da técnica encontram-se adiante ao longo do texto.

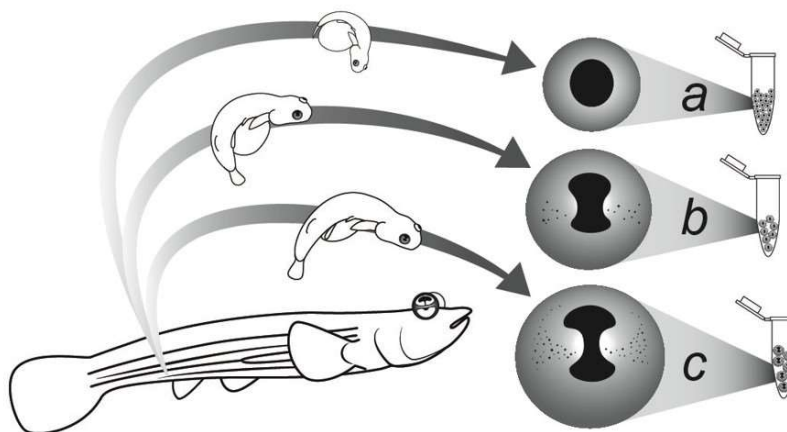


Figura 34: Desenho esquemático da coleta de olhos de *Anableps anableps* sem desenvolvimento para sequenciamento de transcriptomas. (A) a: cabeça de larvas em estágios iniciais do desenvolvimento, antes do início da duplicação de estruturas oculares; b: olhos de larva durante a duplicação de córnea e pupilas, e c: olhos de larvas após esse processo, embora antes do nascimento. (B) Diagrama do padrão de expressão gênica de genes expressos antes (a), durante (b) e depois (c) da duplicação. Fonte: De Lima (2018).

A montagem de supercontigs foi realizada pelo Prof. Dr. Sylvain Darnet (ICB-UFPA) 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). Ao todo, 266.202 transcritos foram identificados e anotados contra o proteoma de Ref-seq de *zebrafish*, e as quantidades de TPM (transcrito por milhão) designadas para cada transcrito em cada um dos três transcriptomas.

As estatísticas de qualidade dos transcriptomas foram realizadas no programa *assembly-stats* (<https://github.com/sanger-pathogens/assembly-stats>) pelo Dr. Marcos Sousa. Transcriptomas de referência foram montados de novo através da ferramenta Trinity (GRABHERR *et al.*, 2011). A anotação foi feita via BlastX no banco de dados de metazoários (ensemble.org) e as análises de expressão diferencial e estatística foram realizadas na plataforma CLC Genomics Workbench (Qiagen) pelo Dr. Marcos Sousa. Valores de TPM e a variação na expressão (*fold change*, FC) foram calculados para a identificação de genes super e subexpressos. Em seguida, uma tabela fornecida pelo Dr. Sylvain Darnet nomeada “*Anableps_blastx_1e3_zebrafish_export_jamilly_read_count_TPM*”, continha para cada transcrito o ID (TSA_Anableps_T+número de ordem), tamanho do transcrito, anotação com base no proteoma de *zebrafish*, valores de fold change e p-value comparativos entre os três transcriptomas, e valores de TPM em cada um dos transcriptomas entre outras informações. O agrupamento em categorias de ontologia gênica (*gene ontology*, GO) foi feito no *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) (HUANG *et al.*, 2009).

4.4 Busca por genes de interesse

A busca por genes de interesse foi anteriormente realizada por nosso grupo de pesquisa. Inicialmente as sequências de genes das opsinas visuais e não visuais no transcriptoma de *Anableps anableps* foram feitas utilizando o tBlastx (ALTSCHUL *et al.*, 1997) com e-value de e-5 (MENG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2012) e representantes ortólogos de *zebrafish* (*Danio rerio*) (número de acesso no GenBank: KT008391:KT008432[pacc]). Posteriormente as sequências obtidas foram analisadas na plataforma TransDecoder 2.1.0 (Find Coding Regions Within Transcripts) e através da análise obtiveram-se as regiões codificantes candidatas.

4.5 Confeção dos iniciadores para PCR

Os iniciadores foram confeccionados com base nas sequências obtidas a partir do transcriptoma para as opsinas visuais (*lws* e *rh2-1*) e não visuais (*opn4x1*, *opn4x2*, *opn4m3*, *tmt1b*, *opn5* e *paranopsina*). As sequências dos iniciadores usados nos experimentos de PCR encontram-se na tabela 3.

Tabela 3: Sequências dos iniciadores usados nos experimentos de PCR.

Gene alvo	Sequência do iniciador (5' - 3')
Rh2-1-F	GCGTGGTTGAACTTGGATCTC
Rh2-1-R	AAAGGTTTTTCAGCGGTTCA
Lws-F	CCAGAAGGCTGAGAGGGAAGT
Lws-R	AGACGCAGTAAGCCAGGATCA
Parapinopsin2-F	GCTTTGTGGGAAGGAGTTGGT
Parapinopsin2-R	GACATAGTCTCCACAGTGGTCGTT
Opn5/Neuropsin-F	CGCCCCACGGAGTTCTTAT
Opn5/Neuropsin-R	GTGAGATGCCTGTTTTCTCTGTT
opn4m3-F	TAATACGACTCACTATAGGCTCGTCTGAGGTGGTTTTAGG
opn4m3-R	ATTTAGGTGACAC TATAGTGTAGGAGCAGGGTGGAGAAG
opn4×1 -F	TAATACGACTCACTATAGCAAAGAAGGCAAC GATGTAGTGA
opn4×1 -R	ATTTAGGTGACACTA TAGACACGGATTCTATCGGCATGT
opn4×2-F	ACACGGATTCTATCGGCATGT
opn4×2-R	ATTTAGGTGACACTATAGGCGACT TCCTCATGGCTTTTC3
tmt1b-F	TAATACGA CTCACTATAGCAGTGGTCGTCGAAAATGG
tmt1b-R	ATTTAGGTGACACTATAGGCGTTCAAAGGG ATTACTGT

A reação em cadeia da polimerase foi realizada utilizando os iniciadores confeccionados para os genes de interesse. Para o restante da solução, foram utilizados 12.5µl da enzima *GoTaq*, 1µl do iniciador “*forward*”, 1µl do iniciador “*reverse*”, 2 µl do cDNA, 8.5 µL de água livre de nucleasse, totalizando 25µl de solução. Para a reação a máquina de PCR foi programada para realizar 35 ciclos.

4.6 Confeccção de sondas para hibridização *in situ*

Foram selecionados 8 genes e suas sequências foram sintetizadas em pBlueScript II SK (+) por BioCat GmbH (Heidelberg, Alemanha). Com promotores T7 e T3 flanqueando cada sequência. Em seguida, foram feitas PCRs com iniciadores M13 (*Reverse*: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' e *Forward*: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') para amplificação dos insertos.

Sondas *antisense* de RNA com sequência complementar aos genes de interesse foram então sintetizadas usando RNA polimerase T7 ou T3 e marcadas com DIG (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 nucleases). As reações foram deixadas por 3 horas em banho-maria à 37°C, em seguida foi adicionado 1µL de turbo DNase e incubado novamente à 37°C por mais 15 minutos. Depois, 30 µL de água livre de nucleases e 30µl de cloreto de lítio foram adicionados e a reação estocada à -20°C por 48 horas. As amostras foram posteriormente centrifugadas à 4°C por 30 min e o *pellet* ressuscitado em 30µl de água livre de endonucleases. A concentração da sonda foi obtida por nanodrop e eletroforese e então mantidas a -80°C até sua utilização na hibridização *in situ*.

4.7 Hibridização *in situ*: larvas e juvenil

Os experimentos de hibridização *in situ* foram realizados de acordo com protocolo padrão (De Lima *et al.*, 2015) com modificações. Brevemente, criosecções da cabeça de *A. anableps* (20 µm) foram acetiladas por 10 min em solução de 0.33% anidrido acético em água tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato), lavadas por duas vezes com 2x SSPE e desidratadas em 70%, 95% e 100% etanol livre de RNase. Cada lâmina foi então hibridizada com uma solução (32 µl) contendo 50% formamida, 2x SSPE, 1 µg/µl BSA, 1 µg/µl poly-A em água tratada com DEPC, e 1 µl de sonda marcada com DIG. As lâminas foram cobertas com lamínulas, seladas através de imersão em óleo mineral e incubadas até o dia seguinte à 65°C. As seções foram lavadas em clorofórmio por três vezes, 2 minutos

em cada vez, e brevemente em 2x SSPE para a remoção das lamínulas. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em série por 1 hr e 10 min à 65°C em 2x SSPE contendo 50% formamida, e duas vezes em 0.1x SSPE por 30 min à 65°C. As lâminas foram lavadas brevemente em TNT (TN: 100mM Tris, pH 7.5; 150mM NaCl/TNT: TN + 0.3% Triton-X 100), cada tecido foi contornado usando pap pen (Life-Invitrogen) e tamponado por 30 min à temperatura ambiente em 200 µL de tampão TNB (200ul TNB/slide, 1% leite desnatado). Em seguida, as lâminas foram incubadas até o dia seguinte em TNB com anticorpo anti-DIG contendo uma fosfatase alcalina conjugada (TNB + 0,3% leite desnatado + anti-DIG-AP; 1:600 dil.). Depois, as lâminas foram submetidas a duas lavagens de 15 min cada em TMN (100mM Tris, pH 9.5; 150mM NaCl, 0.05M MgCl₂), e incubados por 1–3 dias em solução de detecção contendo os substratos para fosfatase alcalina: *Nitro-Blue Tetrazolium Chloride* (NBT) e *5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-phosphate p-Toluidine Salt* (BCIP), em solução de TMN com 1:1 proporção cromógena. Por fim, as lâminas foram deixadas de um dia para outro em água destilada para remoção dos sais, os tecidos fixados em 4% paraformaldeído, lavados duas vezes em água destilada, e cobertos com lamínulas usando meio de montagem (Cytoseal). Os cortes foram fotografados usando microscópio Nikon SMZ1500, com aproximação de 20x, e as imagens processadas no programa NIS-Elements D 4.10.01.

4.8 Experimento de exposição à luz

Foram usados neste experimento oito peixes juvenis obtidos a partir de coletas realizadas em Bragança, Pará, Brasil. Os espécimes foram mantidos em aquários individuais de vidro de 45L (com dimensões de 50cm x 30cm x 30cm - comprimento x altura x largura) com água limpa e expostos a um ciclo diurno e noturno de 12 horas por 30 dias seguido de eutanásia, segundo o protocolo previamente modificado de Fuller (2011). Os animais foram alimentados com ração de peixe e a troca de água dos aquários foi realizada diariamente, alternando a troca parcial (70%) e troca total (100%) em dias consecutivos. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Evolução e Desenvolvimento da Universidade Federal do Pará, Campus Belém-PA, de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPA.

Para identificar se o padrão de expressão assimétrico de algumas das opsinas visuais e não visuais de *A. anableps* pôde ser alterado após o nascimento, foram realizadas hibridizações *in situ*, seguindo protocolo previamente descrito, para detecção da expressão

dos genes *rh2-1* e *lws* (opsinas visuais) e *opn4x1*, *opn4x2*, *opn4m3* e *tmt1b* (opsinas não visuais).

4.9 Imunofluorescência

A imunofluorescência foi realizada em secções de olhos de larvas (estágio 2) e adultos de *A. anableps* de acordo com o protocolo do fabricante (Sigma-Aldrich, cat: B8434), com adaptações.

Para a imunolocalização de pLamina A/C e Gama-cristalina, as secções foram lavadas em PBS 1X (0,01 M) por 30 minutos, permeabilizadas em 2N HCl a 37°C por 30 minutos e lavadas em tampão de borato 0,1 M e em PBS 1X. Após foram incubadas em Tripsina 0,1% a 37°C por 20 minutos, seguidas de lavagem em PBS + 0,1% TWEEN 20. A marcação inespecífica foi bloqueada com 5% de soro normal de ovelha diluído em diluente (PBS 1X contendo 1% BSA e 0,5% TWEEN® 20) durante 30 minutos à temperatura ambiente. As secções então foram incubadas com anticorpo primário (Tabela 4) em diluente durante a noite à 4°C.

No dia seguinte, as secções foram lavadas em PBS 1X e incubadas em solução contendo o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Alexa 488A (1:200, ThermoFisher Scientific, A-11001) diluído em PBS 1X durante 1 hora em temperatura ambiente. Foi feita nova lavagem das secções em PBS 1X e então incubadas em solução contendo DAPI (1:200) diluído em PBS 1X. Por fim as secções foram lavadas em PBS 1X e foram montadas com Fluormount com DAPI (ThermoFisher Scientific). As lâminas foram fotografadas em microscópio óptico confocal Zeiss LSM710, software de análise Zen Black.

Tabela 4: Anticorpos primários utilizados nas imunofluorescências, N°. de catálogo e concentração utilizada.

Anticorpo	Empresa/número de catálogo	Concentração
pLamina A/C s382	Abcam Cat. No. Ab58528	1:100
Gamma-cristalina	Doação	1:50

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão de Lamin A/C participa do desenvolvimento ocular de *Anableps anableps*

Para analisar o padrão de expressão de Lamin A/C durante o desenvolvimento ocular de *A. anableps*, utilizamos a técnica de imunofluorescência com anticorpo anti-Lamin A/C em cortes histológicos do olho de *A. anableps* em desenvolvimento (estágio 2). Em verde é possível observar a imunoincorporação de Lamin A/C na região perinuclear das células da córnea, especificamente no epitélio da córnea e estroma da córnea, já os núcleos celulares são mostrados em azul (DAPI) (Figura 35).

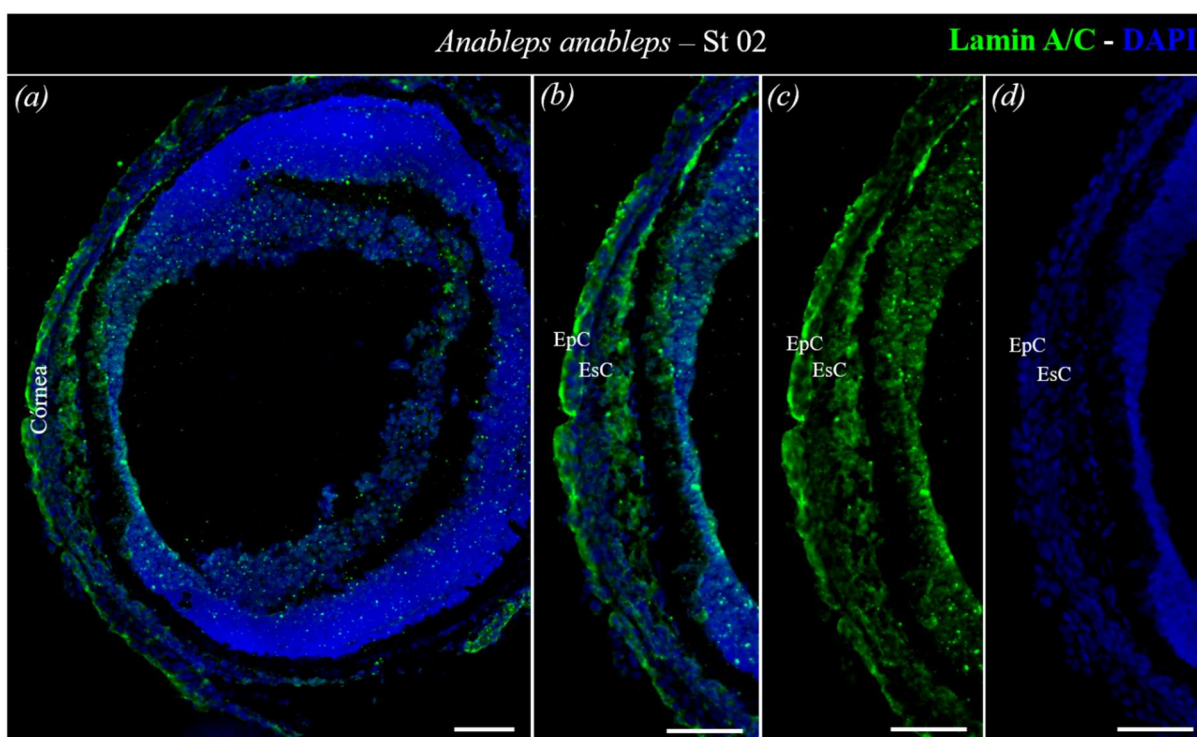


Figura 35: Imunofluorescência para o anticorpo Anti-Lamin A/C em larvas de *A. anableps*. Corte transversal do olho em desenvolvimento de *Anableps anableps* (estágio 2). Regiões de marcação nuclear e perinuclear de células da córnea dorsal (CD) e córnea ventral (CV) mostrada em verde; núcleos celulares mostrados em azul (DAPI). Escala: Panorâmicas (a-h) 50 μ m.

Descobrimos que o marcador de envelope nuclear, Lamin A/C, está presente em várias células do olho em desenvolvimento de *A. anableps*, principalmente nas células da córnea nas regiões do epitélio da córnea e estroma da córnea (Figura 35a, 35c). A expressão dessa proteína é regulada pelo desenvolvimento embrionário, pois é considerada essencial em vários processos vitais nas células, como migração, homeostase, crescimento e diferenciação (IYER, 2021; MARTINO *et al.*, 2018; DONNALOJA *et al.*, 2020).

A córnea de peixes se desenvolve rapidamente durante a embriogênese, de modo que as etapas subsequentes da diferenciação da córnea, como o espessamento do estroma, ocorrem de forma relativamente lenta. Nessa etapa, vários polipeptídeos são altamente enriquecidos no epitélio ou no estroma da córnea e são excelentes marcadores da diferenciação desse tecido

(ZHAO *et al.*, 2006). Assim, nossas descobertas indicam que a expressão de Lamin A/C nessa etapa do desenvolvimento de *A. anableps* possa ter participação direta na proliferação e diferenciação celular necessária em todas as etapas da formação do olho, bem como laminas do tipo A são expressas durante desenvolvimento embrionário em peixes e *xenopus* (HOFEMEISTER *et al.*, 2002; LOURIM *et al.*, 1996; TSAI *et al.*, 2006). Esses achados corroboram com o estudo realizado por Koshimizu e colaboradores (2011) que mostram que a Lamin A/C é expressa em múltiplos tecidos durante a desenvolvimento embrionário de *zebrafish*. De modo similar, a expressão dessa proteína também foi observada em células diferenciadas como a retina de *zebrafish* e camundongos em desenvolvimento (YANAKIEVA *et al.*, 2019; AMINI *et al.*, 2022; RAZAFSKY *et al.*, 2013).

Além de participar do desenvolvimento embrionário, Lamin A/C também é expressa no olho *Anableps anableps* adulto (Figura 36). Nossos achados mostram a imunolocalização de Lamin A/C em células da córnea dorsal e ventral, especificamente no epitélio e no estroma da córnea (Figura 36a-e). Em verde é possível observar a incorporação de Lamin A/C nas bordas nucleares e no nucleoplasma das células do epitélio da córnea e no estroma das córneas ventral e dorsal (Figura 36c-g).

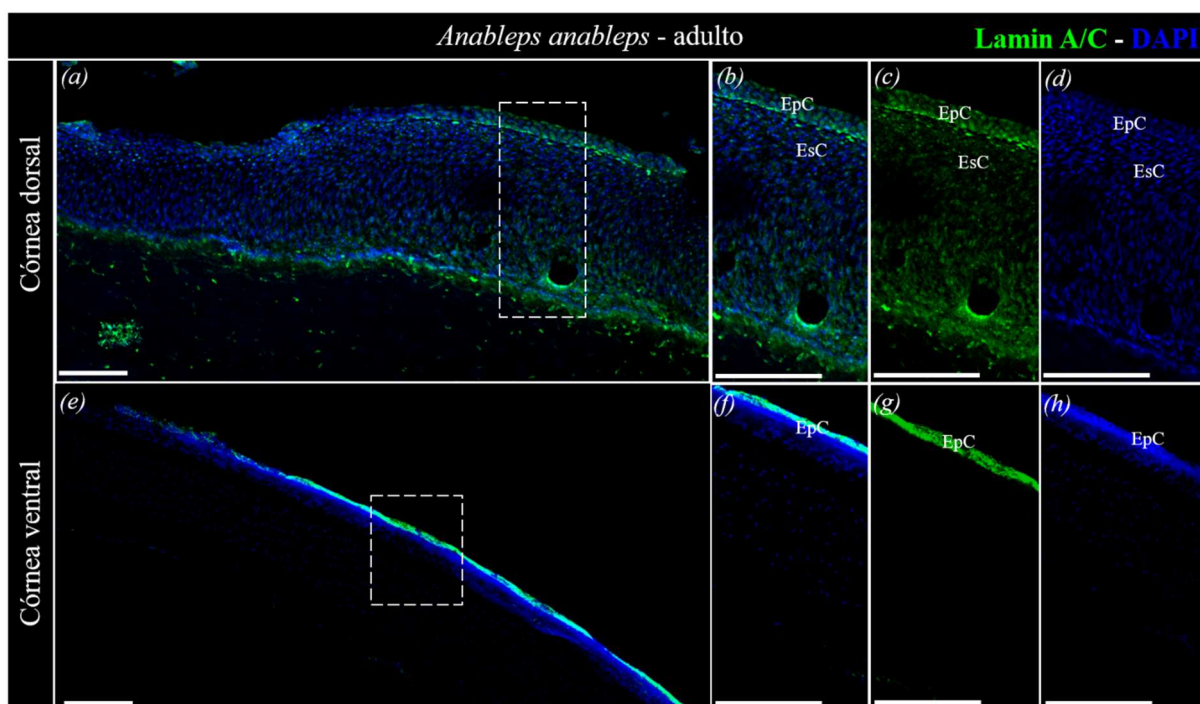


Figura 36: Imunofluorescência para o anticorpo Anti-Lamin A/C em *Anableps anableps* adulto. Foi observada a marcação nuclear e perinuclear no epitélio da córnea (Epc) e no estroma da córnea (Esc) das regiões da córnea dorsal e ventral. Imunocorporação de Lamin A/C mostrada em verde; núcleos celulares mostrados em azul (DAPI). Corte transversal do olho adulto realizados a 20 μm . Quadrados tracejados brancos mostram a região em maior aproximação nas figuras de a-e. Escala: Panorâmicas (a-h) 200 μm .

O fato de haver marcação de Lamin A/C no nucleoplasma pode ser indício da funcionalidade das lamínas na participação da manutenção das propriedades mecânicas da célula (DECHAT *et al.*, 2008). Apesar de serem distribuídas em menores concentrações, as mesmas formam estruturas estáveis dentro do nucleoplasma (MOIR *et al.*, 2000). Outros estudos realizados com *zebrafish* adulto mostram que Lamin A/C também pode ser expressa no envelope nuclear (KOSHIMIZU *et al.*, 2011), o que é bastante semelhante ao padrão de expressão encontrado nas células das córnea dorsal e ventral de *A. anableps*.

Nossos resultados mostram ainda que Lamin A/C também é expressa no epitélio da córnea, assim como em outros peixes e vertebrados (JOSEPH *et al.*, 2011), o que indica que essas proteínas são altamente conservadas entre as espécies (KOSHIMIZU *et al.* 2011). Adicionalmente, alguns estudos mostram que diferentes tipos de tecidos epiteliais expressam níveis elevados de Lamin A/C por conta da proliferação celular e modulação da tensão celular decorrente das junções célula-célula (CHENG *et al.*, 2021; IYER, 2021; BUXBOIM, 2017). Isso sugere que a expressão de Lamin A/C em células do epitélio da córnea pode ter relação com os achados acima, visto que as células dessa região apresentam uma grande taxa proliferativa devido a renovação constante deste tecido (SIMMICH *et al.*, 2012; IKKALA *et al.*, 2021; SECKER & DANIELS, 2008). Vários processos fisiológicos importantes são associados às lamínas, como a regulação da estrutura nuclear, sinalização celular, transcrição gênica e diferenciação celular (SAEZ *et al.*, 2020). Porém, para vertebrados não-modelo, como o caso de *A. anableps*, as informações sobre a expressão de Lamin A/C são completamente ausentes, necessitando de estudos adicionais para ajudar a compreensão da expressão dessa proteína na córnea de peixes para nortear futuros estudos a esse respeito.

As opsinas não visuais *parapinopsin* e *opn5* apresentam expressão gênica simétrica na retina de *Anableps anableps* durante o estágio larval.

Foram feitas análises de hibridização *in situ* para os genes *parapinopsin* e *opn5* em olhos de larvas (estágio 2) (Figura 37 a-c). Observamos que para *parapinopsin* o padrão de expressão gênico é simétrico entre a retina dorsal e ventral, havendo expressão nas camadas CNE, CNI e CCG (Figura 37a-b). Já para o gene *opn5*, o padrão de expressão também é simétrico ao longo da retina, sendo possível identificar células que expressam esse gene nas camadas CNE, CNI e CCG (Figura 37c-d).

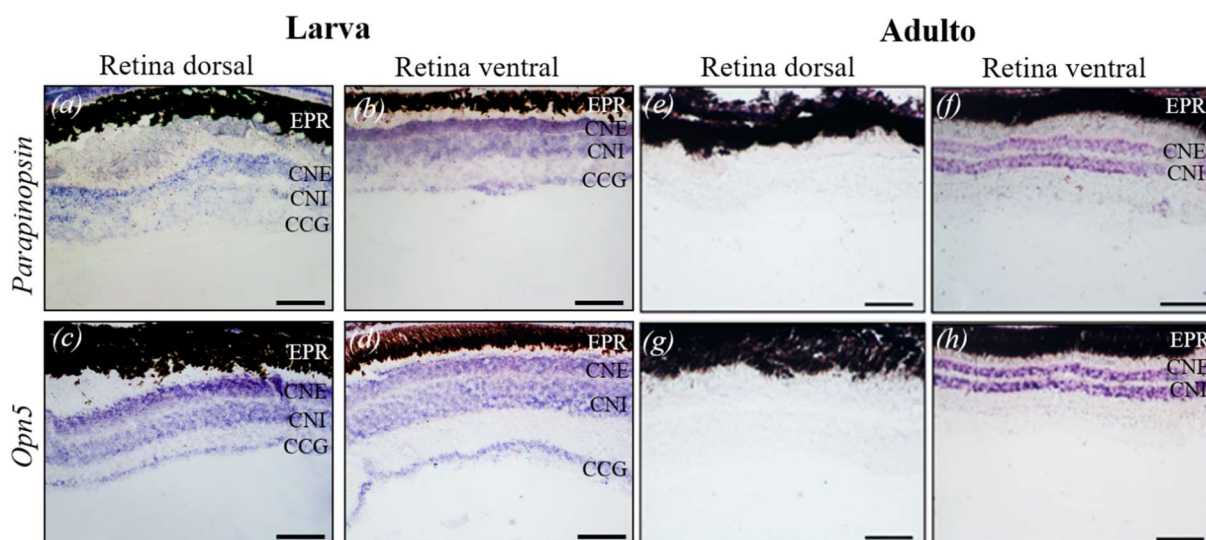


Figura 37- Hibridização *in situ* para os genes de opsinas não visuais: *parapinopsin* e *opn5*, na retina de larvas (estágio 2) de *A. anableps*. EPR (epitélio pigmentar da retina); CNE (camada nuclear externa); CNI (camada nuclear interna); CCG (camada das células ganglionares). Fotos: As imagens foram capturadas utilizando microscópio óptico com aproximação 20x e escala 0,05 mm.

Nossos resultados mostraram diferenças no padrão de expressão desses genes quando comparamos olhos de larvas em relação a olhos de indivíduos adultos (Figura 37 e-h). Na fase adulta, *parapinopsin* e *opn5* são expressos de forma assimétrica, nas retinas dorsal e ventral, exclusivamente nas camadas nucleares externa (CNE) e camadas nucleares interna (CNI) (MARILUZ, 2019). Neste estágio, os indivíduos estão em seu habitat natural e interagem com os estímulos de luz ambiente, provenientes do ambiente aéreo-aquático, o que caracteriza um padrão de regulação dessas opsinas diferente dos encontrados em larvas.

Em contrapartida, uma análise realizada com *Anguilla Japonica* foi observada a expressão de *opn5* na retina, porém não foi especificado em quais camadas da retina esse gene foi expresso. Nesse estudo, os autores sugerem que a expressão de *opn5* pode estar relacionada com a ação do fotoperíodo e o processo de maturação sexual dessa espécie (BYUN *et al.*, 2020). Curiosamente outros estudos realizados com peixes (*zebrafish*, *Oryzias latipes* e *Lepisosteus oculatus*) mostraram o perfil de expressão espacial de subtipos de *opn5* (*opn5m* e *opn5m2*) na retina dorsal e ventral, especificamente nas células da CCG, CNI e células horizontais (SATO *et al.*, 2016).

Ainda no mesmo estudo, a expressão de *opn5m* na retina dorsal e ventral do peixe medaka (*Oryzias latipes*) foram relativamente mais densos em células da camada nuclear interna (CNI) e em um pequeno número de células ganglionares (CCG) da região ventral. Além disso, os padrões de expressão *opn5m* e *opn5m2* na retina de *zebrafish* também foi avaliado, sendo *opn5m* expresso apenas na retina ventral com sinais fortes em uma população esparsa da CCG

e sinais fracos nas células da CNI. Já *Opn5m2* apresentou sinais fortes nas células horizontais de ambas as regiões dorsal e ventral (SATO *et al.*, 2016).

A expressão assimétrica de *Opn5m* e *Opn5m2* foi observado na retina de gar manchado (*Lepisosteus oculatus*), onde a expressão de *Opn5m* foi detectada somente nas células da CNI da retina ventral. Em contraste, a expressão de *Opn5m2* foi relativamente forte na retina dorsal, especialmente nas células da CNI, que é semelhante ao padrão de expressão de *Opn5m2* visto na retina de *zebrafish* (SATO *et al.*, 2016).

Em resumo, a expressão de *Opn5m* foi mais proeminente na retina ventral do que na retina dorsal desses peixes. Além disso, *Opn5m* foi distribuído predominantemente na CNI e na CCG, o que geralmente é consistente com o padrão de expressão de *Opn5m* de outros vertebrados. A expressão de *Opn5m* e *Opn5m2* nas células retiniais deste estudo são similares aos encontrados nas retinas dorsal e ventral de *A. anableps*, bem como a simetria de *opn5m2* da retina de *zebrafish* e *Oryzias latipes* (Tabela 5).

Tabela 5: Comparação do padrão de expressão de *parapinopsin* e *opn5* e seus subtipos nos modelos estudados e disponíveis na literatura.

Organismo	Fase do desenvolvimento	<i>Opn5</i>		<i>Parapinopsin</i>	
		Retina dorsal	Retina ventral	Retina dorsal	Retina ventral
<i>Zebrafish</i> (Sato <i>et al.</i> , 2016)	Adulto	<i>opn5m</i>		-	-
		-	CCG, CNI	-	-
		<i>opn5m2</i>		-	-
<i>Oryzias latipes</i> (Sato <i>et al.</i> , 2016)	Juvenis	Células horizontais	Células horizontais	-	-
		CNI	CNI	-	-
<i>Lepisosteus oculatus</i> (Sato <i>et al.</i> , 2016)	Adulto	<i>opn5m</i>		-	-
		-	CNI	-	-
		<i>opn5m2</i>		-	-
<i>Anguilla Japonica</i> (Byun <i>et al.</i> , 2020)	Adulto	CNI	-	-	-
		<i>opn5</i>		-	-
<i>A. anableps</i>	Larva	Retina (camadas não especificadas)	Retina (camadas não especificadas)	-	-
		CNE, CNI, CCG.	CNE, CNI, CCG.	CNE, CNI e CCG.	CNE, CNI e CCG.
<i>A. anableps</i> (Mariluz, 2019).	Juvenil/adulto	-	CNE, CNI	-	CNE, CNI

Devido a escassez de dados disponíveis na literatura atual sobre a expressão de *opn5* e *paranopsin* na retina de peixes a comparação dos resultados atingidos neste trabalho é dificultosa, necessitando que mais pesquisas a respeito sejam realizadas para mostrar então um desfecho comum a partir dos métodos e modelo utilizados.

Variações na exposição à luz alteram o padrão de expressão gênica de opsinas visuais na retina de *A. anableps* juvenil

Sabe-se que em *A. anableps* juvenis encontrados na natureza, o padrão de expressão das opsinas visuais *Rh2-1* e *Lws* ocorre exclusivamente nas regiões ventral e dorsal da retina, respectivamente (Figura 38 a-d) (PEREZ *et al.*, 2017; OWENS *et al.*, 2012).

Os resultados desta análise mostraram alterações no padrão de expressão gênica de *Rh2-1* após a manipulação da incidência de luz, alterando a água turva onde o *A. anableps* é normalmente encontrado e substituindo-a por água limpa. A expressão de *Rh2.1* tornou-se uniformemente expressa em toda a retina, essa simetria permite que o olho de *A. anableps* otimize a absorção de diferentes comprimentos de onda provenientes dos ambientes aéreo e aquático (Figura 38e-f). Já expressão de *Lws* após o mesmo experimento permaneceu inalterada e restrita às células fotorreceptoras da retina dorsal (Figura 38g-h).

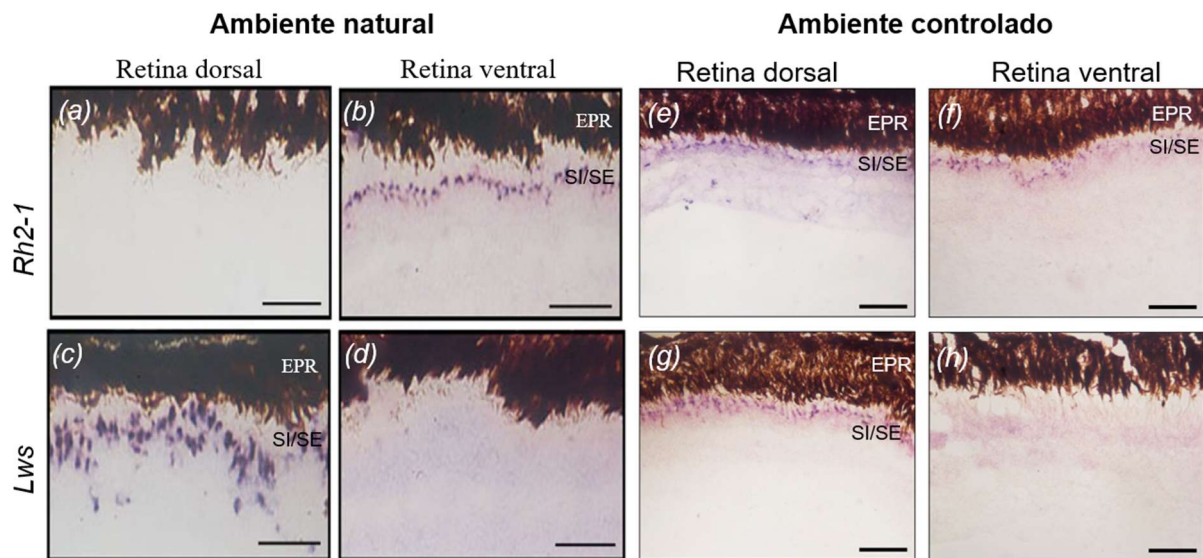


Figura 38: Padrão de expressão gênica de opsinas visuais em *A. anableps* após 30 dias de exposição em água limpa. Hibridização *in situ* para genes de opsinas visuais (*Rh2-1* e *Lws*) na retina de indivíduos juvenis de *A. anableps* em ambiente controlado (e-f). EPR (epitélio pigmentar da retina); SI/SE (segmento externo e segmento interno dos fotorreceptores). Fotos: As imagens foram capturadas utilizando microscópio óptico com aproximação 20x e escala 0,05 mm.

A assimetria na expressão de opsinas visuais vista em *A. anableps* possibilita a esta espécie absorver comprimentos de ondas provenientes de estímulos luminosos de dois ambientes completamente diferentes ao mesmo tempo. A presença de *Lws* na retina dorsal de

A. anableps é similar ao padrão de expressão observado em *guppies* e *J. onca*, espécies que pertencem a mesma família de *A. anableps*, mas que possuem visão estritamente aquática (WINDSOR & OWENS, 2009; OWENS *et al.* 2012).

Em *zebrafish* e *guppies*, os padrões de expressão dos diferentes subtipos de opsinas *Rh2* e *Lws* variam de acordo com o estágio de desenvolvimento e região da retina. Apesar de ambas espécies permanecerem com olhos submersos, *zebrafish* é ovíparo e tem todo o desenvolvimento embrionário fora do corpo da fêmea, já *guppies* são vivíparos, assim como *A. anableps*, e possuem desenvolvimento embrionário dentro da barriga da fêmea (TAKECHI & KAWAMURA, 2005; OWENS *et al.*, 2012).

Sabe-se que larvas de *A. anableps* ainda dentro da barriga da fêmea possuem *Lws* e *Rh2-1* expressas na retina de forma assimétrica (PEREZ *et al.*, 2017). Apesar da assimetria ser determinada por fatores genéticos durante o desenvolvimento embrionário, foi possível alterar o padrão de expressão de *Rh2-1* com variação no estímulo luminoso externo, entretanto o mesmo não ocorreu com o gene *Lws*. Esses achados indicam que a expressão de opsina na retina pode mudar em resposta a diferentes estímulos de luz (CHENG & FLAMARIQUE, 2004; SHAND., *et al.*, 2008; PEREZ *et al.*, 2017).

Vários estudos apontam que os níveis de expressão de opsinas estão sujeitos à plasticidade fenotípica (FULLER *et al.*, 2005; SHAND *et al.*, 2008; VEEN *et al.*, 2017). A exemplo disso, achados de Sakai e colaboradores (2016) avaliaram por qPCR a expressão de opsinas visuais em *guppies* (*Poecilia reticulata*) em desenvolvimento sob diferentes condições de luz, confirmando alterações plásticas na opsina *Lws*, o que sugeriu que a expressão dessa opsina, caracterizadas por sensibilidade a comprimentos de onda longos, pode lhes conferir vantagens para aquisição de alimentos e evasão de predadores em ambientes aquáticos.

Ainda neste quesito, indivíduos que habitam ambientes de baixa predação expressam maiores níveis de opsina *Lws* do que aqueles que habitam ambientes de alta predação (SANDKAM *et al.*, 2013). Estudos realizados por qPCR com *Lucania goodei* e ciclídeos no Lago Malawi mostraram que os níveis de expressão de opsinas também podem mudar de acordo com as diferentes condições ambientais (FULLER *et al.*, 2005; HOFMANN *et al.*, 2010). O mesmo acontece com as espécies *Ostorhinchus cyanosoma*, *Pomacentrus amboinensis* e *Pomacentrus moluccensis*, onde a expressão de opsinas pode ser modulada de acordo com mudanças espectrais do ambiente (LUEHRMANN *et al.*, 2018).

Os habitats de organismos marinhos, especialmente peixes, variam em profundidade e região, desde áreas de água doce até áreas salobras. As condições de luz desses lugares são diferentes em termos de turbidez, cor e brilho (BOWMAKER, 2008).

Diferenças na plasticidade fenotípica de opsinas visuais também foram encontradas em espécies do gênero *Pundamilia* que habitam as ilhas Mako e Anchor (águas mais claras) em relação das ilhas Python e Kissenda (águas com maior turbidez). Para analisar como diferentes mecanismos de ajuste visual contribuem para a adaptação visual, foi quantificado por qPCR o perfil de expressão de opsinas visuais em *Pundamilia pundamilia* e *Pundamilia nyererei*. A expressão de *Lws* não diferiu entre as espécies *P. pundamilia* e *P. nyererei* provenientes das ilhas Mako e Anchor (águas mais claras) em relação às ilhas Python e Kissenda (águas com maior turbidez) (WRIGHT *et al.*, 2019). Esses resultados seguem o padrão geral de outros peixes, onde a alta expressão de *Lws* tende a ocorrer em ambientes turvos (EHLMAN *et al.*, 2015; TORRES-DOWDALL *et al.*, 2017).

De modo similar, as mudanças na regulação da expressão de opsinas visuais vistas em *A. anableps* mostram que a luz pode modular a expressão de *lws* e *rh2-1* causando deslocamento do domínio de expressão de *rh2-1*, antes restrito à retina ventral, expandindo-o para toda a retina. Esses achados mostram que a variação da expressão de opsinas visuais pode contribuir para o ajuste visual da espécie, assim como mostrado em outros peixes que habitam águas turvas.

Experimentos de RT-qPCR com a espécie *Lucania goodei* foram realizados para verificar a expressão das opsinas *Sws1*, *Sws2b*, *Sws2a*, *Rh2-1* e *Lws* após tratamentos de iluminação diferentes com água limpa vs água manchada de chá. Após quatro semanas de monitoramento foi observado que a expressão de quase todas as opsinas, exceto *Sws1*, aumentou sob a condição turvas provenientes de chá (FULLER & CLARICOATES, 2011).

No mesmo estudo cogitações que explicassem a mudança das opsinas foram levantadas, relacionando a distribuição e variação dos cones, que podem ser alterados de acordo com a iluminação ambiente. Outra possibilidade seria que a densidade do fotopigmento pudesse ser alterado. Por fim, foi proposto que a expressão da opsina pudesse interferir na dinâmica da reciclagem de fotopigmentos com os cones desprendo-se continuamente dos segmentos externos e gerando novos fotopigmentos (FULLER & CLARICOATES, 2011).

Variações na exposição à luz alteram o padrão de expressão gênica de opsinas não visuais na retina de *A. anableps* juvenil.

A análise do padrão de expressão espacial de opsinas não visuais de três tipos de subfamília de genes de melanopsina, *opn4x1*, *opn4x2*, *opn4m3*, e um tipo de opsina de tecido múltiplo teleósteo, *tmt1b*, foi realizada através de hibridização *in situ* após os 30 dias submetidos à ambiente controlado com luminosidade dentro e fora d'água. Os resultados

mostraram que os genes de opsinas não visuais apresentaram um padrão diferente de expressão em relação a indivíduos encontrados na natureza (Figura 39h-p).

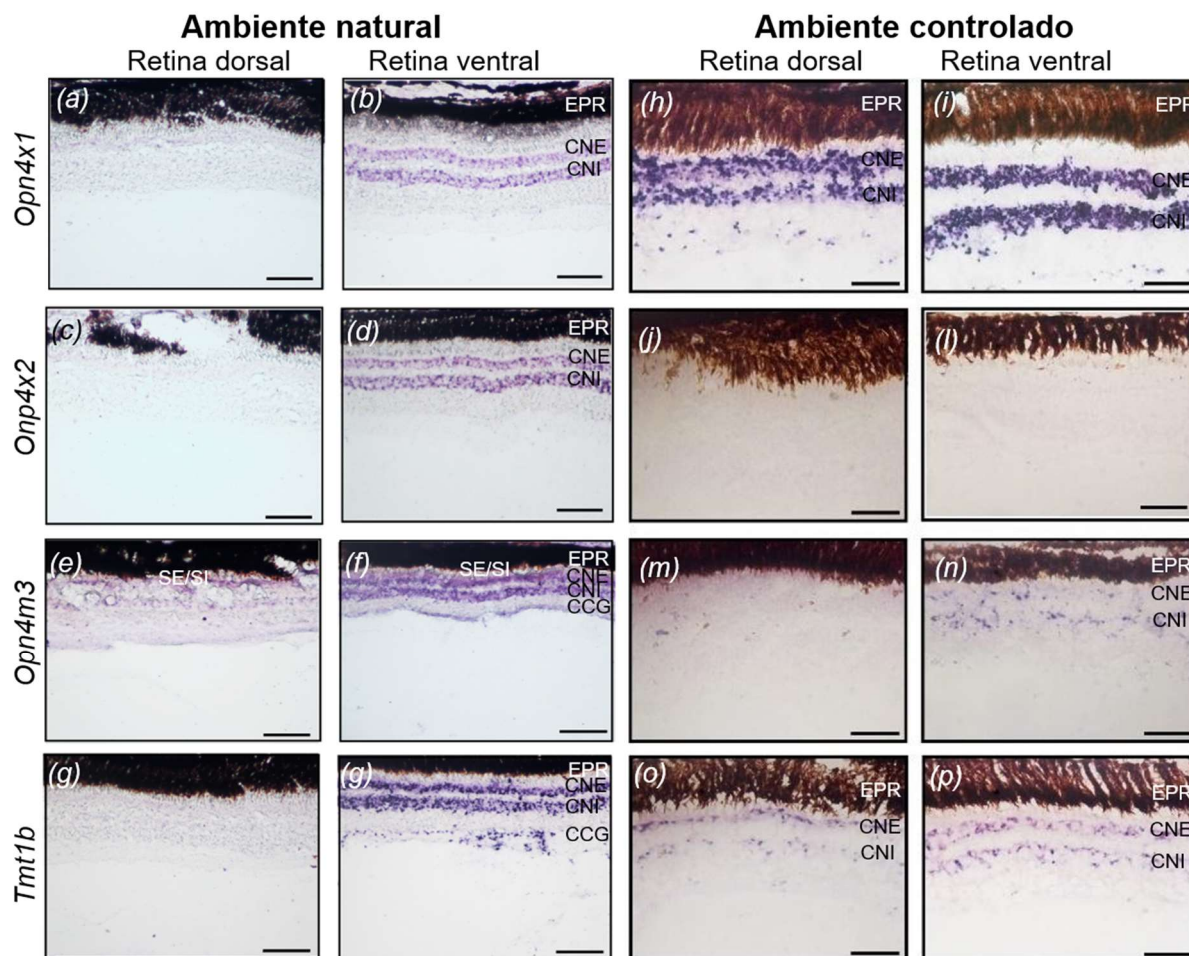


Figura 39. Padrão de expressão gênica de opsinas não visuais em *A. anableps* após o período de exposição à luz dentro em ambiente controlado. Hibridização *in situ* para genes de opsinas não visuais (*opn4m3*, *opn4x1*, *opn4x2* e *tmt1b*) na retina de indivíduos juvenis de *A. anableps* sob condições de luminosidade controlado. EPR (epitélio pigmentar da retina); SE/SI (segmento externo e segmento interno dos fotorreceptores); CNE (camada nuclear externa); CNI (camada nuclear interna); CCG (camada de células ganglionares). Fotos: As imagens foram capturadas utilizando microscópio óptico com aproximação 20x e escala 0,05 mm.

Foi observado um padrão de expressão simétrico para *opn4x1*, tanto na porção ventral e dorsal da retina de *A. anableps*, especificamente nas camadas nucleares externa (CNE) e camadas nucleares internas (CNI) (Figura 39h-i). Esses resultados são semelhantes aos encontrados em larvas, porém na fase adulta o padrão de expressão de *opn4x1* é encontrado somente na porção ventral da retina (Figura 39b) (ARAÚJO, 2018).

Esses achados indicam que *A. anableps* exibe um grande potencial para modular sua visão de acordo com ambiente, indicando um fenômeno de plasticidade fenotípica, particularmente durante o desenvolvimento, pois permite que esse organismo ajuste sua visão rapidamente a diferentes condições ambientais (PIGLIUCCI *et al.*, 2006).

Em contrapartida, não foi detectada por hibridização *in situ* a expressão de *opn4x2* na retina desses indivíduos após o tratamento realizado (Figura 39j-l). Diferente do observado em indivíduos encontrados na natureza, que expressam *opn4x2* somente na retina ventral (Figura 39d) (ARAÚJO, 2018).

Em *zebrafish*, o perfil da expressão gênica das melanopsinas foram identificadas por HIS em diferentes regiões da retina (MATOS-CRUZ *et al.*, 2011). Vale ressaltar que algumas opsinas desse grupo têm sido associadas à regulação da fototaxia negativa em larvas de *zebrafish* (FERNANDES *et al.*, 2012). No entanto, em peixes e outros vertebrados não mamíferos a expressão de melanopsinas em vários tipos de células neuronais pode influenciar diretamente na função retiniana de maneira dependente e independente das células ganglionares retiniais intrinsecamente fotossensíveis (MATOS-CRUZ *et al.*, 2011). Ainda de acordo com o mesmo autor, a expressão das melanopsinas pode ocorrer nas células ganglionares, bem como em interneurônios das camadas nucleares internas da retina de *zebrafish*.

Em peixes teleósteos, *opn4x1*, *opn4x2* e *opn4m3* é expresso ao longo de toda retina (DAVIES *et al.*, 2011). Em *A. anableps* após o experimento que manteve os indivíduos em água clara, a expressão de *opn4m3* foi detectável de forma assimétrica na retina ventral (nas camadas nuclear interna e externa) (39m-n), exibindo um padrão semelhante aos de indivíduos adultos encontrados na natureza que expressam esse gene na da retina ventral (Figura 39e-f). Esses achados divergem na fase larval, onde *opn4m3* não é detectável no olho de *A. anableps* (ARAÚJO, 2018).

Por fim, a expressão simétrica do gene *tmt1b* também foi observada ao longo de toda a retina de *A. anableps* após o experimento previamente descrito, não havendo diferenças entre as regiões dorsal e ventral deste tecido (Figura 39o-p). Em contrapartida, quando comparamos a expressão de *tmt1b* em olhos juvenis de *A. anableps* encontrados no ambiente natural, a expressão desse mesmo gene se mostra assimétrico (MARILUZ, 2019). Esses achados mostram que *tmt1b* é modulado conforme a mudança de luz de ambientes com alta turbidez para ambientes com águas claras.

O perfil de expressão de *tmt1b* na retina ventral também pode estar relacionada com a captação de luz do meio atmosférico ou até mesmo alteração do cromóforo e da sequência proteica da opsina (CARLETON, 2009; KOYANAGI *et al.*, 2015; SATO *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2001). A opsina *Tmt* é expressa em varios tecidos neurais e não neurais, incluindo uma linhagem de células embrionárias de *zebrafish* que está associada com a regulação fótica dos relógios periféricos (MOUTSAKI *et al.*, 2003; CAVALLARI *et al.*, 2011). Uma vez que a opsina *Tmt* é distribuída em muitos tecidos, incluindo órgãos internos nos quais se pensa que a

luz dificilmente penetre em muitos vertebrados, a opsina *Tmt* pode, possivelmente, ter funções fotorreceptoras e não fotorreceptoras (SAKAI *et al.*, 2015; FISCHER *et al.*, 2013).

Em medaka (*Oryzias latipes*), foi investigado por hibridização *in situ* a expressão da opsina *opn3/Tmt* na retina e no cérebro, sendo que *tmt1b* foi detectado nas camadas nucleares interna da retina ventral e dorsal. O padrão de expressão dessas opsinas sugerem que a detecção de luz na retina e no cérebro de peixes pode estar envolvida na integração de entradas visuais, função vestibular, somatossensorial e regulação endócrina pituitária (SATO *et al.*, 2021).

O mesmo autor reporta que a entrada direta de luz no lobo caudal do cerebelo regula a integração da visão e as entradas mecanossensoriais através das opsinas *Tmt* em medaka, em contrapartida a expressão de *tmt1a*, *tmt1b* e *tmt2* na região cerebral pode também estar relacionada ao sensor térmico no cérebro (SATO *et al.*, 2021). Além disso foi investigado o papel funcional de *tmt1b* e *tmt2*, com ambas compartilhando características do padrão de expressão e sensibilidade espectral (FISCHER *et al.*, 2013; SATO *et al.*, 2021).

Nesse sentido, especulamos que as mudanças induzidas pela luz na expressão de opsinas não visuais podem ser devido a regulação indireta de opsinas visuais nas células fotorreceptoras da retina. Evidências sugerem que a plasticidade da expressão gênica parece ser crucial para a adaptação do sistema sensorial às condições ambientais dos organismos (LUEHRMANN *et al.*, 2018).

Nosso estudo mostrou que há plasticidade na expressão de opsinas na retina de *A. anableps* podendo esta ser modulada por mudanças espectrais e de intensidade na luz ambiental. Tais ajustes de expressão podem permitir uma rápida adaptação do sistema visual em ambientes de diferentes profundidade e luminosidade ou variabilidade sazonal.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta tese mostraram que a expressão de Lamin A/C em larvas e adultos é similar ao encontrado em outros organismos. Assim, supomos que a expressão de Lamin A/C possa ter participação direta na proliferação e diferenciação celular necessária em todas as etapas da formação do olho.

Nossos resultados mostraram também que a expressão de opsinas visuais *lws* e *rh2-1* é estabelecida sem estímulos de luz ambiente antes do nascimento. No entanto, mudanças induzidas pela luz podem modular a expressão de *rh2-1* e causar um deslocamento do domínio de expressão, antes restrito à retina ventral, para ser expandido para toda a retina.

Quanto às opsinas não visuais *parapinopsin* e *opn5*, observou-se serem expressas de forma simétrica na retina de *A. anableps*, sugerindo que a espécie em questão modula as opsinas envolvidas em diferentes funções fisiológicas reguladas pela luz. As opsinas não visuais também apresentaram expressão assimétrica na camada nuclear da retina em peixes juvenis. Embora estabelecidas apenas após o nascimento, as mudanças na iluminação do ambiente provocaram um deslocamento nos domínios de expressão de *opn4x1*, *opn4m3* e *tmt1b*, sugerindo que tanto as opsinas visuais quanto as não visuais podem ser moduladas por mudanças na incidência fótica.

Portanto, o controle regulatório da expressão de opsinas no olho do *A. anableps* é complexo e compartimentalizado nas retinas dorsal e ventral, observando mudanças em períodos de 30 dias. Ainda assim nossos resultados não excluem a possibilidade de que mudanças no padrão de expressão de genes de opsina possam ocorrer em um período mais curto.

Dados adicionais no futuro devem fornecer novos *insights* sobre o entendimento da base genética da duplicação ocular e os mecanismos regulatórios por trás da subfuncionalização da retina no peixe de quatro olhos *Anableps anableps*.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, F.; VINBERG, F. Transduction and Adaptation Mechanisms in the Cilium or Microvilli of Photoreceptors and Olfactory Receptors From Insects to Humans. **Front Cell Neurosci.** v. 15, p.:662453, 2021. doi: 10.3389/fncel.2021.662453.
- 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.
- AMINI, R.; BHATNAGAR, A.; SCHLÜBLER, R.; MÖLLMERT, S.; GUCK, J.; NORDEN, C. Amoeboid-like migration ensures correct horizontal cell layer formation in the developing vertebrate retina. **Elife.** V. 11, p.:e76408, 2022. doi: 10.7554/eLife.76408.
- AMORIM, P.F.; COSTA, W.J.E.M. Multigene phylogeny supports diversification of four-eyed fishes and one-sided livebearers (Cyprinodontiformes: Anablepidae) related to major South American geological events. **PLoS One.** v. 13, n. 6, e0199201, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0199201.
- ANGUEYRA, J.M.; KINDT, K.S. Leveraging *Zebrafish* to Study Retinal Degenerations. **Front Cell Dev Biol.**, v. 19, n. 6, p.:110, 2018. doi: 10.3389/fcell.2018.00110.
- ARAÚJO, Maysa Renata Silva. **Análise do padrão de expressão de genes melanopsina durante o desenvolvimento do peixe de quatro olhos *Anableps anableps*.** 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.
- ASTERITI, S.; GRILLNER, S.; CANGIANO, L. A Cambrian origin for vertebrate rods. **Elife.** v. 4, e.:07166, 2015. doi: 10.7554/eLife.07166.
- AVIVI, A.; OSTER, H.; JOEL, A.; BEILES, A.; ALBRECHT, U.; NEVO, E. Circadian genes in a blind subterranean mammal III: molecular cloning and circadian regulation of cryptochrome genes in the blind subterranean mole rat, *Spalax ehrenbergi* superspecies. **J. Biol. Rhythms**, v. 19, p. 22–34, 2004. DOI: 10.1177/0748730403260622
- BADEN, T.; EULER, T.; BERENS, P. Understanding the retinal basis of vision across species. **Nat Rev Neurosci.** v. 21, n. 1, p.:5-20, 2020. doi: 10.1038/s41583-019-0242-1.
- BECKER, E.A.; YAO, A.I.; SEITZER, P.M.; KIND, T.; WANG, T.; EIGENHEER, R.; SHAO, K.S.; YAROV-YAROVY, V.; FACCIOTTI, M.T. A Large and Phylogenetically Diverse Class of Type 1 Opsins Lacking a Canonical Retinal Binding Site. **PLoS One.** V. 11, n. 6, p.: e0156543, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0156543.
- BEIER, C.; ZHANG, Z.; YURGEL, M.; HATTAR, S. Projections of ipRGCs and conventional RGCs to retinorecipient brain nuclei. **J Comp Neurol.** V. 529, n. 8, p.:1863-1875, 2021. doi: 10.1002/cne.25061.
- BELLINGHAM, J.; CHAURASIA, S.S.; MELYAN, Z.; LIU, C.; CAMERON, M.A.; TARTTELIN, E.E.; IUVONE, P.M.; HANKINS, M.W.; TOSINI, G.; LUCAS, R.J. Evolution of melanopsin photoreceptors: discovery and characterization of a new melanopsin in nonmammalian vertebrates. **PLoS Biol**, v. 4, p. 254, 2006.

BELLINGHAM, J.; WHITMORE, D.; PHILP, A.R.; WELLS, D.J.; FOSTER, R.G. *Zebrafish* melanopsin: isolation, tissue localisation and phylogenetic position. **Mol Brain Res.**, v. 107, p.:128–36, 2002.

BELL-PEDERSEN, D.; CASSONE, V.M.; EARNEST, D.J.; GOLDEN, S.S.; HARDIN, P.E.; THOMAS, T.L.; ZORAN, M.J. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. **Nat Rev Genet.**, v. 6, n. 7, p.:544-56, 2005. DOI: 10.1038/nrg1633.

BERTOLESI, G. E., MCFARLANE, S. Melanin-concentrating hormone like and somatolactin. A teleost-specific hypothalamic-hypophyseal axis system linking physiological and morphological pigmentation. **Pigment Cell Melanoma Res.** v. 34, p.: 564–574, 2020. doi: 10.1111/pcmr.12924

BERTOLESI, G. E., DEBNATH, N., ATKINSON-LEADBEATER, K., NIEDZWIECKA, A., AND MCFARLANE, S. Distinct type II opsins in the eye decode light properties for background adaptation and behavioural background preference. **Mol. Ecol.** 30, 6659–6676, 2021. doi: 10.1111/MEC.16203

BERTOLESI, G.E.; DEBNATH, N.; MALIK, H.R.; MAN, L.L.H.; MCFARLANE, S. Type II Opsins in the Eye, the Pineal Complex and the Skin of *Xenopus laevis*: Using Changes in Skin Pigmentation as a Readout of Visual and Circadian Activity. **Front Neuroanat.** v. 15, p.:784478, 2022. doi: 10.3389/fnana.2021.784478.

BIAGIONI, L. M.; HUNT, D. M.; COLLIN, S. P. Morphological characterization and topographic analysis of multiple photoreceptor types in the retinae of mesopelagic hatchetfishes with tubular eyes. **Front. Ecol. Evol.** V. 4, p.:25, 2016. doi: 10.3389/fevo.2016.00025

BITMAN-LOTAN, E.; ORIAN, A. Nuclear organization and regulation of the differentiated state. **Cell. Mol. Life Sci.** 78, 3141–3158, 2021. doi: 10.1007/s00018-020- 03731-4

BLANCO-VIVES, B.; ALIAGA-GUERRERO, M.; CAÑAVATE, J.P.; MUÑOZ-CUETO, J.A.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Does lighting manipulation during incubation affect hatching rhythms and early development of sole? **Chronobiol Int.**, v. 28, p.:300-306, 2011.

BLANCO-VIVES, B.; GUERRERO, M. A.; CAÑAVATE, J.P.; MATEOS, G.G.; ROBLES, M.A.J.; HERRERA, P.P.; CUETO, M.J.A.; VÁZQUEZ, S.F.J. Metamorphosis induces a light-dependent switch in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) from diurnal to nocturnal behavior. **J Biol Rhythms.** V. 27, n. 2, p.:135-44, 2012. doi: 10.1177/0748730411435303.

BLANCO-VIVES, B.; VILLAMIZAR, N.; RAMOS, J.; BAYARRI, M.J.; CHEREGUINI, O.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Effect of daily thermo- and photo-cycles of different light spectrum on the development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. **Aquaculture.** V. 306, p137-145, 2010.

BONANNO, J. A. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. **Exp Eye Res.** v. 95, n. 1, p.:2-7, 2012. doi: 10.1016/j.exer.2011.06.004.

BORGES, Rui Carlos Pinto. The evolution of the melanopsin gene family (OPN4m and OPN4x) in vertebrates. 2012. Dissertação (Mestre em Biodiversidade, Genética e Evolução) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2012. 55f.

BOWMAKER, J.K. Evolution of vertebrate visual pigments. **Vision Res.** V. 48, n. 20, p.:2022-41, 2008. doi: 10.1016/j.visres.2008.03.025.

BRENNER, M.; KRUMME, U. Tidal migration and patterns in feeding of the four-eyed fish *Anableps anableps* L. in a north Brazilian mangrove. **J Fish Biol.** V. 70, p.:406-27, 2007. doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01313.x

BRIDGER, J. M.; KILL, I.R.; O'FARRELL, M.; HUTCHISON, C.J. Internal Lamin Structures within G1 Nuclei of Human Dermal Fibroblasts. **J Cell Sci.**, v. 104, p.: 297-306, 1993.

BUHR, E.D.; YUE, W.W.; REN, X.; JIANG, Z.; LIAO, H.W.; MEI, X.; VEMARAJU, S.; NGUYEN, M.T.; REED, R.R.; LANG, R.A.; *ET AL.* Neuropsin (OPN5) - mediated photoentrainment of local circadian oscillators in mammalian retina and cornea. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 112, p.:13093–13098, 2015.

BURKE, B.; STEWART, C.L. The nuclear lamins: flexibility in function. **Nat Rev Mol Cell Biol.** V. 14, n. 1, p.:13-24, 2013. doi: 10.1038/nrm3488.

BUSCHBECK, E.K.; HAUSER, M. The visual system of male scale insects. **Naturwissenschaften.** V. 96, n. 3, p.:365-74, 2009. doi: 10.1007/s00114-008-0484-7.

BUSSEROLLES, F.; FITZPATRICK, J.L.; MARSHALL, N.J.; COLLIN, S.P. The influence of photoreceptor size and distribution on optical sensitivity in the eyes of lanternfishes (Myctophidae). **PLoS One.** V. 9, n. 6, p.:e99957, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0099957.

BURNS, J. R. Testis and gonopodium development in *Anableps dowi* (Pisces: Anablepidae) correlated with pituitary gonadotropic zone area. **Journal of morphology**, v. 210, n. 1, p. 45-53, 1991.

BUXBOIM, A.; IRIANTO, J.; SWIFT, J.; ATHIRASALA, A.; SHIN, J. W.; REHFELDT, F.; DISCHER, D. E. Coordinated increase of nuclear tension and lamin-A with matrix stiffness outcompetes lamin-B receptor that favors soft tissue phenotypes. **Mol Biol Cell** **28**, v. 23, p.: 3333-3348, 2017.

BYUN, J.H.; HYEON, J.Y.; KIM, E.S.; KIM, B.H.; MIYANISHI, H.; KAGAWA, H.; TAKEUCHI, Y.; KIM, S.J.; TAKEMURA, A.; HUR, S.P. Gene expression patterns of novel visual and non-visual opsin families in immature and mature Japanese eel males. **PeerJ.** V. 27, n. 8, p.e8326, 2020. doi: 10.7717/peerj.8326.

CAHILL, G.M. Circadian regulation of melatonin production in cultured zebrafish pineal and retina. **Brain Res.**, v. 708, p.:177-181, 1996.

CAPOWSKI, E. E.; SIMONETT, J. M.; CLARK, E. M.; WRIGHT, L. S.; HOWDEN, S. E.; WALLACE, K. A.; *ET AL.* Loss of MITF expression during human embryonic stem cell differentiation disrupts retinal pigment epithelium development and optic vesicle cell proliferation. **Hum. Mol. Genet.** 23, 6332–6344, 2014. doi: 10.1093/hmg/ddu351

CARLETON, K. Cichlid fish visual systems: mechanisms of spectral tuning. **Integr Zool.** V. 4, n. 1, p.:75-86, 2009. doi: 10.1111/j.1749-4877.2008.00137.x.

CARLETON, K.L.; ESCOBAR-CAMACHO, D.; STIEB, S.M.; CORTESI, F.; MARSHALL, N.J. Seeing the rainbow: mechanisms underlying spectral sensitivity in teleost fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 223, n. 8, 2020.

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**. V. 38, n. 4, p.:285-96, 2012.

CAVALLARI, N.; FRIGATO, E.; VALLONE, D.; FROHLICH, N.; LOPEZ-OLMEDA, J.F.; ET AL. A blind circadian clock in cavefish reveals that opsins mediate peripheral clock photoreception. **PLoS Biol**, v. 9, n. 9, p.: e1001142, 2011.

CAVODEASSI, F.; CREUZET, S.; ETCHEVERS, H.C. The hedgehog pathway and ocular developmental anomalies. **Hum Genet**. V. 138, n. 8-9, p.:917-936. 2018. doi: 10.1007/s00439-018-1918-8.

CEPKO, Constance L. The patterning and onset of opsin expression in vertebrate retinae. **Current opinion in neurobiology**, v. 6, n. 4, p. 542-546, 1996.

CERVIGÓN, F.; CIPRIANI, R.; FISCHER, W.; GARIBALDI, L.; HENDRICKX, M.; LEMUS, A.J.; MÁRQUEZ, R.; POUTIERS, J.M.; ROBAINA, G.; RODRÍGUEZ, B. Guía de campo de las especies comerciales marinas y de aguas salobres de la costa septentrional de Sur America. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1992. 595p.

CHEN, J. N.; SAMADI, S.; CHEN, W.J. Elopomorpha (Teleostei) as a New Model Fish Group for Evolutionary Biology and Comparative Genomics. **Evolutionary Biology: Biodiversification from Genotype to Phenotype**, p.: 329–344 2015. 10.1007/978-3-319-19932-0_17.

CHEN, P.; HAO, W.; RIFE, L.; WANG, X.P.; SHEN, D.; CHEN, J.; OGDEN, T.; VAN BOEMEL, G.B.; WU, L.; YANG, M.; FONG, H.K. A photic visual cycle of rhodopsin regeneration is dependent on Rgr. **Nature Genetics**, v. 28, n. 3, p. 256–260, 2001. doi: 10.1038/90089. PMID: 11431696.

CHEN, W.J.; MAYDEN, R.L. A phylogenomic perspective on the new era of Ichthyology. **Bioscience**, v. 60, p.:421–432, 2010.

CHENG, C.; ANSARI, M.M.; COOPER, J.A.; GONG, X. EphA2 and Src regulate equatorial cell morphogenesis during lens development. **Development**. V. 140, n. 20, p.:4237-45, 2013. doi: 10.1242/dev.100727.

CHENG, C.; FOWLER, V.M.; GONG, X. EphA2 and ephrin-A5 are not a receptor-ligand pair in the ocular lens. **Exp Eye Res.**, v. 162, p.:9-17, 2018. doi: 10.1016/j.exer.2017.06.016.

CHENG, C.L.; FLAMARIQUE, I.N. Chromatic organization of cone photoreceptors in the retina of rainbow trout: single cones irreversibly switch from UV (SWS1) to blue (SWS2) light sensitive opsin during natural development. **J Exp Biol**. V. 10, p:4123–35, 2007.

CHENG, C.L.; FLAMARIQUE, I.N. Opsin expression: new mechanism for modulating colour vision. **Nature**, v. 428, p.: 279, 2004. doi:10.1038/428279.

CHENG, J.; ALLGEYER, E. S.; RICHENS, J. H.; DZAFIC, E.; PALANDRI, A.; LEWKOW, B.; SIRINAKIS, G.; JOHNSTON, D. A single-molecule localization microscopy method for tissues reveals nonrandom nuclear pore distribution in *Drosophila*. **J Cell Sci**, v. 134, n. 24, 2021.

CHENG, N.; TSUNENARI, T.; YAU, K.W. Intrinsic light response of retinal horizontal cells of teleosts. **Nature**, v. 460, p.:899–903, 2009.

CHOW, R.L.; LANG, R.A. Early eye development in vertebrates. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** V. 17, p. 255–296, 2001. doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.255.

COLLIN, H.B.; COLLIN, S.P. The corneal surface of aquatic vertebrates: microstructures with optical and nutritional function? **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** V. 355, n. 1401, p.:1171–6, 2000. doi: 10.1098/rstb.2000.0661.

COLLIN, S. P. Evolution of the Visual System in Fishes. *In*: BINDER, M. D., HIROKAWA, N., WINDHORST, U (ed.) **Encyclopedia of Neuroscience**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009.

COLLIN, S. P.; COLLIN, H. B. The Corneal Epithelial Surface in the Eyes of Vertebrates: Environmental and Evolutionary Influences on Structure and Function. **Journal of Morphology**, v. 267, n. 3, p.: 273–291, 2006. doi: 10.1002 / jmor.10400

COLLIN, S.P.; DARWIN, C. Opsins: evolution in waiting. **Curr Biol.**, v. 15, p.:794–796, 2005.

CONSTANTINESCU, D.; GRAY, H.L.; SAMMAK, P.J.; SCHATTEN, G.P.; CSOKA, A.B. Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation. **Stem Cells.** V. 24, p.: 177–185, 2006.

CORBO, J.C. Vitamin A₁/A₂ chromophore exchange: Its role in spectral tuning and visual plasticity. **Dev Biol.**, v, 475, p.145-155, 2021. doi: 10.1016/j.ydbio.2021.03.002

COX, K. H.; TAKAHASHI, J.S. Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. **Journal of Molecular Endocrinology.**, v. 63, n. 4, 2019. DOI. <https://doi.org/10.1530/JME-19-0153>

CRONIN, T.W.; DOUGLAS, R.H. Seeing and doing: how vision shapes animal behaviour. **Philos Trans. R. Soc. B.** v. 369, n. 1636, p. 20130030, 2014.

CRONIN, T.W.; JOHNSEN, S. Extraocular, Non-Visual, and Simple Photoreceptors: An Introduction to the Symposium. **Integr Comp Biol.**, v. 56, n. 5, p.:758-763, 2016. doi: 10.1093/icb/icw106.

DAVIES, S. B.; CHUI, J.; MADIGAN, M. C.; PROVIS, J. M.; WAKEFIELD, D.; DI GIROLAMO, N. Stem cell activity in the developing human cornea. **Stem Cells**, v. 27, p.: 2781–2792, 2009. doi: 10.1002/stem.209

DAVIES, W. L.; HANKINS, M. W.; FOSTER, R. G. Vertebrate ancient opsin and melanopsin: divergent irradiance detectors. **Photochem Photobiol Sci**, v. 9, p.:1444–1457, 2010.

DAVIES, W. I. L.; LEI, Z.; STEVEN, H.; TAMAI, K.; TURTON, M.; HALFORD, S.; FOSTER, R. G.; WHITMORE, D.; HANKINS, M. 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.; WILKE, S.E.; ACOVARDANDO, J.A.; HANKINS, M.W.; CAÇAR, D.M. Anion sensitivity and spectral tuning of middle- and long-wavelength-sensitive (MWS/LWS) visual pigments. **Cell Mol Life Sci.** V. 69, p.:2455-2464, 2012. doi: 10.1007/s00018-012-0934-4.

DAVIES, W.I.; TAMAI, T.K.; ZHENG, L.; FU, J.K.; RIHEL, J.; FOSTER, R.G.; WHITMORE, D.; HANKINS, M.W. An extended family of novel vertebrate photopigments is widely expressed and displays a diversity of function. **Genome Res.** v. 25, p.: 1666–1679, 2015.

DE CAMPOS, V.S.; CALAZA, K.C.; ADESSE, D. Implications of TORCH Diseases in Retinal Development-Special Focus on Congenital Toxoplasmosis. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 10, p.:585727, 2020. doi: 10.3389/fcimb.2020.585727.

DE LIMA, J. L. R. **Análise de expressão gênica durante o desenvolvimento ocular no peixe de quatro olhos *Anableps anableps*.** 2018, Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia molecular), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

DE LIMA, J. L.R.; SOARES, F.A.; REMEDIOS, A.C.S.; THOM, G.; WIRTHLIN, M.; ALEIXO, A.; SCHNEIDER, M. P. C.; MELLO, C. V.; SCHNEIDER, P. N. A putative RA-like region in the brain of the scale-backed antbird, *Willisornis poecilinotus* (Furnariidae, Suboscines, Passeriformes, Thamnophilidae). **Genetics and molecular biology**, v. 38, p. 249-254, 2015.

DE OLIVEIRA, R.C.; WILSON, S.E. Descemet's membrane development, structure, function and regeneration. **Exp Eye Res.** V. 197, p.:108090, 2020. doi: 10.1016/j.exer.2020.108090.

DECHAT, T.; PFLEGHAAR, K.; SENGUPTA, K.; SHIMI, T.; SHUMAKER, D.K.; SOLIMANDO, L.; GOLDMAN, R.D. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. **Genes Dev.** V. 22, n. 7, p.:832-53, 2008. doi: 10.1101/gad.1652708

DELMONTE, D.W.; KIM, T. Anatomy and physiology of the cornea. **J Cataract Refract Surg.**, v. 37, n. 3, p.:588-98, 2011. doi: 10.1016/j.jcrs.2010.12.037.

DEPALLE, B.; QIN, Z.; SHEFELBINE, S.J.; BUEHLER, M.J. Large Deformation Mechanisms, Plasticity, and Failure of an Individual Collagen Fibril With Different Mineral Content. **J. Bone Miner. Res.** V. 31, p.: 380–390, 2016.

DHOUILLY, D.; PEARTON, D.J.; MICHON, F. The vertebrate corneal epithelium: from early specification to constant renewal. **Dev Dyn.** V. 243, n. 10, p.:1226-41, 2014. doi: 10.1002/dvdy.24179.

DÍAZ, N.M.; MORERA, L.P.; GUIDO, M.E. Melanopsin and the Non-visual Photochemistry in the Inner Retina of Vertebrates. **Photochem Photobiol.**, v. 92, n. 1, p.:29-44, 2016. doi: 10.1111/php.12545.

DONNALOJA, F.; CARNEVALI, F.; JACCHETTI, E.; RAIMONDI, M. T. Lamin A/C Mechanotransduction in Laminopathies. **Cells**. V. 9, p.:1306, 2020. doi: 10.3390/cells9051306

DONNER, A.L.; MAAS, R.L. Conservation and non-conservation of genetic pathways in eye specification. **Int J Dev Biol**. V. 48, p:743-753, 2004.

DUQUE-CHICA, GLORIA LILIANA. **Estudo da resposta da melanopsina na neuropatia óptica e no distúrbio de sono através do reflexo pupilar à luz**. Tese (Doutorado – programa de Pós-Graduação em Psicologia) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo. 2015. 139 f. doi 10.11606 / T.47.2016.tde-22022016-151326.

EGHRARI, A.O.; S. RIAZUDDIN, S.A.; GOTTSCH, J.D. Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. v. 134, p. 7-23, 2015. doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.04.001.

EINTRACHT, J.; TOMS, M.; MOOSAJEE, M. The Use of Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Developmental Eye Disorders. **Front Cell Neurosci**. V. 14, p.:265, 2020. doi: 10.3389/fncel.2020.00265.

EHLMAN, S.M.; SANDKAM, B.A.; BREDEN, F.; SIH, A. Developmental plasticity in vision and behavior may help guppies overcome increased turbidity. **J Comp Physiol A**. v. 201, p.:1125–35, 2015.

EGHRARI, A. O., RIAZUDDIN, S. A., AND GOTTSCH, J. D. “Chapter Two—overview of the cornea: structure, function and development,” in **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, eds J. F. Hejtmancik and J. M. Nickerson (Cambridge, MA: Academic Press), 7–23, 2015.

EMRAN, F.; RIHEL, J.; ADOLPH, A.R.; DOWLING, J.E. Zebrafish larvae lose vision at night. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, p.: 6034–6039, 2010. doi:10.1073/pnas.0914718107.

ERWIN, D.; LAFLAMME, M.; TWEEDT, S.; SPERLING, E.; PISANI, D., *ET AL*. The Cambrian conundrum: early divergence and later ecological success in the early history of animals. **Science**, v. 80, p. 1091–1098, 2011.

ESPANA, E.M.; BIRK, D.E. Composition, structure and function of the corneal stroma. **Exp Eye Res**. v. 198, p.:108137, 2020. doi: 10.1016/j.exer.2020.108137.

FAIN, G. L.; HARDIE, R.; LAUGHLIN, S. B. Phototransduction and the evolution of photoreceptors. **Curr. Biol**. V. 20, p.: 114–124, 2010. doi: 10.1016/j.cub.2009.12.006

FASICK, J.I.; ROBINSON, P.R. Adaptations of Cetacean Retinal Pigments to Aquatic Environments. **Front. Ecol. Evol.**, v. 4, n. 70, 2016 doi: <https://doi.org/10.3389/fevo.2016.00070>.

FERNALD, R., F. Evolution of Eyes. **Current Opinion in Neurobiology**. v. 10. p.: 444– 450. 2000.

FERNALD, R.D. Casting a genetic light on the evolution of eyes. **Science**. V. 313, n. 5795, p.:1914-8, 2006. doi: 10.1126/science.1127889.

FERNANDES, A.M.; FERRO, K.; ARREBERG, A.B.; BERGERON, S.A.; DRIEVER, W.; BURGESS, H.A. 2012. Deep brain photoreceptors control light-seeking behavior in *zebrafish* larvae. **Current Biology**, v. 22, p.:2042–2047, 2012. doi 10.1016/j.cub.2012.08.016.

FISCHER, R. M.; FONTINHA, B. M.; KIRCHMAIER, S.; STEGER, J.; BLOCH, S.; INOUE, D.; *ET AL.* Co-expression of VAL- and TMT-opsins uncovers ancient photosensory interneurons and motorneurons in the vertebrate brain. **PLoS Biol.** V. 11, p.:e1001585, 2013. doi: 10.1371/journal.pbio.1001585

FONTINHA, B.M.; ZEKOLL, T.; AL-RAWI, M., ET AL. TMT-Opsins differentially modulate medaka brain function in a context-dependent manner. **PLoS Biol.**, v. 19, n. 1, p.: e3001012, 2021. doi: 10.1371/journal.pbio.3001012

FRAU, S.; LOENTGEN, G.; MARTÍN-ROBLES, Á. J.; MUÑOZ-CUETO, J. A. Ontogenetic expression rhythms of visual opsins in senegalese sole are modulated by photoperiod and light spectrum. **Journal of Comparative Physiology B.** v. 190, n. 2, p.:185-204, 2020. doi:10.1007/s00360-020-01264-7

FRITSCH, R.; COLLIN, S.P. Michiels NK. Anatomical Analysis of the Retinal Specializations to a Crypto-Benthic, Micro-Predatory Lifestyle in the Mediterranean Triplefin Blenny *Tripterygion delaisi*. **Front Neuroanat.** V. 11, p.:122, 2017. doi: 10.3389/fnana.2017.00122.

FRITSCH, R.; ULLMANN, J. F. P.; BITTON, P. P.; COLLIN, S. P.; MICHIELS, N. K. Optic-nerve-transmitted eyeshine, a new type of light emission from fish eyes. **Front. Zool.** V. 14, p.:14, 2017. doi: 10.1186/s12983-017-0198-9

FU, L.; NIU, B.; ZHU, Z.; WU, S.; LI, W. CD-HIT. CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 23, p. 3150–3152, 2012.

FUHRMANN, S. Eye Morphogenesis and Patterning of the Optic Vesicle. **Curr Top Dev Biol.** V. 93, p.:61-84, 2010. doi: 10.1016/B978-0-12-385044-7.00003-5.

FUJIMURA, N. WNT/ β -Catenin Signaling in Vertebrate Eye Development. **Front Cell Dev. Biol.** V. 30, n. 4, p.:138, 2016. doi: 10.3389/fcell.2016.00138.

FUJIYABU, C.; SATO, K.; NISHIO, Y.; IMAMOTO, Y.; OHUCHI, H.; SHICHIDA, Y.; YAMASHITA, T. Amino acid residue at position 188 determines the UV-sensitive bistable property of vertebrate non-visual opsin *Opn5*. **Commun Biol.** V. 5, n. 1, p.:63, 2022. doi: 10.1038/s42003-022-03010-x.

FULLER, R. C.; CARLETON, K. L.; FADOOL, J. M.; SPADY, T. C.; TRAVIS, J. (2005). Genetic and environmental variation in the visual properties of bluefin killifish, *Lucania goodei*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 18, n. 3, p.: 516– 523, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.00886.x>

FULLER, R.C.; CLARICOATES, K.M. Rapid light-induced shifts in opsin expression: finding new opsins, discerning mechanisms of change, and implications for visual sensitivity. **Mol Ecol.** V. 20, n. 16, p.:3321-35, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05180.x.

GALE, S.D.; MURPHY, G.J. Distinct cell types in the superficial superior colliculus project to the dorsal lateral geniculate and lateral posterior thalamic nuclei. **J Neurophysiol.** V. 120, n.3, p.:1286-1292, 2018. doi: 10.1152/jn.00248.2018.

GAREISS, M.; EBERHARDT, K.; KRÜGER, E.; KANDERT, S.; BÖHM, C.; ZENTGRAF, H.; MÜLLER, C.R.; DABAUVALLE, M.C. Emerin expression in early development of *Xenopus laevis*. **Eur J Cell Biol.** V. 84, n. 2-3, p.:295-309, 2005. doi: 10.1016/j.ejcb.2004.11.006.

GEHRING, W.J. The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types. **Zoology.**, v. 104, p. 171–83, 2002.

GEHRING, W.; ROSBASH, M. The co-evolution of blue-light photoreception and circadian rhythms. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 1, p.: S286-9, 2003. doi: 10.1007/s00239-003-0038-8.

GEHRING, W.; SEIMIYA, M. Eye evolution and the origin of Darwin's eye prototype. **Italian Journal of Zoology**, v. 77, n. 2, p.: 124-136, 2010.

GEHRING, W.J.; IKEO, K. *Pax6*: Mastering eye morphogenesis and eye evolution. **Trends Genet**, v. 15, p.:371-377, 1999.

GESTRI, G.; LINK, B.A.; NEUHAUSS, S.C. The visual system of zebrafish and its use to model human ocular diseases. **Dev Neurobiol.** V. 72, n. 3, p.:302-27, 2012. doi: 10.1002/dneu.20919.

GILBERT, S.F. Emergence of the Ectoderm: Central Nervous System and Epidermis. In: Aquadro A (org) *Developmental Biology*, 10o ed. ANDREW; D.; SINAUER, SUNDERLAND, p 333–374, 2014.

GILLIAM, J. C.; CHANG, J. T.; SANDOVAL, I. M.; ZHANG, Y.; LI, T.; PITTLER, S. J. Three-dimensional architecture of the rod sensory cilium and its disruption in retinal neurodegeneration. **Cell**, v. 151, p.: 1029–1041, 2012. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.038

GIGER, F. A.; HOUART, C. The birth of the eye vesicle: when fate decision equals morphogenesis. **Front. Neurosci.** v. 12, p.:87, 2018. doi: 10.3389/fnins.2018. 00087

GRABHERR, M.G.; HAAS, B.J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J.Z.; THOMPSON, D.A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACOEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; DI PALMA, F.; BIRREN, B.W.; NUSBAUM, C.; LINDBLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nat Biotechnol.** v. 29, n. 7, p.644-52, 2011.

GRAMAGE, E.; LI, J.; HITCHCOCK, P. The expression and function of midkine in the vertebrate retina. **Br J Pharmacol.**, v. 171, n. 4, p. :913-23, 2014. DOI: 10.1111/bph.12495.

GRUENBAUM, Y.; FOISNER, R. Lamins: Nuclear Intermediate Filament Proteins with Fundamental Functions in Nuclear Mechanics and Genome Regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, n. 1,p.: 131–164, 2015. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034115

GOJOBORI, J.; INNAN, H. Potential of fish opsin gene duplications to evolve new adaptive functions. **Trends in genetics**, v. 25, p.: 198–202, 2009.

GUÉRIN, L.P.; LE-BEL, G.; DESJARDINS, P.; COUTURE, C.; GILLARD, E.; BOISSELIER, É.; BAZIN, R.; GERMAIN, L.; GUÉRIN, S.L. The Human Tissue-Engineered Cornea (hTEC): Recent Progress. **Int J Mol Sci.**, v. 22, n. 3, p.:129, 2021. doi: 10.3390/ijms22031291.

GUIDO, M. E. E.; GARBARINO-PICO, M. A.; CONTIN, D. J.; VALDEZ, P. S.; NIETO, D. M.; VERRA, V. A.; ACOSTA-RODRIGUEZ, N. Z.; ROSENSTEIN, R. E. Inner retinal circadian clocks and non- visual photoreceptors: Novel players in the circadian system. **Prog. Neurobiol.**, v. 92, p.: 484–504, 2010.

HAAS, B.J.; PAPANICOLAOU, A.; YASSOUR, M.; GRABHERR, M.; BLOOD, P.D.; BOWDEN, J.; COUGER, M.B.; ECCLES, D.; LI, B.; LIEBER, M. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. **Nat Protoc.**, v. 8, p.:1494–1512, 2013. doi: 10.1038/nprot.2013.084

HAGEN, L.A.; GILSON, S.J.; AKRAM, M.N.; BARAAS, R.C. Emmetropia Is Maintained Despite Continued Eye Growth From 16 to 18 Years of Age. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 60, n. 13, p.:4178-4186, 2019 doi: 10.1167/iovs.19-27289.

HALDER, G.; CALLAERTS, P.; GEHRING, W. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. **Science**. v. 267, n. 5205, p.1788-92, 1995.

HALDER, K.; HALDER, R.; CHOWDHURY, S. Genome-wide analysis predicts DNA structural motifs as nucleosome exclusion signals. **Mol Biosyst.** v. 5, n. 12, p.:1703-12, 2009. doi: 10.1039/b905132e.

HALSTENBERG, S.; LINDGREN, K.M.; SAMAGH, S.P.S.; NADAL-VICENS, M.; BALT, S, *ET AL.* Diurnal rhythm of cone opsin expression in the teleost fish *Haplochromis burtoni*. **Vis Neurosci**, v. 22, p.: 135–141, 2005. doi:10.1017/S0952523805222022.

HAMMOND, G.M.; YOUNG, R.D.; MUIR, D.D.; QUANTOCK, A.J. The microanatomy of Bowman's layer in the cornea of the pig: Changes in collagen fibril architecture at the corneoscleral limbus. **Eur. J. Anat.** V. 24, n. 5, p.: 399-406, 2020.

HARADA, T., HARADA, C.; PARADA, L. F. Molecular regulation of visual system development: more than meets the eye. **Genes & Development**. v. 21, n. 4, p.:367-78, 2007. doi: 10.1101/gad.1504307.

HARA, S.; KAWASAKI, S.; YOSHIHARA, M.; WINEGARNER, A.; BUSCH, C., TSUJIKAWA, M. Transcription factor TFAP2B up-regulates human corneal endothelial cell-specific genes during corneal development and maintenance. **J. Biol. Chem.** V. 294, p.: 2460–2469, 2019. doi: 10.1074/jbc.ra118.005527

HAZLERIGG, D.G.; WAGNER, G.C. Seasonal photoperiodism in vertebrates: from coincidence to amplitude. **Trends Endocrinol Metab.** V. 17, n. 3, p.:83–91, 2006. doi: 10.1016/j.tem.2006.02.004.

HEAD, M.W.; SEDOWOFIA, K.; CLAYTON, R.M. Beta B2-crystallin in the mammalian retina. **Exp Eye Res.**, v. 61, p.:423-8, 1995.

HEAVNER, W.; PEVNY, L. Eye development and retinogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v. 4, n. 12, p.:a008391, 2012. doi: 10.1101/cshperspect.a008391

HENZE, M.J.; OAKLEY, T.H. The Dynamic Evolutionary History of Pancrustacean Eyes and Opsins. **Integr Comp Biol.** V. 55, n. 5, p.:830-42, 2015. doi: 10.1093/icb/iev100.

HERZOG, E. D. Neurons and networks in daily rhythms. **Nature Rev. Neurosci.**, v. 8, p.:790–802, 2007.

HO, C.Y.; JAALOUK, D.E.; VARTIAINEN, M.K.; LAMMERDING, J. Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics. **Nature.** V. 497, n. 7450, p.:507-11, 2013. doi: 10.1038/nature12105.

HODEL, C.; NEUHAUSS, S.C.F.; BIEHLMAIER, O. Time course and development of light adaptation processes in the outer zebrafish retina. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**, v. 288, p.: 653–662, 2006. doi:10.1002/ar.a.20329.

HOFEMEISTER, H.; KUHN, C.; FRANKE, W.W.; WEBER, K.; STICK, R. Conservation of the gene structure and membrane-targeting signals of germ cell-specific lamin LIII in amphibians and fish. **European journal of cell biology.** V. 81, p.:51-60, 2002. doi: <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00229>

HOFMANN, C.M.; CARLETON, K.L. Gene duplication and differential gene expression play an important role in the diversification of visual pigments in fish. **Integr Comp Biol.**, v. 49, n.6, p.:630-43, 2009. DOI: 10.1093/icb/icp079.

HOFMANN, C.M.; O'QUIN, K.E.; SMITH, A.R.; CARLETON, K.L. Plasticity of opsin gene expression in cichlids from Lake Malawi. **Mol Ecol.** v. 19, p.:2064–74, 2010.

HOLT, I.; OSTLUND, C.; STEWART, C.L.; MAN, N.T.; WORMAN, H.J.; MORRIS, G.E. Effect of pathogenic mis-sense mutations in lamin A on its interaction with emerin *in vivo*. **J. Cell Sci.** V. 116, p.:3027–3035, 2003. doi: 10.1242/jcs.00599.

HONG, Y.; LUO, Y. Zebrafish Model in Ophthalmology to Study Disease Mechanism and Drug Discovery. **Pharmaceuticals (Basel).** v. 14, n. 8, p.:716, 2021. doi: 10.3390/ph14080716.

HORNSBY, M.A.W.; SABBAAH, S.; ROBERTSON, R.M.; HAWRYSHYN, C.W. Modulation of environmental light alters reception and production of visual signals in *Nile tilapia*. **J Exp Biol.** V. 216, p.:3110–22, 2013.

HUANG DA W.; SHERMAN, B.T.; LEMPICKI, R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature Protocols.** v. 4, n. 1, p. 44–57, 2009.

HULL, C.; STUDHOLME, K.; YAZULLA, S.; VON GERSDORFF, H. Diurnal changes in exocytosis and the number of synaptic ribbons at active zones of an ON-type bipolar cell terminal. **J Neurophysiol**, v. 96, p.: 2025–2033, 2006. doi:10.1152/jn.00364.2006.

HUNT, D. M.; HANKINS, M.W.; COLLIN, S.P.; MARSHALL, N.J. **Evolution of visual and non-visual pigments.** In: The Evolution of Invertebrate Photopigments and Photoreceptors. THOMAS, W.; CRONIN.; MEGAN L. PORTER. Boston, MA: Springer, v. 04, 2014.

HUTCHISON, C.J. Lamins: building blocks or regulators of gene expression? **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** V. 3, p.:848–858, 2002.

HUTCHISON, C.J.; ALVAREZ-REYES, M.; VAUGHAN, O.A. Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? **J Cell Sci.** V.114, p.:9-19, 2001.

ISOLDI, M.C.; ROLLAG, M.D.; CASTRUCCI, A.M.L.; PROVENCIO, I. Rhabdomic phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. **PNAS**, v. 102, p: 1217–1221, 2005.

IKEDA, R.G.P.; SILVA, J.M.B.; MIRANDA, S.C.S. Morfometria do tralhoto, *Anableps anableps* (Linnaeus, 1758), do estuário de Caratateua - Curuçá - Pará. **Bol Téc Cient CEPNOR.** V. 5, n. 1, p.:93-103, 2005.

IKKALA, K.; STRATOULIAS, V.; MICHON, F. Unilateral corneal insult in Zebrafish results in a bilateral cell shape and identity modification, supporting wound closure. **Scientific Reports**, v. 161, 2022. doi: 10.1038/s41598-021-04086-x

INGA, A.; FROLAND, S.; DAVID, W. Circadian Clocks in Fish—What Have We Learned so far? **Biology**, v. 8, n. 17, 2019.; doi:10.3390/biology8010017

INGRAM, N.T.; SAMPATH, A.P.; FAIN, G.L. Why are rods more sensitive than cones? **Journal of Physiology**, v. 594, p.: 5415–5426, 2016.

IYER, K.V.; TAUBENBERGER, A.; ZEIDAN, S.A.; DYE, N.A.; EATON, S.; JÜLICHER, F. Apico-basal cell compression regulates Lamin A/C levels in epithelial tissues. **Nat Commun.** V. 12, n. 1, p.:1756, 2021. doi: 10.1038/s41467-021-22010-9.

JAAFAR, Z.; POLGAR, G.; ZAMRONI, Y. Description of a new species of *Periophthalmus* (Teleostei: Gobiidae) from the Lesser Sunda Islands. **Raffles Bull. Zool**, v. 64, p. 278-283, 2016.

JEFFERY, W.R. *Astyanax* surface and cave fish morphs. **Evodevo.** V. 11, p.:14, 2020. doi: 10.1186/s13227-020-00159-6.

JOLY, J.S.; RECHER, G.; BROMBIN, A.; NGO, K.; HARTENSTEIN, V. A Conserved Developmental Mechanism Builds Complex Visual Systems in Insects and Vertebrates. **Curr Biol.**, v. 26, n. 20, p.:R1001-R1009, 2016. doi: 10.1016/j.cub.2016.08.017.

JOSEPH, R.; SRIVASTAVA, O.P.; PFISTER, R.R. Differential epithelial and stromal protein profiles in keratoconus and normal human corneas. **Exp Eye Res.**, v. 92, v 4, p.:282-98, 2011. doi: 10.1016/j.exer.2011.01.008.

KAMKAR, S.; MOGHADDAM, H.A.; LASHGARI, R. Early Visual Processing of Feature Saliency Tasks: A Review of Psychophysical Experiments. **Front Syst Neurosci.** V. 26, n. 12, p.:54, 2018. doi: 10.3389/fnsys.2018.00054.

KARAGIC, N.; HÄRER, A.; MEYER, A.; TORRES-DOWDALL, J. Heterochronic opsin expression due to early light deprivation results in drastically shifted visual sensitivity in a

cichlid fish: Possible role of thyroid hormone signaling. **J Exp Zool B Mol Dev Evol.** V. 330, n. 4, p.:202-214, 2018. doi: 10.1002/jez.b.22806.

KATSUYAMA, T.; SUGAWARA, T.; TATSUMI, M.; OSHIMA, Y.; GEHRING, W. J.; AIGAKI, T.; KURATA, S. Involvement of winged eye encoding a chromatin-associated bromo- adjacent homology domain protein in disc specification. **PNAS.** V. 102, p.: 15918–15923, 2005.

KELLEY, J.L.; DAVIES, W.I.L. The Biological Mechanisms and Behavioral Functions of Opsin-Based Light Detection by the Skin. **Front. Ecol. Evol.**, v. 4, n. 106, 2016. Doi: <https://doi.org/10.3389/fevo.2016.00106>

KIM, U.S.; MAHROO, O.A.; MOLLON, J.D.; YU-WAI-MAN, P. Retinal Ganglion Cells-Diversity of Cell Types and Clinical Relevance. **Front Neurol.** V. 12, p.:661938.2021. doi: 10.3389/fneur.2021.661938.

KIMBREL, E.A.; LANZA, R. Current status of pluripotent stem cells: Moving the first therapies to the clinic. **Nat Rev Drug Discov.** v. 14, p.:681–692, 2015 doi: 10.1038/nrd4738

KITAHASHI, T.; KUROKAWA, D.; OGISO, S.; SUZUKI, N.; ANDO, H. Light-induced and circadian expressions of melanopsin genes *opn4xa* and *opn4xb* in the eyes of juvenile grass puffer *Takifugu albophumbeus*. **Fish Physiol Biochem.** V. 47, n. 2, p.:191-202, 2021. doi: 10.1007/s10695-020-00901-w.

KOCH, K.W.; DELL'ORCO, D. Protein and Signaling Networks in Vertebrate Photoreceptor Cells. **Front Mol Neurosci.** V. 8, p.:67, 2015. doi: 10.3389/fnmol.2015.00067.

KOJIMA, D.; MORI, S.; TORII, M.; WADA, A.; MORISHITA, R.; FUKADA, Y. UV-sensitive photoreceptor protein *OPN5* in humans and mice. **PLoS One**, v. 6, e26388, 2011.

KOJIMA, K.; MATSUTANI, Y.; YAMASHITA, T.; YANAGAWA, M.; IMAMOTO, Y.; YAMANO, Y.; *ET AL.* Adaptation of cone pigments found in green rods for scotopic vision through a single amino acid mutation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 114, p.:5437–5442, 2017. DOI: 10.1073/pnas.1620010114.

KORENBROT, J.; FERNALD, R. Circadian rhythm and light regulate opsin mRNA in rod photoreceptors. **Nature**, v. 337, 1989.

KOSHIMIZU, E.; IMAMURA, S.; QI, J.; TOURE, J.; VALDEZ, D.M, JR.; CARR, C.E.; HANAI, J.; KISHI, S. Embryonic senescence and laminopathies in a progeroid *zebrafish* model. **PLoS One.** V. 6, n. 3, p.:e17688, 2011. doi: 10.1371/journal.pone

KOYANAGI, M.; TAKANO, K.; TSUKAMOTO, H.; OHTSU, K.; TOKUNAGA, F.; TERAOKA, A. *Jellyfish* vision starts with cAMP signaling mediated by opsin-G(s) cascade. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 105, p.:15576 – 15580, 2008.

KOYANAGI, M.; TERAOKA, A. Diversity of animal opsin-based pigments and their optogenetic potential. **Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.** V.1837, p.: 710–716, 2014.

KOYANAGI, M.; WADA, S.; KAWANO-YAMASHITA, E.; HARA, Y.; KURAKU, S.; KOSAKA, S.; KAWAKAMI, K.; TAMOTSU, S.; TSUKAMOTO, H.; SHICHIDA, Y.;

TERAKITA, A. Diversification of non-visual photopigment parainopsin in spectral sensitivity for diverse pineal functions. **BMC Biol.** V. 15, p.:73, 2015. doi: 10.1186/s12915-015-0174-9.

KOZMIK, Z. The role of Pax genes in eye evolution. **Brain Res Bull**, v. 75, p.335–9, 2008. doi: 10.1016/j.brainresbull.2007.10.046

KRISHNAN, J.; ROHNER, N. Cavefish and the basis for eye loss. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, v. 372, n. 1713, p.:20150487, 2017. doi: 10.1098/rstb.2015.0487.

KRÖGER, R. H. Optical plasticity in fish lenses. **Prog Retin Eye Res.**, v. 34, p.:78-88, 2013. doi: 10.1016/j.preteyeres.2012.12.001

KRUMME, U.; CALDERÓN, M.A.; ECHTERHOFF, A. Intertidal migration of the four-eyed fish *Anableps anableps* in north Brazilian mangrove creeks. **Mar Ecol Prog Ser.** V. 509, p.:271-87, 2014. doi.org/10.3354/meps10863

KRYCZKA, T.; WYŁĘGAŁA, E.; DOBROWOLSKI, D.; MIDELFART, A. NMR spectroscopy of human eye tissues: a new insight into ocular biochemistry. **Scientific World Journal.** V. 2014, p:546192, 2014. doi: 10.1155/2014/546192.

LABRECQUE, N.; CERMAKIAN, N. Circadian Clocks in the Immune System. **J Biol Rhythms.** V. 30, n. 4, p.:277-90, 2015. DOI: 10.1177/0748730415577723.

LAGMAN, D.; CALLADO-PÉREZ, A.; FRANZÉN, I.E.; LARHAMMAR, D.; ABALO, X.M. Transducin duplicates in the zebrafish retina and pineal complex: differential specialisation after the teleost tetraploidisation. **PLoS One.** V. 10, n. 3, p.: e0121330, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0121330.

LAGMAN, D.; OCAMPO DAZA, D.; WIDMARK, J.; ABALO, X.M.; SUNDSTRÖM, G.; LARHAMMAR D. The vertebrate ancestral repertoire of visual opsins, transducin alpha subunits and oxytocin/vasopressin receptors was established by duplication of their shared genomic region in the two rounds of early vertebrate genome duplications. **BMC Evol Biol.**, v. 13, p.:238, 2013. DOI: 10.1186/1471-2148-13-238

LAMB, T. D. Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina. **Progress in retinal and eye research**, v. 36, p.: 52-119, 2013.

LAMB, T.D.; HUNT, D.M. Evolution of the vertebrate phototransduction cascade activation steps. **Dev Biol.** V. 431, n.1, p.:77-92, 2017. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.03.018.

LAMB, T. D. Evolution of the genes mediating phototransduction in rod and cone photoreceptors. **Prog. Retin. Eye Res.** V. 76, p.:100823, 2020. doi: 10.1016/j.preteyeres.2019.100823

LE DOUR, C.; MACQUART, C.; SERA, F.; HOMMA, S.; BONNE, G.; MORROW, J. P.; ET AL. Decreased WNT/ β -catenin signalling contributes to the pathogenesis of dilated cardiomyopathy caused by mutations in the lamin a/C gene. **Hum. Mol. Genet.**, v. 26, p. 333–343, 2017. doi: 10.1093/hmg/ddw389

LI, H.; TIERNEY, C.W.; LWU, J.Y.; RAO, Y. A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate. **Development.**, v. 124, p.:603–615, 1997.

LI, P.; TEMPLE, S.; GAO, Y.; HAIMBERGER, T.J.; HAWRYSHYN, C.W.; *ET AL.* Circadian rhythms of behavioral cone sensitivity and long wavelength opsin mRNA expression: a correlation study in zebrafish. **J Exp Biol.**, v. 208, p.: 497–504, 2005. doi:10.1242/jeb.01424.

LI, Y.N.; TSUJIMURA, T.; KAWAMURA, S.; DOWLING, J.E. Bipolar cell photoreceptor connectivity in the zebrafish (*Danio rerio*) retina. **J Comp Neurol**, v. 520, p.: 3786–3802, 2012. doi:10.1002/cne.23168.

LIU, H.; PROKOSCH, V. Energy Metabolism in the Inner Retina in Health and Glaucoma. **Int J Mol Sci.** V. 22, n. 7, p.:3689, 2021. doi: 10.3390/ijms22073689.

LIU, J.; ROLEF BEN-SHAHAR, T.; RIEMER, D.; TREININ, M.; SPANN, P.; WEBER, K.; FIRE, A.; GRUENBAUM, Y. Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes. **Mol Biol Cell.** V. 11, n. 11, p.:3937-47, 2000. doi: 10.1091/mbc.11.11.3937.

LIU, Y.; BERENDSEN, A. D.; JIA, S.; LOTINUN, S.; BARON, R.; FERRARA, N.; *ET AL.* Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. **J. Clin. Invest.** V.122, p. 3101–3113, 2012. doi: 10.1172/JCI61209

LWIGALE, P. Y. “Chapter Four–corneal development: different cells from a common progenitor,” in **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, eds J. F. Hejtmancik and J. M. Nickerson (Cambridge, MA: Academic Press), 43–59, 2015.

LOURIM, D.; KEMPF, A.; KROHNE, G. Characterization and quantitation of three B-type lamins in *Xenopus* oocytes and eggs: Increase of lamin LI protein synthesis during meiotic maturation. **J. Cell Sci.** V. 109, p.:1775–1785, 1996.

LOWREY, P.; TAKAHASHI, J. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. **Annual review of genomics and human genetics.** V. 5, p.:407–441, 2004.

LUCAS, R.J.; HATTAR, S.; TAKAO, M.; BERSON, D.M.; FOSTER, R.G.; YAU, K.W. Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. **Science.** V. 299, p.:245–7, 2003.

LUEHRMANN, M.; STIEB, S.M.; CARLETON, K.L.; PIETZKER, A.; CHENEY, K.L.; MARSHALL, N.J. Short-term colour vision plasticity on the reef: changes in opsin expression under varying light conditions differ between ecologically distinct fish species. **J Exp Biol.** V. 16; n. 221p.: jeb175281, 2018. doi: 10.1242/jeb.175281.

LUPŠE, N.; CORTESI, F.; FREESE, M.; MAROHN, L.; POHLMANN, J.D.; WYSUJACK, K.; HANEL, R.; MUSILOVA, Z. Visual Gene Expression Reveals a cone-to-rod Developmental Progression in Deep-Sea Fishes. **Mol Biol Evol.** V. 38, n. 12, p.:5664-5677, 2021. doi: 10.1093/molbev/msab281.

LWIGALE, P.Y. Corneal Development: Different Cells from a Common Progenitor. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. v,134, p. 43-59, 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.04.003>.

LYTHGOE, J.N.; MUNTZ, W.R.; PARTRIDGE, J.C.; SHAND, J.; WILLIAMS, D.M. The ecology of the visual pigments of snappers (Lutjanidae) on the Great Barrier Reef. **Journal of Comparative Neurology**. V. 174, p. 461–467, 1994. DOI.org/10.1007/BF00191712

MACIVER, M.A.; SCHMITZ, L.; MUGAN, U.; MURPHEY, T.D.; MOBLEY, C.D. Massive increase in visual range preceded the origin of terrestrial vertebrates. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 114, n.12, p.:e2375-E2384, 2017. doi: 10.1073/pnas.1615563114.

MADEIRA, M.H.; BOIA, R.; SANTOS, P.F.; AMBRÓSIO, A.F.; SANTIAGO, A.R. Contribution of microglia-mediated neuroinflammation to retinal degenerative diseases. **Mediators Inflamm**. V. 2015, p.: 673090, 2015. doi: 10.1155/2015/673090.

MADER, M.M.; CAMERON, D.A. Photoreceptor differentiation during retinal development, growth, and regeneration in a metamorphic vertebrate. **J Neurosci**. V. 24, p.:11463–72, 2004.

MAHABADI, N.; AL KHALILI, Y. **Neuroanatomy, Retina**. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 31424894.

MAHLER, B.; CHEN, Y.; FORD, J.; THIEL, C.; WISTOW, G.; WU, Z. Structure and dynamics of the fish eye lens protein, γ M7-crystallin. **Biochemistry**., v. 52, n. 20, p.:3579-87, 2013. doi: 10.1021/bi400151c.

MAHROO, O.A.; BAN, V.S.; BUSSMANN, B.M.; COPLEY, H.C.; HAMMOND, C.J.; LAMB, T.D. Modelling the initial phase of the human rod photoreceptor response to the onset of steady illumination. **Doc Ophthalmol**. V. 124, n. 2, p.:125 –31, 2012.

MARILUZ, Bertha Ruth Zelada. **A base molecular das adaptações visuais de *Anableps anableps* e *Phreatobius cisternarum* através da análise de transcriptoma com ênfase nos genes das opsinas**. 2019. 105f. Tese (Doutorado em Neurociências e Biologia Celular). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, 2019.

MARSHALL, J. Vision and lack of vision in the ocean. **Current Biology**. v. 27, n. 11, p. R494-R502, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.03.012>.

MARTINO, F.; PERESTRELO, A. R.; VINARSKI, V.; PAGLIARI, S.; FORTE, G. Cellular mechanotransduction: from tension to function. **Front. Physiol.**, v. 9, p.:824, 2018. doi: 10.3389/fphys.2018.00824

MASRI, R.A.; WELTZIEN, F.; PURUSHOTHUMAN, S.; LEE, S.C.S.; MARTIN, P.R.; GRÜNERT, U. Composition of the Inner Nuclear Layer in Human Retina. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. V. 62, n. 9, p.:22, 2021. doi: 10.1167/iovs.62.9.22.

MASUKO, K.; FURUHASHI, H.; KOMABA, K.; NUMAO, E.; NAKAJIMA, R.; FUSE, N.; KURATA, S. Nuclear Lamin is required for Winged Eye-mediated transdetermination of *Drosophila* imaginal disc. **Genes Cells**. V. 2, 2018 doi: 10.1111/gtc.12608.

MATOS-CRUZ, V.; BLASIC, J.; NICKLE, B.; ROBINSON, P.R.; HATTAR, S.; HALPERN, M.E. Unexpected diversity and photoperiod dependence of the *zebrafish* melanopsin system. **PLoS One**. V. 6, n. 9, p.: e25111, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0025111.

MCFARLAND, W. Light in the sea: The optical world of elasmobranchs. **Journal of Experimental Zoology**, v. 256, n. S5, p. 3-12. doi: <https://doi.org/10.1002/jez.1402560503>

MEISNER, A. D.; BURNS, J.R. Testis andropodial development in a viviparous halfbeak, *Dermogenys sp.* (Teleostei: Anablepidae). **Copeia**, v. 1, p.: 44-52, 1997.

MENG, F.; BRAASCH, I.; PHILLIPS, J.B.; LIN, X.; TITUS, T.; ZHANG, C.; POSTLETHWAIT, J.H. Evolution of the Eye Transcriptome under Constant Darkness in *Sinocyclocheilus* Cavefish, **Molecular Biology and Evolution**. V. 30, n. 7, p.:1527–1543, 2013. doi.org/10.1093/molbev/mst079

MENGER, G.J.; KOKE, J.R.; CAHILL, G.M. Diurnal and circadian retinomotor movements in zebrafish. **Vis Neurosci**, v. 22, p.: 203–209, 2005. doi:10.1017/S0952523805222083.

MICHEL, K.B.; AERTS, P.; GIBB, A.C.; WASSENBERGH, S.V. Functional morphology and kinematics of terrestrial feeding in the largescale foureyes (*Anableps anableps*). **J Exp Biol**. V. 218, p.:2951-60, 2015.

MILLER, R. R. Ecology, habits and relationships of the middle American cuatro ojos, *Anableps dowi* (Pisces: Anablepidae). **Copeia**, v. 1979, p. 82–91, 1979.

MOIR, R.D.; YOON, M.; KHUON, S.; GOLDMAN, R.D. 2000. Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells. **J. Cell Biol**. V.151, p.:1155–1168. doi: 10.1083/jcb.151.6.1155.

MOLDAY, R.S.; MORITZ, O.L. Photoreceptors at a glance. **J Cell Sci**. V.128, n. 22, p.:4039-4045, 2015. doi:10.1242/jcs.175687

MOUTSAKI, P.; WHITMORE, D.; BELLINGHAM, J.; SAKAMOTO, K.; DAVID-GRAY, Z.K.; FOSTER, R.G. Teleost multiple tissue (tmt) opsin: a candidate photopigment regulating the peripheral clocks of zebrafish? **Brain Res Mol Brain Res.**, v. 112, n. 1-2, p.:135-45, 2003. doi: 10.1016/s0169-328x(03)00059-7.

MUENKE, M.; COHEN, M.M. Genetic approaches to understanding brain development: Holoprosencephaly as a model. **Ment Retard Dev Disabil Res Rev.**, v. 6, p.:15–21, 2000.

MUNZ, F.W.; MCFARLAND W.N. The Significance of Spectral Position in the Rhodopsins of Tropical Marine Fishes. **Vision Research**. V. 13, p. 1829–1874, 1973 DOI.org/10.1016/0042-6989(73)90060-6

MURE, L.S. Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells of the Human Retina. **Front Neurol**. V. 25, n. 12, p.:636330, 2021. doi: 10.3389/fneur.2021.636330.

MUSILOVA, Z.; SALZBURGER, W.; CORTESI, F. The Visual Opsin Gene Repertoires of Teleost Fishes: Evolution, Ecology, and Function. **Annu Rev Cell Dev Biol**. V. 6; n. 37, p.:441-468, 2021. doi: 10.1146/annurev-cellbio-120219-024915.

NELSON, J.S.; GRANDE, T.C.; WILSON, M.V.H. **Fishes of the World**. Fifth Edition. 2016. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey: [i]-xli, 1-707.

NGUYEN, M.T.; VEMARAJU, S.; NAYAK, G.; ODAKA, Y.; BUHR, E.D.; ALONZO, N.; TRAN, U.; BATIE, M.; UPTON, B.A.; DARVAS, M.; KOZMIK, Z.; RAO, S.; HEGDE, R.S.; IUVONE, P.M.; VAN GELDER, R.N.; LANG, R.A. An opsin 5-dopamine pathway mediates light-dependent vascular development in the eye. **Nat Cell Biol**. V. 21, n. 4, p.:420-429, 2019. doi: 10.1038/s41556-019-0301-x.

NGUYEN-LEGROS, J.; HICKS, D. Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium. **Int Rev Cytol.**, v. 196, p.: 245–313, 2000.

NIE, K.; WANG, K.; HUANG, D.F.; HUANG, Y.B.; YIN, W.; REN, D.L.; WANG, H.; HU, B. Effects of circadian clock protein Per1b on zebrafish visual functions. **Chronobiol Int.**, v. 35, p.:160-168, 2018.

NIETO, P.S.; VALDEZ, D.J.; ACOSTA-RODRIGUEZ, V.A.; GUIDO, M.E. Expression of novel opsins and intrinsic light responses in the mammalian retinal ganglion cell line RGC-5. Presence of OPN5 in the rat retina. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p.: e26417, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0026417.

NILSSON, D.E. The evolution of eyes and visually guided behaviour. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, v. 364, n. 1531, p.:2833-47, 2009. doi: 10.1098/rstb.2009.0083

NOTARA, M.; LENTZSCH, A.; CORONEO, M.; CURSIEFEN, C. The Role of Limbal Epithelial Stem Cells in Regulating Corneal (Lymph)angiogenic Privilege and the Micromilieu of the Limbal Niche following UV Exposure. **Stem Cells Int**. v. 2018, p.:8620172, 2018. doi: 10.1155/2018/8620172.

NOVAES, J. L. C.; ANDREATA, J.V. Aspectos reprodutivos de *Jenynsia lineata Jenyns*, 1842 (Osteichthyes, Anablepidae) da lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro. **Acta Biológica Leopoldensia**. V. 13, n. 2, p.: 129-139, 1996.

OAKLEY, T.H.; PLACHETZKI, D.C. The Evolution of Opsins. **Encyclopedia of the Eye**, p.: 82-88, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374203-2.00150-0>.

OGURA, A.; YOSHIDA, M.A.; MORITAKI, T.; OKUDA, Y.; SESE, J.; SHIMIZU, K.K.; SOUSOUNIS, K.; TSONIS, P.A. Loss of the six3/6 controlling pathways might have resulted in pinhole-eye evolution in *Nautilus*. **Sci Rep**. V. 3, p.:1432, 2013. doi: 10.1038/srep0143

OKANO, T.; YOSHIKAWA, T.; FUKADA, Y. Pinopsin is a chicken pineal photoreceptive molecule. *Nature*, 372, 94-97, 1994.

OLIVEIRA, F.G.; COIMBRA, J.P.; YAMADA, E.S.; MONTAG, L.F.; NASCIMENTO, F.L.; OLIVEIRA, V.A.; DA MOTA, D.L.; BITTENCOURT, A.M.; DA SILVA, V.L.; DA COSTA, B.L. Topographic analysis of the ganglion cell layer in the retina of the four-eyed fish *Anableps anableps*. **Vis Neurosci**, v. 23, n.6, p. 879-86, 2006.

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 Amazon Estuary. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 4, p: 757-766, 2011.

OTA, W.; NAKANE, Y.; HATTAR, S.; YOSHIMURA, T. Impaired Circadian Photoentrainment in *Opn5*-Null Mice. **iScience**. V. 6, p. :299-305, 2018. doi: 10.1016/j.isci.2018.08.010.

OWENS, G.L.; WINDSOR, D.J.; MUI, J.; TAYLOR, J.S. A fish eye out of water: ten visual opsins in the four-eyed fish, *Anableps anableps*. **PLoS One**. v.4, v. 6, p.: e5970, 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, n. 1, p. 86-89, 2011.

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. doi:10.1098/rsbl.2011.0582.

PAHLBERG, J.; SAMPATH, A.P. Visual threshold is set by linear and nonlinear mechanisms in the retina that mitigate noise: how neural circuits in the retina improve the signal-to-noise ratio of the single-photon response. **Bioessays**. V. 33, n. 6, p.:438-47, 2011. doi: 10.1002/bies.201100014.

PALCZEWSKI, K. Chemistry and biology of vision. **J Biol Chem**. V. 287, n. 3, p.:1612-9, 2012. doi: 10.1074/jbc.R111.301150.

PANTAZOPOULOS, H.; GAMBLE, K.; STORK, O.; AMIR, S. Circadian Rhythms in Regulation of Brain Processes and Role in Psychiatric Disorders. **Neural Plast.**, v. 17; p.5892657, 2018. DOI: 10.1155/2018/5892657.

PARTCH, C.L.; GREEN, C.B.; TAKAHASHI, J.S. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. **Trends Cell Biol**. V. 24, n. 2, p.:90-9, 2014. doi: 10.1016/j.tcb.2013.07.002

PARTRIDGE, J.C.; DOUGLAS, R.H.; MARSHALL, N.J.; CHUNG, W.S.; JORDAN, T.M.; WAGNER, H.J. Reflecting optics in the diverticular eye of a deep-sea barreleye fish (*Rhynchohyalus natalensis*). **Proc Biol Sci**. V. 281, n. 1782, p.:20133223, 2014. doi: 10.1098/rspb.2013.3223.

PATEL, A.; SOWDEN, J.C. Genes and pathways in optic fissure closure. **Semin. Cell Dev. Biol**. V. 91, p.:55-65, 2019. doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.010.

PEREZ, L.N.; LORENA, J.; COSTA, C.M.; ARAUJO, M.S.; FROTA-LIMA, G.N.; MATOS-RODRIGUES, G.E.; MARTINS, R.A.P.; MATTOX, G.M.T.; SCHENIDER, P.N. Eye development in the four-eyed fish *Anableps anableps*: cranial and retinal adaptations to simultaneous aerial and aquatic vision. **Proc R Soc London B**. v. 284, p.1–8, 2017.

PERIS-MARTÍNEZ, C.; GARCÍA-DOMENE, M.C.; PENADÉS, M.; LUQUE, M.J.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ E.; ARTIGAS, J.M. Spectral Transmission of the Human Corneal Layers. **J Clin Med**. V. 10, n. 19, p.:4490, 2021. doi: 10.3390/jcm10194490.

PHILP, A.R.; GARCIA-FERNANDEZ, J.M.; SONI, B.G.; LUCAS, R.J.; BELLINGHAM, J.; FOSTER, R.G. Vertebrate ancient (VA) opsin and extraretinal photoreception in the Atlantic salmon (*Salmo salar*). **J Exp Biol**, v. 203, p.: 1925-1936, 2000.

PIERCE, M.E.; SHESHBERADARAN, H.; ZHANG, Z.; FOX, L.E.; APPLEBURY, M.; *et al.* Circadian Regulation of Iodopsin Gene Expression in Embryonic Photoreceptors in ‘Retinal Cell Cult & e. **Neuron**, v. 10, p. 579–584, 1993.

PIGLIUCCI, M.; MURREN, C.J.; SCHLICHTING, C.D. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. **J. Exp. Biol.** V. 209, p.: 2362–2367, 2006. doi:10.1242/jeb.02070

PORTER, M.L.; BLASIC, J.R.; BOK, M.J.; CAMERON, E.G.; PRINGLE, T.; CRONIN, T.W.; ROBINSON, P.R. Shedding new light on opsin evolution. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, p.:3–14, 2012. DOI 10.1098/rspb.2011.1819.

PURVES, DALE; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W.C.; LAMANTIA, A.S.; MCNAMARA, J.O.; WHITE, L.E. **Neurociências**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

PRASAD, S.; GALETTA, S.L. Anatomy and physiology of the afferent visual system. **Handb Clin Neurol**. V. 102, p.:3-19,2011. doi: 10.1016/B978-0-444-52903-9.00007-8.

QUINN, P.M.J.; WIJNHOLDS, J. Retinogenesis of the Human Fetal Retina: An Apical Polarity Perspective. **Genes**. V. 10, n. 12, p.:987, 2019. doi: 10.3390/genes10120987.

RAZAFSKY, D.S.; WARD, C.L.; KOLB, T.; HODZIC, D. Developmental regulation of linkers of the nucleoskeleton to the cytoskeleton during mouse postnatal retinogenesis. **Nucleus**. V. 4, n. 5, p.:399-409, 2013. doi: 10.4161/nucl.26244.

RICHARDSON, R.; TRACEY-WHITE, D.; WEBSTER, A.; MOOSAJEE, M. The zebrafish eye-aparadigm for investigating human ocular genetics. **Eye**. V. 31, p.:68-86, 2017. doi: 10.1038/eye.2016.198

RIEMER, D.; STUURMAN, N.; BERRIOS, M.; HUNTER, C.; FISHER, P.A.; WEBER, K. Expression of Drosophila lamin C is developmentally regulated: analogies with vertebrate A-type lamins. **J Cell Sci**. V. 108, n. 10, p.:3189-98, 1995. doi: 10.1242/jcs.108.10.3189.

ROLLAG, M.D.; BERSON, D.M.; PROVENCIO, I. Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. **J. Biol. Rhythm.**, v. 18, 227–234, 2003.

SALGADO, D.; MARILUZ, B.R.; ARAUJO, M.; LORENA, J.; PEREZ, L.N.; RIBEIRO, R.D.L.; SOUSA, J.D.F.; SCHNEIDER, P.N. Light-induced shifts in opsin gene expression in the four-eyed fish *Anableps anableps*. **Frontiers in Neuroscience**. v . 16, p.: 995469, 2022. doi: 10.3389/fnins.2022.995469

SAEZ, A.; HERRERO-FERNANDEZ, B.; GOMEZ-BRIS, R.; SOMOVILLA-CRESPO, B.; RIUS, C.; GONZALEZ-GRANADO, J.M. Lamin A/C and the Immune System: One Intermediate Filament, Many Faces. **Int J Mol Sci.**, v. 21, n. 17, p.:6109, 2020. doi: 10.3390/ijms21176109.

SAIKIA, P.; MEDEIROS, C.S.; THANGAVADIVEL, S.; WILSON, S.E. Basement membranes in the cornea and other organs that commonly develop fibrosis. **Cell and Tissue Research**, v. 374, p. 439-453, 2018.doi: <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2934-7>

SAKAI, K.; YAMASHITA, T.; IMAMOTO, Y.; SHICHIDA, Y. Diversity of Active States in TMT Opsins. **PLoS One**. V. 10, n. 10, p.:e0141238, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0141238.

SAKAI, Y.; OHTSUKI, H.; KASAGI, S.; KAWAMURA, S.; KAWATA, M. Effects of light environment during growth on the expression of cone opsin genes and behavioral spectral sensitivities in guppies (*Poecilia reticulata*). **BMC Evol Biol.**, v.16, n. 1, p.:106, 2016. doi: 10.1186/s12862-016-0679-z.

SALESSE, C. Physiologie du signal visuel rétinien : de la phototransduction jusqu'au cycle visuel. **Journal Français d'Ophtalmologie**, v. 40, n. 3, p.: 239–250, 2017. doi:10.1016/j.jfo.2016.12.006

SANCHEZ VAZQUEZ, F. J.; LOPEZ-OLMEDA, J.F.; VERA, L. M.; MIGAUD, H.; LOPEZ-PATIÑO, M.A.; MÍGUEZ, J.M. Environmental cycles, melatonin and circadian control of stress response in fish. **Front. Endocrinol.**, v. 10, n. 279, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00279>

SANDKAM, B.A.; JOY, J.B.; WATSON, C.T.; GONZALEZ-BENDIKSEN, P.; GABOR, C.R.; BREDEEN, F. Hybridization leads to sensory repertoire expansion in a gynogenetic fish, the Amazon molly (*Poecilia formosa*): a test of the hybrid-sensory expansion hypothesis. **Evolution**. v. 67, n, 1, p.:120–30, 2013. doi: 10.1111/j.1558-5646.2012.01779.x

SATO, K., YAMASHITA, T., KOJIMA, K., SAKAI, K., MATSUTANI, Y., YANAGAWA, M., YAMANO, Y., WADA, A., IWABE, N., OHUCHI, H. & SHICHIDA, Y. Pinopsin evolved as the ancestral dim-light visual opsin in vertebrates. **Commun Biol.**, v. 1, p.: 156, 2018.

SATO, K.; NWE NWE, K.; OHUCHI, H. The Opsin 3/Teleost multiple tissue opsin system: mRNA localization in the retina and brain of medaka (*Oryzias latipes*). **Journal of comparative neurology**. V. 529, p.:2484-2516, 2021. doi:10.1002/cne.2510610.1002/cne.25106

SATO, K.; YAMASHITA, T.; HARUKI, Y.; OHUCHI, H.; KINOSHITA, M.; SHICHIDA, Y. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0155339.

SCHMITT, E.A.; DOWLING, J.E. Early eye morphogenesis in the *zebrafish*, *Brachydanio rerio*. **J Comp Neurol.**, v. 344, n. 4, p.: 532–542, 1994.

SCHOENEMANN, B.; PÄRNASTE, H.; CLARKSON, E. N. K. “Structure and function of a compound eye, more than half a billion years old”. **PNAS**, v. 114, p. 13489-13494, 2017. doi: 10.1073/pnas.1716824114

SCHOENEMANN, B. Evolution of Eye Reduction and Loss in Trilobites and Some Related Fossil Arthropods. **Emerging Science Journal**, v. 2, n. 5, 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.28991/esj-2018-01151>

SCHWAB, I.R.; HO, V.; ROTH, A.; BLANKENSHIP, T.N.; FITZGERALD, P.G. Evolutionary attempts at 4 eyes in vertebrates. **Trans Am Ophthalmol Soc.** v. 99, p.145-156, 2001.

SCHWASSMAN, H.O.; KRUGER, L. Organization of the visual projection upon the optic tectum of some freshwater fish. **J Comp Neurol.** v. 124, p.113-26, 1965. doi: 10.1002/cne.901240109.

SECKER, G.A.; DANIELS, J.T. Corneal epithelial stem cells: deficiency and regulation. **Stem Cell Rev.** V. 4, n. 3, p.:159-68, 2008. doi: 10.1007/s12015-008-9029-x.

SHAND, J.; DAVIES, W. L.; THOMAS, N.; BALMER, L.; COWING, J. A.; POINTER, M., HUNT, D. M. The influence of ontogeny and light environment on the expression of visual pigment opsins in the retina of the black bream, *Acanthopagrus butcheri*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 9, p.: 1495–1503, 2008. doi.org/10.1242/jeb.012047

SHICHIDA, Y.; MATSUYAMA, T. Evolution of opsins and phototransduction. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** V. 364, n. 1531, p.:2881-95, 2009. doi: 10.1098/rstb.2009.0051.

SHUBIN, N.; TABIN, C.; CARROLL, S. Deep homology and the origins of evolutionary novelty. **Nature.** v. 457, p. 818–823, 2009.

SNELL, R. S.; LEMP, M. A. **Clinical Anatomy of the Eye.** Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, 2013.

SIEBECK, U.E.; MARSHALL, N.J. Ocular media transmission of coral reef fish--can coral reef fish see ultraviolet light? **Vision Res.**, v. 41, n. 2, p.:133-49, 2001. DOI: 10.1016/s0042-6989(00)00240-6.

SILVER, S.J.; REBAY, I. Signaling circuitries in development: insights from the retinal determination gene network. **Development**, v. 132, p.:3–13, 2005. doi:10.1242/dev.01539.

SIMMICH, J.; TEMPLE, S.E.; COLLIN, S.P. A fish eye out of water: epithelial surface projections on aerial and aquatic corneas of the 'four-eyed fish' *Anableps anableps*. **Clin Exp Optom.** V. 95 , n. 2, p.:140-5, 2012. doi: 10.1111/j.1444-0938.2011.00701.x.

SINGH, S.V.; KUMAR, S. Circadian rhythm and their significance in relation to physiological functions of animals: A review. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 6, n. 4, p.: 1861-1866, 2018.

SIVAK, J.G. Optics of the eye of the "four-eyed fish" (*Anableps anableps*). **Vision Res.**, v. 16, n. 5, p.:531-4, 1976. doi: 10.1016/0042-6989(76)90035-3.

SMITH, A.R.; MA, K.; SOARES, D.; CARLETO, K.L. Relative LWS cone opsin expression determines optomotor thresholds in Malawi cichlid fish. **Genes, Brain and Behavior.** V. 11, n. 2, p.: 185-192, 2012.

STANKE, J.; MOOSE, H. E.; EL-HODIRI, H. M.; FISCHER, A. J. Comparative study of Pax2 expression in glial cells in the retina and optic nerve of birds and mammals. **J. Comp. Neurol.** 518, 2316–2333, 2010. doi: 10.1002/cne. 22335

SOLOVEL, I.; WANG, A.S.; THANISCH, K.; SCHMIDT, C.S.; KREBS, S.; ZWERGER, M.; COHEN, T.V.; DEVYS, D.; FOISNER, R.; PEICHL, L.; HERRMANN, H.; BLUM, H.; ENGELKAMP, D.; STEWART, C.L.; LEONHARDT, H.; JOFFE, B. LBR and lamin A/C

sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. **Cell**. V. 152, n. 3, p.:584-98, 2013. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.009.

SONG, S.; LANDSBURY, A.; DAHM, R.; LIU, Y.; ZHANG, Q.; QUINLAN, R. A. Functions of the intermediate filament cytoskeleton in the eye lens. **J Clin Invest**. V. 119, n. 7, p.:1837-48, 2009. doi: 10.1172/JCI38277.

SONODA, T.; SCHMIDT, T.M. Re-evaluating the Role of Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells: New Roles in Image-Forming Functions. **Integrative and Comparative Biology**. V. 56, n. 5, p.: 834–841, 2016. Doi <https://doi.org/10.1093/icb/icw066>

SQUIRE, L. R.; BLOOM, F. E.; SPITZER, N. C. **Fundamental Neuroscience**. 3. ed.

SRIDHAR. M.S. Anatomy of cornea and ocular surface. **Indian J Ophthalmol.**, v. 66, n. 2, p.:190-194, 2018. doi: 10.4103/ijo.IJO_646_17.

SRINIVAS, S.P. Dynamic regulation of barrier integrity of the corneal endothelium. **Optom Vis Sci.**, v. 87, n. 4, p.:E239-54, 2010. doi: 10.1097/OPX.0b013e3181d39464.

STENKAMP, D. L. Neurogenesis in the fish retina. **Int Rev Cytol.**, v. 259, p.:173-224, 2007. doi: 10.1016/S0074-7696(06)59005-9.

STENKAMP, D.L. Development of the Vertebrate Eye and Retina. **Prog Mol Biol Transl Sci.**, v. 134, p.:397-414, 2015. doi: 10.1016/bs.pmbts.2015.06.006.

STEPHEN, F.; ALTSCHUL, THOMAS, L.; MADDEN, A. A. ,SCHÄFFER, J. Z.; ZHENG, Z.; WEBB, M.; DAVID, J.L. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, **Nucleic Acids Research**, V. 25, n. 17, p.: 3389–3402, doi.org/10.1093/nar/25.17.3389

STIEB, S.M.; CORTESI, F.; SUEESS, L.; CARLETON, K.L.; SALZBURGER, W.; MARSHALL, N.J. Why UV vision and red vision are important for damselfish (Pomacentridae): structural and expression variation in opsin genes. **Mol Ecol**. V. 26, n. 5, p.:1323-1342, 2017. doi: 10.1111/mec.13968.

SUGIYAMA, Y.; LOVICU, F.J.; MCAVOY, J.W. Planar cell polarity in the mammalian eye lens. **Organogenesis**. V. 7, n. 3, p.:191-201, 2011. doi: 10.4161/org.7.3.18421.

SULLI, G.; MANOOGIAN, E.N.C.; TAUB, P.R.; PANDA, S. Training the circadian clock, clocking the drugs, and drugging the clock to prevent, manage, and treat chronic diseases. **Trends Pharmacol Sci**. V. 39, n. 9, p.:812–827, 2018. doi:10.1016/j.tips.2018.07.003

SWAMYNATHAN, S.K. ; CRAWFORD, M.A.; ROBISON, W.G.JR.; KANUNGO J.; PIATIGORSKY, J. Adaptive differences in the structure and macromolecular compositions of the air and water corneas of the ‘four-eyed’ fish (*Anableps anableps*). **Faseb J**, v. 17, p.1996–2005, 2003.

TACKENBERG, M.C.; MCMAHON, D.G. Photoperiodic Programming of the SCN and Its Role in Photoperiodic Output. **Neural Plast**. V. 9; p.:8217345, 2018. DOI: 10.1155/2018/8217345.

TAKAHASHI, J. S.; HONG, H.K.; KO, C. H.; MCDEARMON, E. L. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n.10, p.: 764–775, 2008. DOI:10.1038/nrg2430

TAKECHI, M & KAWAMURA, S. Temporal and spatial changes in the expression pattern of multiple red and green subtype opsin genes during zebrafish development. **Journal Exp. Biol.**, n. 208, p.:1337–1345, 2005. doi: 10.1242/jeb.015

TAMM, E. R. The Development of the Aqueous Humor Outflow Pathway. **Encyclopedia of the Eye**. p.16–21, 2010. doi:10.1016/b978-0-12-374203-2.00106-8

TARTTELIN, E.E.; BELLINGHAM, J.; HANKINS, M.W.; FOSTER, R.G.; LUCAS, R.J. Neuropsin (*Opn5*): a novel opsin identified in mammalian neural tissue. **FEBS Lett.** V. 554, n. 3, p.:410-6, 2003. doi: 10.1016/s0014-5793(03)01212-2.

TAYLOR, S.M.; LOEW, E. R.; GRACE, M.S. Ontogenic retinal changes in three ecologically distinct elopomorph fishes (Elopomorpha: Teleostei) correlate with light environment and behavior. **Vis Neurosci.**, v. 32, p.:E005. 2015. DOI: 10.1017/S0952523815000024.

TEMPLE, S.E.; PLATE, E.M.; RAMSDEN, S.; HAIMBERGER, T.J.; ROTH, W.M, *et al.* Seasonal cycle in vitamin A1/A2-based visual pigment composition during the life history of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **J Comp Physiol a Neuroethol Sens Neural Behav Physiol**, v. 192, p.: 301–313, 2006.

TERAKITA, A.; NAGATA, T. Functional properties of opsins and their contribution to light-sensing physiology. **Zoolog Sci.** V. 31, n. 10, p.:653-9, 2014. doi: 10.2108/zs140094.

TERAKITA, A.; YAMASHITA, E.K.; KOYANAGI, M. Evolution and diversity of opsin. **WIREs Membr Transp Signal.**, V. 1, p.1:104-111, 2012. doi: 10.1002/wmts.6

THOMAS, K.N.; GOWER, D.J.; BELL, R.C.; FUJITA, M.K.; SCHOTT, R.K.; STREICHER, J.W. Eye size and investment in frogs and toads correlate with adult habitat, activity pattern and breeding ecology. **Proc Biol Sci.** V. 287, n. 1935, p.:20201393, 2020. doi: 10.1098/rspb.2020.1393

TOMONARI, S.; MIGITA, K.; TAKAGI, A.; NOJI, S.; OHUCHI, H. Expression patterns of the opsin 5-related genes in the developing chicken retina. **Dev Dyn.** V. 237, n. 7, p.:1910-22, 2008. doi: 10.1002/dvdy.21611.

TORRES-DOWDALL, J.; PIEROTTI, M. E. R.; HÄRER, A.; KARAGIC, N.; WOLTERING, J. M.; HENNING, F., ... MEYER, A. Rapid and parallel adaptive evolution of the visual system of neotropical midas cichlid fishes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 10, p.: 2469–2485, 2017. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx143>

TOYAMA, R.; CHEN, X.; JHAWAR, N ET AL. Transcriptome analysis of the zebrafish pineal gland. **Developmental Dynamics**, v. 238, n. 7, pp. 1813–1826, 2009.

TURNER, C. L. The skeletal structure of the gonopodium and gonopodial suspensorium of *Anableps anableps*. **Journal of Morphology**, v. 86, p.: 329-365, 1950.

TREZISE, A.E.; COLLIN, S.P. Opsins: evolution in waiting. **Curr Biol.** V. 15, n. 19, p.:R794-6, 2005. doi: 10.1016/j.cub.2005.09.025.

TSAI, C.J.; MARINO, J.; ADAIXO, R.; PAMULA, F.; MUEHLE, J.; MAEDA, S.; FLOCK, T.; TAYLOR, N.M.; MOHAMMED, I.; MATILE, H.; DAWSON, R.J.; DEUPI, X.; STAHLBERG, H.; SCHERTLER, G. Cryo-EM structure of the rhodopsin-Gai- $\beta\gamma$ complex reveals binding of the rhodopsin C-terminal tail to the g β subunit. **Elife.** V. 8, p.:e46041, 2019. doi: 10.7554/eLife.46041.

TSAI, M.Y.; WANG, S.; HEIDINGER, J.M.; SHUMAKER, D.K.; ADAM, S.A.; GOLDMAN, R.D.; ZHENG, Y. A Mitotic Lamin B Matrix Induced by RanGTP Required for Spindle Assembly. **Science**, v. 311, p.: 1887–1893, 2006.

VAN GELDER, R. N.; BUHR, E. D. Ocular Photoreception for Circadian Rhythm Entrainment in Mammals. **Annual Review of Vision Science**, v. 2, n. 1, p.: 153–169. 2015. doi:10.1146/annurev-vision-111815-114558

VAN TIENEN, F. H. J.; LINDSEY, P. J.; KAMPS, M. A. F.; KRAPELS, I. P.; RAMAEKERS, F. C. S.; BRUNNER, H. G., ET AL. Assessment of fibroblast nuclear morphology aids interpretation of LMNA variants. **Eur. J. Hum. Genet.**, v. 27, p.: 389–399, 2019. doi: 10.1038/s41431-018-0294-0

VARELA, A. I.; RITCHIE, P. A. Critical amino acid replacements in the rhodopsin gene of 19 teleost species occupying different light environments from shallow-waters to the deep-sea. **Environmental Biology of Fishes.** V. 98, p.: 193–200, 2015.

VATINE, G.; VALLONE, D.; GOTHILF, Y.; FOULKES, N.S. It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. **FEBS Lett.** V. 585, p.:1485–94, 2011. doi: 10.1016/j.febslet.2011.04.007

VECINO, E.; RODRIGUEZ, F.D.; RUZAFI, N.; PEREIRO, X.; SHARMA, S.C. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. **Prog. Retin. Eye Res.** V.51, p.:1–40, 2016. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.06.003.

VEEN, T.; BROCK, C.; RENNISON, D.; BOLNICK, D. Plasticity contributes to a fine-scale depth gradient in sticklebacks' visual system. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 16, p.: 4339–4350, 2017. <https://doi.org/10.1111/mec.14193>

VETTER, C.; PATTISON, P. M.; HOUSER, K.; HERF, M.; PHILLIPS, A. J. K.; WRIGHT, K. P.; GLICKMAN, G. A Review of Human Physiological Responses to Light: Implications for the Development of Integrative Lighting Solutions. **LEUKOS.** v. 1384, p.:1–28, 2021. doi:10.1080/15502724.2021.1872383

VIHTELIC, T.S.; FADOOL, J.M.; GAO, J.; THORNTON, K.A.; HYDE, D.R.; WISTOW, G. Expressed sequence tag analysis of *zebrafish* eye tissues for NEIBank. **Mol Vis.**, v. 13, n. 11, p.:1083-100. 2005.

VOLLRATH, L.; SPIWOKS-BECKER, I. Plasticity of retinal ribbon synapses. **Microsc Res Tech**, v. 35, p.: 472–487, 1996. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19961215)35:63.0.CO;2-K.

VORONTSOVA, I.; HALL, J. E.; SCHILLING, T. F. Assessment of Zebrafish Lens Nucleus Localization and Sutural Integrity. **Journal of Visualized Experiments**, v. 147, 2019. doi:10.3791/59528

WADA, S.; KAWANO-YAMASHITA, E.; KOYANAGI, M.; TERAKITA, A. Expression of UV-sensitive *parapinopsin* in the iguana parietal eyes and its implication in UV-sensitivity in vertebrate pineal-related organs. **PLoS One**. V. 7, p.:e39003, 2012.

WAGNER, H.J.; KRÖGER, R.H. Adaptive plasticity during the development of colour vision. **Prog Retin Eye Res.**, v. 24, n. 4, p.:521-36, 2005. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2005.01.002.

WANG, Y.; ZHOU, L.; WU, L.; SONG, C.; MA, X.; XU, S.; DU, T.; LI, X.; LI, J. Evolutionary ecology of the visual opsin gene sequence and its expression in turbot (*Scophthalmus maximus*). **BMC Ecol Evol**. V. 21, n. 1, p.:114, 2021. doi: 10.1186/s12862-021-01837-2.

WARRANT, E. J.; LOCKET, N. A. Vision in the deep sea. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.** V. 79, p.: 671–712, 2004. doi: 10.1017/S1464793103006420

WATANABE, L.A.; VALLINOTO, M.; NETO, N.A.; MURIEL-CUNHA, J.; SAINT-PAUL, U.; SCHNEIDER H, SAMPAIO. I. 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, e. 101727, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0101727

WINDSOR, D.J.; OWENS, G.L. The opsin repertoire of *Jenynsia onca*: A new perspective on gene duplication and divergence in livebearers. **BMC Res Notes**, v. 2, p.:1–7, 2009. doi: 10.1186/1756-0500-2-159.

WINKLER, M.; SHOA, G.; TRAN, S.T.; XIE, Y.; THOMASY, S.; RAGHUNATHAN, V.K.; MURPHY, C.; BROWN, D.J.; JESTER, J.V. A Comparative Study of Vertebrate Corneal Structure: The Evolution of a Refractive Lens. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 56, n. 4, p.:2764-72, 2015. doi: 10.1167/iovs.15-16584.

WINTON-BROWN, T.T.; TING, A.; MOCELLIN, R.; WALTERFANG, M.; VELAKOULIS, D.; GAILLARD, F. Distinguishing Neuroimaging Features in Patients Presenting with Visual Hallucinations. **AJNR Am J Neuroradiol**. v. 37, n. 5, p.:774-81, 2016. doi: 10.3174/ajnr.A4636.

WRIGHT, D.S.; MEIJER, R.; VAN EIJK, R.; VOS, W.; SEEHAUSEN, O.; MAAN, M.E. Geographic variation in opsin expression does not align with opsin genotype in Lake Victoria cichlid populations. **Ecol Evol**. V. 9, n. 15, p.:8676-8689, 2019. doi: 10.1002/ece3.5411.

XI, J.; FARJO, R.; YOSHIDA, S.; KERN, T.S.; SWAROOP, A.; ANDLEY, U.P. A comprehensive analysis of the expression of crystallins in mouse retina. **Molecular vision**, v. 9, p. 410–9, 2003.

XIE, Y.; TANG, Q.; CHEN, G.; XIE, M.; YU, S.; ZHAO, J.; CHEN, L. New Insights into the Circadian Rhythm and Its Related Diseases. **Front Physiol.**, v. 25, n. 10, p.:682, 2019. doi: 10.3389/fphys.2019.00682.

YAMASHITA, T.; OHUCHI, H.; TOMONARI, S.; IKEDA, K.; SAKAI, K.; SHICHIDA, Y. *Opn5* is a UV-sensitive bistable pigment that couples with Gi subtype of G protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, p.: 22084–2208, 2010.

YAMASHITA, T.; ONO, K.; OHUCHI, H.; YUMOTO, A.; GOTOH, H.; TOMONARI, S.; SAKAI, K.; FUJITA, H.; IMAMOTO, Y.; NOJI, S.; NAKAMURA, K.; SHICHIDA, Y. Evolution of mammalian *Opn5* as a specialized UV-absorbing pigment by a single amino acid mutation. **J Biol Chem**, v. 289, n. 7, p.:3991–4000, 2014. doi: 10.1074/jbc.M113.514075.

YANAKIEVA, I.; ERZBERGER, A.; MATEJČIĆ, M.; MODES, C.D.; NORDEN, C. Cell and tissue morphology determine actin-dependent nuclear migration mechanisms in neuroepithelia **The Journal of Cell Biology**. V. 218, n. 10, p.:3272–3289, 2019. doi.org/10.1083/jcb.201901077

YOKOYAMA, S.; TAKENAKA, N.; BLOW, N. A novel spectral tuning in the short wavelength-sensitive (SWS1 and SWS2) pigments of bluefin killifish (*Lucania goodei*). **Gene**. V. 396, n 1, p.:196-202, 2008. doi: 10.1016/j.gene.2007.03.019.

YOU, X.; BIAN, C.; ZAN, Q.; XU, X, ET AL. Mudskipper genomes provide insights into the terrestrial adaptation of amphibious fishes. **Nat Commun**. V. 2, n. 5, p.:5594, 2014. doi: 10.1038/ncomms6594.

YOVANOVICH, C. A.; KOSKELA, S. M.; NEVALA, N.; KONDRASHEV, S. L.; KELBER, A.; DONNER, K. The dual rod system of amphibians supports colour discrimination at the absolute visual threshold. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci**. V. 372, p.:20160066, 2017. doi: 10.1098/rstb.2016.0066

ZAGOZEWSKI, J.L.; ZHANG, Q.; EISENSTAT, D.D. Genetic regulation of vertebrate eye development. **Clin Genet**. V. 86, n. 5, p.:453–460, 2014.

ZHANG, X. ET AL. Transcriptome analysis of the Octopus vulgaris central nervous system. ZHAO, X.C.; YEE, R.W.; NORCOM, E.; BURGESS, H.; AVANESOV, A.S.; BARRISH, J.P.; MALICKI, J. The zebrafish cornea: structure and development. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 47, n. 10, p.:4341-8, 2006. doi: 10.1167/iovs.05-1611.

ZHDANOVA, I.V.; REEBS, S.G. Circadian rhythms in fish. **Behav Physiol Fish.**, v. 24, p.:197–238, 2006. doi: 10.1016/S1546-50980524006

ZHENG, X.; ZHANG, K.; ZHAO, Y.; FENT, K. Environmental chemicals affect circadian rhythms: An underexplored effect influencing health and fitness in animals and humans. **Environ Int**. v. 149, p.:106159, 2021. doi: 10.1016/j.envint.2020.106159.

ZHU, J.; PALLIYIL, S.; RAN, C.; KUMAR, J.P. *Drosophila Pax6* promotes development of the entire eye-antennal disc, thereby ensuring proper adult head formation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 114, n. 23, p.:5846-5853, 2017. doi: 10.1073/pnas.1610614114

ZUBER, M.E.; GESTRI, G.; VICZIAN, A.S.; BARSACCHI, G.; HARRIS, W.A. Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. **Development**, v.130, p. 5155–5167, 2003. doi:10.1242/dev. 00723.

ANEXO

Parte dos resultados preliminares apresentados nesta tese foram publicados em 29/09/2022 na revista *Frontiers in Neuroscience*.

Referência: SALGADO, D.; MARILUZ, B.R.; ARAUJO, M.; LORENA, J.; PEREZ, L.N.; RIBEIRO, R.D.L.; SOUSA, J.D.F.; SCHNEIDER, P.N. Light-induced shifts in opsin gene expression in the four-eyed fish *Anableps anableps*. *Frontiers in Neuroscience*. V. 16, p.:995469, 2022. doi: 10.3389/fnins.2022.995469

As próximas páginas contêm o artigo completo.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Daniel Ortuño-Sahagún,
University of Guadalajara, Mexico

REVIEWED BY

Kanta Mizusawa,
Kitasato University, Japan
Ryota Matsuo,
Fukuoka Women's University, Japan

*CORRESPONDENCE

Patricia N. Schneider
pschneider@lsu.edu

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Neurodevelopment,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

RECEIVED 15 July 2022

ACCEPTED 08 September 2022

PUBLISHED 29 September 2022

CITATION

Salgado D, Mariluz BR, Araujo M,
Lorena J, Perez LN, Ribeiro RdL,
Sousa JdF and Schneider PN (2022)
Light-induced shifts in opsin gene
expression in the four-eyed fish
Anableps anableps.
Front. Neurosci. 16:995469.
doi: 10.3389/fnins.2022.995469

COPYRIGHT

© 2022 Salgado, Mariluz, Araujo,
Lorena, Perez, Ribeiro, Sousa and
Schneider. This is an open-access
article distributed under the terms of
the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution
or reproduction in other forums is
permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

Light-induced shifts in opsin gene expression in the four-eyed fish *Anableps anableps*

Daniele Salgado¹, Bertha R. Mariluz¹, Maysa Araujo¹,
Jamily Lorena², Louise N. Perez³, Rafaela de L. Ribeiro⁴,
Josane de F. Sousa³ and Patricia N. Schneider^{1,3*}

¹Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil, ²Department of Integrative Biology, Michigan State University, East Lansing, MI, United States, ³Department of Biological Sciences, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, United States, ⁴Instituto Tecnológico Vale, Belém, Brazil

The development of the vertebrate eye is a complex process orchestrated by several conserved transcriptional and signaling regulators. Aside from partial or complete loss, examples of exceptional modifications to this intricate organ are scarce. The unique eye of the four-eyed fish *Anableps anableps* is composed of duplicated corneas and pupils, as well as specialized retina regions associated with simultaneous aerial and aquatic vision. In a previous transcriptomic study of the *A. anableps* developing eye we identified expression of twenty non-visual and eleven visual opsin genes. Here, we surveyed the expression territories of three non-visual melanopsins genes (*opn4x1*, *opn4x2*, *opn4m3*), one teleost multiple tissue opsin (*tmt1b*) and two visual opsins (*lws* and *rh2-1*) in dorsal and ventral retinas. Our data showed that asymmetry of non-visual opsin expression is only established after birth. During embryonic development, while inside pregnant females, the expression of *opn4x1*, *opn4x2*, and *tmt1b* spans the whole retina. In juvenile fish (post birth), the expression of *opn4x1*, *opn4x2*, *opn4m3*, and *tmt1b* genes becomes restricted to the ventral retina, which receives aerial light. Raising juvenile fish in clear water instead of the murky waters found in its natural habitat is sufficient to change gene expression territories of *opn4x1*, *opn4x2*, *opn4m3*, *tmt1b*, and *rh2-1*, demonstrating that different lighting conditions can shift opsin expression and potentially contribute to changes in spectral sensitivity in the four eyed fish.

KEYWORDS

evolution, opsin, plasticity, retina, *Anableps*

Introduction

Change in environmental light is an important driving force for the diversity of visual systems in vertebrates. Aquatic animals occupy a great range of visual environments and have evolved adaptations to increase sensitivity to the availability of light (Collin, 2009). Evolutionary and developmental adaptations to the visual system have ensured success in avoiding predation, establishing feeding behavior and finding sexual partners (Jeffery, 2020; Thomas et al., 2020). For example, cichlid fishes show a versatile visual system with a complex sensory plasticity that regulates reproductive, feeding, and social behavior (Butler et al., 2019; Maruska and Butler, 2021). Substantial changes to the general structure of the vertebrate eye are rare, and include total or partial loss of the eyes, as seen in cavefishes, and the specialized retinas of the deep-water fish (Warrant and Lockett, 2004; Biagioni et al., 2016; Lunghi et al., 2019).

Attempt in eye duplication is a rare event observed in only a few fish lineages such as *Dialommus fuscus* and *Dialommus macrocephalus*, also known as “Rockskipper,” these fish are terrestrial predators and have a vertically split cornea that allows them to remain upright with one cornea in and the other out of the water. In addition, *Bathylchnops exilis*, inhabits depths between 600 and 3,000 ft, and has an auxiliary globe in addition to the main eyeball directed toward the ocean floor (Schwab et al., 2001). Species from the genus *Anableps* are also a remarkable example of extreme adaptation of the visual system. With a partially duplicated eye, simultaneous aerial and aquatic vision, and a single optic nerve, *Anableps* consists in a unique model to understand the genetic bases of eye duplication (Figure 1A; Schwab et al., 2001; Owens et al., 2012; Perez et al., 2017).

Morphological innovations to the visual system require molecular changes in photoreception regulation. The distribution of photoreceptor cells and the composition of rods and cones play an important role in spectral sensitivity in teleost fish (Okano et al., 1994; Collin, 2009; Sato et al., 2018).

Membrane proteins known as visual opsins are present in retina cells and act as light sensors. Coupled with chromophores, these proteins mediate light detection and the initiation of visual processing in the photoreceptor cells (Wald, 1968; Yokoyama, 2000). Conversely, non-visual opsins, although expressed in the inner retina among other tissues in the vertebrate body, do not participate directly in image formation and instead respond to light by activating a series of non-visual sensory responses. In fish, these proteins are present in the pineal complex, epidermal photoreceptors and in the retina nuclear layers and play an important role in light detection, neural development and control of the circadian rhythm (Okano et al., 1994; Kojima and Fukada, 1999; Van Gelder, 2001; Peirson et al., 2009).

The melanopsins are the most widely studied non-visual opsins (Peirson et al., 2009; Diaz et al., 2016; Van Gelder

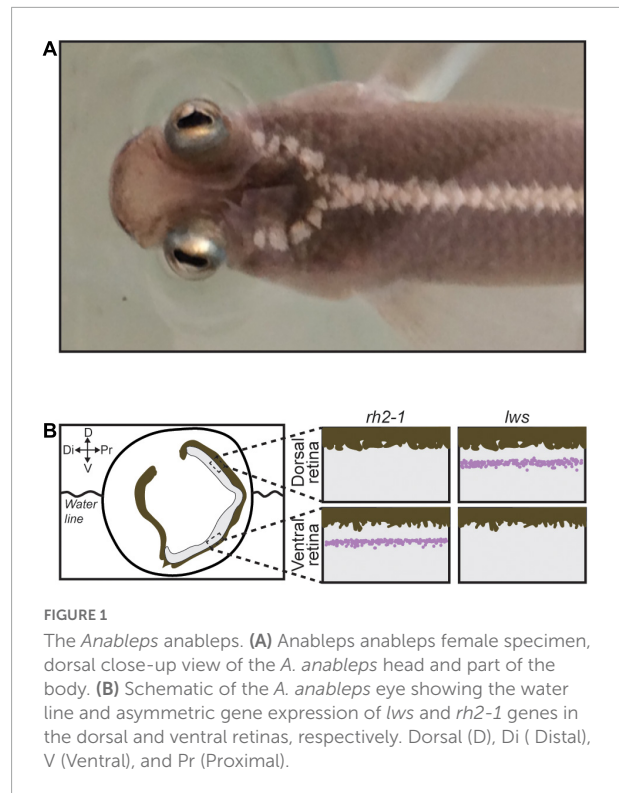


FIGURE 1

The *Anableps anableps*. (A) *Anableps anableps* female specimen, dorsal close-up view of the *A. anableps* head and part of the body. (B) Schematic of the *A. anableps* eye showing the water line and asymmetric gene expression of *lws* and *rh2-1* genes in the dorsal and ventral retinas, respectively. Dorsal (D), Di (Distal), V (Ventral), and Pr (Proximal).

and Buhr, 2016; Guido et al., 2020). In zebrafish (*Danio rerio*), expression of *opn4x1a*, *opn4x1b*, and *opn4m3* are detected in horizontal, bipolar and amacrine cells while a small subgroup of retinal ganglion cells expresses *opn4x1* and *opn4m3*. The expression of *opn4m3* was also detected in the zebrafish retinal pigment epithelial (RPE) (Davies et al., 2011). In the retina cells of salmon fish (*Salmo salar*), five melanopsin genes were observed: *opn4x1a* and *opn4x1b*, *opn4m1a1*, *opn4m1a2*, and *opn4m2* (Sandbakken et al., 2012). The non-visual opsin multiple tissue of teleosts (*tmt*) is expressed in the eyes, brain, liver, kidneys, and heart of fugu (*Fugu rubripes*) and zebrafish and in the brain and eyes of medaka (*Oryzias latipes*) (Moutsaki et al., 2003; Fischer et al., 2013). Previous studies have demonstrated that *tmt1* and *tmt2* opsins act as a blue light-sensitive Gi/Go-coupled receptors but exhibited spectral properties and photo-convertibility of the active state different from each other (Diaz et al., 2016; Guido et al., 2020). While non-visual opsins are expressed in the retina cells of many fish species, the exact role of these proteins and their physiological functions remain to be elucidated (Diaz et al., 2016; Guido et al., 2020).

Asymmetric gene expression of opsin genes is another way of modulating visual sensitivity, and this mechanism plays an important role in the diversification of visual pigments in fish, leading to changes in spectral sensitivity (Hofmann and Carleton, 2009; Hauser and Chang, 2017). In addition,

modulation of spectral sensitivity could also occur as part of a short-term plastic response to environmental changes, as observed in the eyes of the four eyed fish *Anableps anableps*.

Anableps are livebearers; female fish give birth to fully developed progeny, similarly to mammals. Previous work from our group has shown that the establishment of asymmetric expression of visual opsins (*rh2-1* and *lws*) occurs prior to birth and is independent of photic input, suggesting that it is genetically programmed (Perez et al., 2017). Here, we show that *opn4x1*, *opn4x2*, and *tmt1b* are expressed symmetrically in the entire retina of the developing eye of the *A. anableps* during larval stages. In the juvenile fish, *tmt1b*, *opn4x1*, *opn4x2*, and *opn4m3* shift the expression domain and become restricted to the ventral retina. *A. anableps* inhabit murky waters of the Amazon River and its tributaries (Supplementary Video 1). However, when animals were maintained in aquaria with clear water, we observed loss of *opn4x2* expression in the retina, and a shift in *opn4x1*, *opn4m3*, and *tmt1b* expression domains, from being restricted to the ventral retina, to being expanded dorsally and occupying the entire retina, recapitulating the expression pattern of the developing eye during larval stages.

Materials and methods

Sample collection

Specimens of *A. anableps* were collected by seine net in two locations: Abaetetuba, Pará, Brazil (1°42'24.9"S 48°53'46.4"W) and Bragança, Pará, Brazil (0°53'27.6"S 46°39'21.9"W). Animals were euthanized using MS-222 (Sigma-Aldrich Corp., Milwaukee, WI, USA) followed by decapitation.

Histological analysis

Eyes of wild-caught *A. anableps* juvenile (up to 15 cm long) and larvae were collected and flash frozen in Tissue-Tek® O.C.T™ embedding medium (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA, USA). Sagittal cryosections (20 μm) of the eyes were obtained using CM1850 UV cryostat (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, BW, Germany) and collected on ColorFrost Plus microscope slides (Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA), fixed in 3% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) and stored at −80°C for further use.

Lighting environment conditions

Eight juvenile fish were kept in a 75 Gallon glass aquarium with UV filter and standard fluorescent light (40 watts);

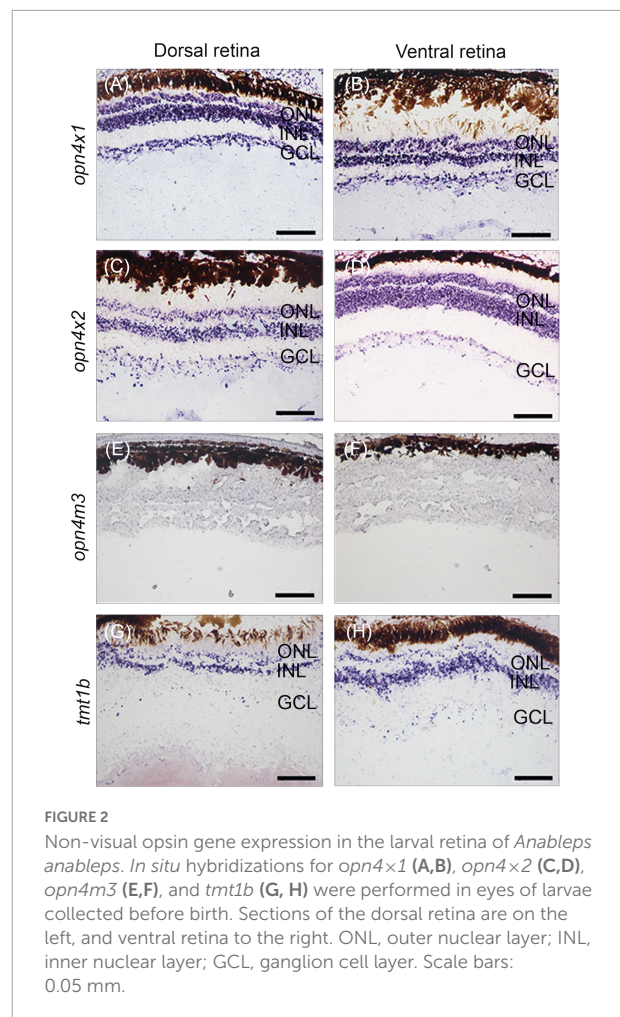


FIGURE 2

Non-visual opsin gene expression in the larval retina of *Anableps anableps*. *In situ* hybridizations for *opn4x1* (A,B), *opn4x2* (C,D), *opn4m3* (E,F), and *tmt1b* (G, H) were performed in eyes of larvae collected before birth. Sections of the dorsal retina are on the left, and ventral retina to the right. ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bars: 0.05 mm.

fish were kept in dechlorinated tap water at 28°C with aeration and biological and mechanical filtration and fed daily with fish ration. Fish were exposed to a day and night cycle of 12 h for 30 days followed by euthanasia, according to Fuller and Claricoates (Fuller and Claricoates, 2011; Supplementary Video 2).

Sagittal sections (20 μm) were obtained using CM1850 UV cryostat (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, BW, Germany), placed on ColorFrost Plus microscope slides (Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) and stored at −80°C for further use. Eight wild-caught juvenile fish were used as control for these experiments.

Riboprobe synthesis

To produce riboprobes for *in situ* hybridization for the genes *opn4m3*, *opn4x1*, *opn4x2*, and *tmt1b*, we adapted a PCR-based technique for the preparation of riboprobe templates (David and Wedlich, 2001). First, vectors containing target gene sequences were synthesized in pBlueScript II SK(+) by

BioCat GmbH (Heidelberg, Germany). Next, these vectors were used as a template on a PCR reaction. The T7 promoter sequence was included at the 5' end of each gene-specific forward primer, whereas the SP6 promoter sequence was added to the 5' end of each gene-specific reverse primer. The resulting amplicons for each target gene were subsequently used as template for sense (T7) or antisense (SP6) riboprobe synthesis. Primers (with promoter sequences underlined) were: *opn4m3*-Forward: 5' TAATACGACTCACTATAGGCTCGTCTGAGGTGGTTTTAGG 3' and reverse: 5' ATTTAGGTGACACTATAGTGTAGGAGCAGGGTGGAGAAG 3', *opn4x1*-Forward: 5' TAATACGACTCACTATAGCAAAGAAGGCAACGATGTAGTGA 3' and reverse: 5' ATTTAGGTGACACTATAGACACGGATTCTATCGGCATGT 3', *opn4x2*-Forward: 5' TAATACGACTCACTATAGCCATTCCTTGTAGAGGCAGTTGATA 3' and reverse: 5' ATTTAGGTGACACTATAGGCGACTTCCTCATGGCTTTC3', *tmt1b*-Forward: 5' TAATACGACTCACTATAGCAGTGGTTCGTCGAAAATGG 3' and reverse: 5' ATTTAGGTGACACTATAGGCGTTCAAAGGGATTACTGT 3'.

To produce riboprobes for the visual opsins *lws* and *rh2-1*, we used as templates vectors previously described (Perez et al., 2017). The pCRII-TOPO vector (Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) containing the target gene sequence was used as a template in a PCR reaction with M13 forward (5' TAAAACGACGCCAG-3') and M13 reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC 3') primers. The resulting amplicon contained the sequence of the gene of interest flanked by an upstream T7 promoter and a downstream SP6 promoter. Sense and antisense probes were produced using T7 and SP6 RNA polymerases, respectively. Riboprobe reaction was performed using DIG-labeling mix (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, BW., GER.) and according to manufacturer's protocol (mMESSAGE mMACHINE Transcription kits, Ambion, Carlsbad, CA, USA).

In situ hybridization

In situ hybridization was performed according to previously established protocol (Lovell et al., 2013; Carleton et al., 2014; De Lima et al., 2015). Cryosections from heads *A. anableps* specimens were acetylated for 10 min in a solution of 0.33% acetic anhydride in DEPC-treated water, rinsed with 2× SSPE buffer (0.02 M EDTA and 2.98 M NaCl in 0.2 M phosphate buffer) and dehydrated in 70, 95, and 100% RNase-free ethanol. Each section was then hybridized with a solution (32 μL) containing 50% formamide, 2× SSPE, 1 μg/μl BSA, 1 μg/μL poly(A) (Sigma-Aldrich Corp., Milwaukee, WI, USA) in DEPC-treated water, and 1 μL of the DIG-labeled riboprobe. Slides were cover slipped, sealed by immersion in mineral oil, and incubated overnight at 65°C. Next, sections were rinsed in chloroform, de-cover slipped in 2× SSPE, and incubated serially

in 2× SSPE/50% formamide, and in 0.1× SSPE at 65°C. Sections were then blocked for 30 min at RT in blocking buffer with 1% skim milk and incubated overnight with an alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibody (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, BW, Germany). Slides were washed twice for 15 min in TMN (100 mM Tris, pH 9.5; 150 mM NaCl, 0.05 M MgCl₂), and incubated in a detection solution containing the alkaline phosphatase substrates Nitro-Blue Tetrazolium Chloride (NBT) (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, BW, Germany). and 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-phosphate p-Toluidine Salt (BCIP) (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, BW, Germany). Slides were washed overnight, fixed in 4% paraformaldehyde (dissolved in PBS) and cover slipped with Cytoseal (Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Slides were imaged using a Nikon SMZ1500 microscope and processed on NIS-Elements D 4.10.01 program (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA).

Results

Non-visual opsins are expressed symmetrically in the developing eye of *Anableps anableps* prior to birth

Our previous work identified twenty non-visual and eleven visual opsins expressed during the development of the eye in the four-eyed fish (Beaudry et al., 2017; Perez et al., 2017). Here, *in situ* hybridization was performed to examine the expression domains of three types of melanopsin subfamily of genes, *opn4x1*, *opn4x2*, *opn4m3*, and one type of teleost multiple tissue opsin, *tmt1b*, in the developing retina of pre-birth larvae. Our results showed that *opn4x1*, *opn4x2*, and *tmt1b* are expressed uniformly in the outer nuclear layer (ONL), inner nuclear layer (INL), and ganglion cell layer (GCL) in both dorsal and ventral regions of the retina (Figures 2A–D,G,H). The expression of *opn4m3* was not detected by *in situ* hybridization at stage 5 (Figures 2E,F).

Expression domains of visual and non-visual opsins change upon different lighting conditions in juvenile *Anableps anableps*

We have previously shown that in the *A. anableps*, asymmetric expression of *lws* and *rh2.1* in the dorsal and ventral regions of the retina, respectively, is established prior to birth in photoreceptor cells (Perez et al., 2017). Here, we wanted to investigate the plasticity of visual and non-visual opsins in the retina upon changes in environmental lighting. To this end,

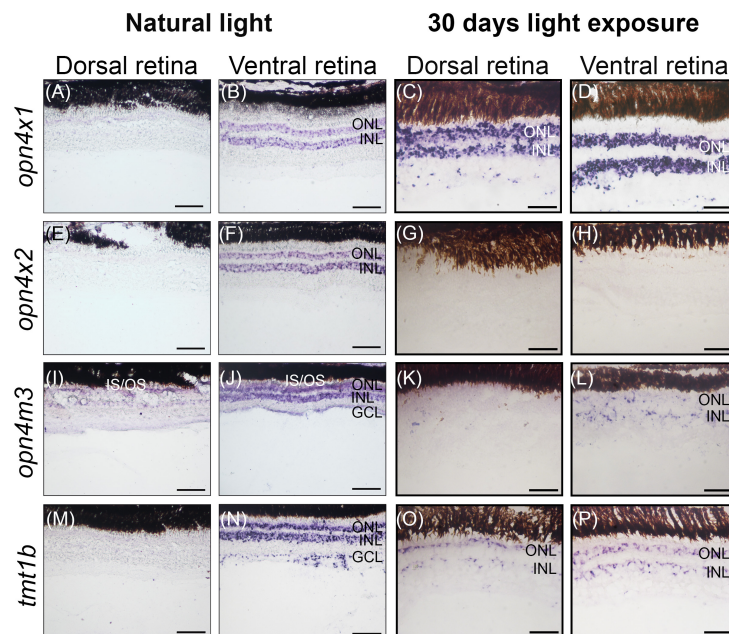


FIGURE 3

Non-visual opsin gene expression in the juvenile retina of *Anableps anableps*. *In situ* hybridizations of *opn4x1* (A–D), *opn4x2* (E–H), *opn4m3* (I–L), and *tmt1b* (M–P) were performed in *A. anableps*' eyes from wild-caught juvenile fish under natural light conditions (A, B, E, F, I, J, M, N) and juveniles that were kept for 30 days in light exposure from above and below the water (C, D, G, H, K, L, O, P). The panel shows sections of the dorsal retina and ventral retina. ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer; GCL, ganglion cell layer; IS, photoreceptor inner segments; OS, photoreceptor outer segments. Scale bars: 0.05 mm.

juvenile fish were maintained in clear water for 30 days and surveyed for visual and non-visual opsin gene expression using RNA *in situ* hybridization.

In wild-caught juvenile *A. anableps* found in murky river water, the expression of *opn4x1* (Figures 3A,B) and *opn4x2* (Figures 3E,F) is restricted to the ONL and INL of the ventral retina while *opn4m3* and *tmt1b* are expressed in the INL, ONL and GCL of the ventral retina (Figures 3I,J,M,N). We next used a 30-day light-induced cycle and assayed opsin gene expression. Our results showed that expression of *opn4x1* and *tmt1b*, restricted to the ONL and INL in the ventral retina in wild-caught fish, expands to the ONL, INL and GCL in the dorsal retina (Figures 3C,D,O,P); *opn4x2* expression is lost in the entire retina (Figures 3G,H) while *opn4m3* expression becomes sparse in the ONL, INL and GCL of the ventral retina (Figures 3K,L).

We next assayed the *lws* and *rh2-1* visual opsins, which show expression domains restricted to the dorsal and ventral retinas, respectively (Perez et al., 2017). Upon light-induced exposure, *in situ* hybridization showed that *lws* expression remained in the photoreceptor layer of the dorsal retina, however, *rh2-1* expression expanded to the photoreceptor layer of ventral and dorsal retina territories (Figures 1B, 4A–D for reference).

Altogether, our results show that *lws* and *rh2-1* visual opsin expression is established without environmental light stimuli, prior to birth. However, changes in light input can modulate the expression of *rh2-1* and cause a shift the expression

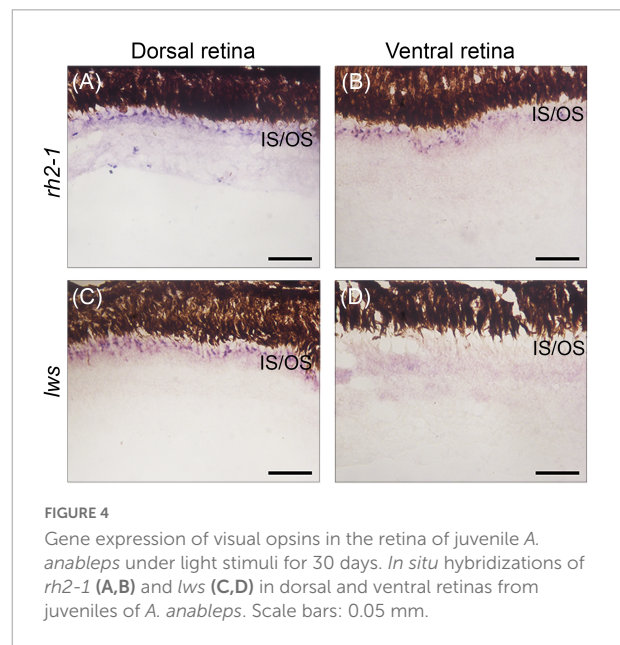


FIGURE 4

Gene expression of visual opsins in the retina of juvenile *A. anableps* under light stimuli for 30 days. *In situ* hybridizations of *rh2-1* (A,B) and *lws* (C,D) in dorsal and ventral retinas from juveniles of *A. anableps*. Scale bars: 0.05 mm.

domain, from being restricted to the ventral retina, to being expanded to the entire retina. Non-visual opsins also show asymmetric expression in the nuclear layer of the retina in juvenile fish. Although established only after birth, changes in the environmental lighting caused a shift in the expression domains of *opn4x1*, *opn4m3*, and *tmt1b*, suggesting that both

visual and non-visual opsins can be modulated by changes in the photic input.

Discussion

In this work, we surveyed the expression of three melanopsins *opn4x1*, *opn4x2*, *opn4m3*, and one *tmt1b* in the nuclear layers of the *A. anableps* retina. The spatial pattern observed pre-birth diverges from that seen in free-swimming juvenile individuals, which express *opn4x1* and *opn4x2* in the ONL and INL of the ventral retina while *opn4m3* and *tmt1b* are expressed in the INL, ONL and GCL of the ventral retina.

In zebrafish, melanopsin genes are expressed in different regions of the retina and have been associated with the regulation of negative phototaxis (Matos-Cruz et al., 2011; Fernandes et al., 2012). In teleost fish, the expression of melanopsin in various types of neuronal cells can directly influence retinal function in a dependent and/or independent way from intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (Matos-Cruz et al., 2011). In other vertebrates, including teleost fish, *tmt* expression is distributed across many tissues including internal organs where light can hardly penetrate, suggesting that *tmt* opsin may have both photosensitive and non-photosensitive functions (Fischer et al., 2013; Sakai et al., 2015). In our work, we speculate that light-induced changes in non-visual opsins expression could be due to the indirect regulation of visual opsins in the photoreceptor cells of the retina.

Previous studies from our group and others have shown asymmetric expression of *lws* and *rh2.1* in the photoreceptor cells in the dorsal and ventral domains of the developing retina, respectively, with the establishment of asymmetric expression of *lws* and *rh2.1* occurring before birth, suggesting that it is genetically programmed and independent of light stimuli (Owens et al., 2012; Perez et al., 2017). This asymmetry allows the partial duplicated eye of the *A. anableps* to optimize the absorption of different wavelengths coming simultaneously from the aerial and aquatic environment. In this work, we manipulated light input by changing the turbid water where the *A. anableps* is normally found and replacing it with clear water. We tested the plasticity of *lws* and *rh2.1* in the photoreceptor cells in the retina of juvenile fish after a 30 day period and our results showed that, despite being established before light stimuli reach the retina (Perez et al., 2017), the expression of *rh2.1* (normally expressed in the ventral retina) shifted and became uniformly expressed in the entire retina, while the expression of *lws* remained unchanged and restricted to the photoreceptor cells in the dorsal retina. While in captivity, animals were maintained in tanks with average temperature of 28°C, which closely mirrors that of their natural environment. The commercial diet provided for the animals in captivity, however, differs from their diet in natural settings. In the wild, the stomach content of *A. anableps* ranges from micro and macroalgae, insects, crustaceans, molluscs, fishes, to mud and

detritus (Figueiredo et al., 2019). While we cannot rule out a potential feeding behavior of food content impact on opsin gene expression, we have no knowledge of a documented link between the former and the latter.

In zebrafish and guppies, the expression patterns of different subtypes of *rh2* and *lws* vary according to the developmental stage and region of the retina (Takechi and Kawamura, 2005; Owens et al., 2012). Several studies have demonstrated that opsin expression is subject to phenotypic plasticity (Fuller et al., 2005; Shand et al., 2008; Veen et al., 2017). Several teleost species placed under altered light conditions, such as damselfish and cardinal fish (Luehrmann et al., 2018), African cichlids (Wright et al., 2019), guppies (Kranz et al., 2018), and Senegalese sole (Frau et al., 2020) can alter the expression of opsin genes to adapt to the environmental changes. Here we show that shift in opsin expression happens in the dorsal and ventral domains of the retina in *A. anableps* within a 30-day period, our results do not exclude the possibility that the change in the expression pattern of opsin genes occurs in a shorter period. Here, we show that after a 30-day period of exposure to clear water, opsin expression changes in the dorsal and ventral retinas, given that, this shift happens in portions of the retina for both visual and non-visual opsin genes, our results suggest that the regulatory control of the expression of opsins in the eye of the *A. anableps* is complex and compartmentalized in the dorsal and ventral retinas.

Conclusion

Our study shows that the expression of visual opsins in the retina of *A. anableps* can be modulated by spectral and intensity changes in ambient light. These adjustments allow for a quick adaptation of the visual system to different water turbidity and environmental luminosity. Our findings indicate that the *A. anableps* exhibits great potential to modulate its vision according to the environment, allowing this organism to adjust its vision to different photic conditions. Furthermore, our findings suggest that the expression of non-visual opsins can also be altered upon changes in environmental light, suggesting a regulatory correlation between visual and non-visual opsin regulation of physiological functions responsive to light.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

This study was approved by IBAMA/SISBIO under license number 47206-1 and the Ethics Committee for Animal Research at the Universidade Federal do Pará (protocol number 037-2015).

Author contributions

DS, MA, JL, LP, and PS designed the research. LP, MA, JL, and BM performed *in situ* hybridizations (ISH) of *A. anableps* larvae. RR and JS designed the riboprobes for ISH. DS and LP performed light-induced experiments and analysis. DS, LP, and PS wrote the manuscript with input from BM, MA, JL, RR, and JS. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Acknowledgments

We thank Jeferson Carneiro and Karen Pinto for help in fish collection. We also thank Iracilda Sampaio for logistical support at the collection site. We would also like to thank Igor Schneider for critical reading of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Beaudry, F. E. G., Iwanicki, T. W., Mariluz, B. R. Z., Darnet, S., Brinkmann, H., Schneider, P., et al. (2017). The non-visual opsins: Eighteen in the ancestor of vertebrates, astonishing increase in ray-finned fish, and loss in amniotes. *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol.* 328, 685–696. doi: 10.1002/jez.b.22773
- Biagioni, L. M., Hunt, D. M., and Collin, S. P. (2016). Morphological Characterization and Topographic Analysis of Multiple Photoreceptor Types in the Retinae of Mesopelagic Hatchetfishes with Tubular Eyes. *Front. Ecol. Evol.* 4:25. doi: 10.3389/fevo.2016.00025
- Butler, J. M., Whitlow, S. M., Rogers, L. S., Putland, R. L., Mensinger, A. F., and Maruska, K. P. (2019). Reproductive state-dependent plasticity in the visual system of an African cichlid fish. *Horm. Behav.* 114:104539. doi: 10.1016/j.yhbeh.2019.06.003
- Carleton, J. B., Lovell, P. V., Mchugh, A., Marzulla, T., Horback, K. L., and Mello, C. V. (2014). An optimized protocol for high-throughput *in situ* hybridization of zebra finch brain. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2014, 1249–1258. doi: 10.1101/pdb.prot084582
- Collin, S. P. (2009). "Evolution of the Visual System in Fishes," in *Encyclopedia of Neuroscience*, eds M. D. Binder, N. Hirokawa, and U. Windhorst (Berlin: Springer), 1459–1466. doi: 10.1007/978-3-540-29678-2_3178
- David, R., and Wedlich, D. (2001). Pcr-based Rna probes: A quick and sensitive method to improve whole mount embryo *in situ* hybridizations. *Biotechniques* 30:74. doi: 10.2144/01304st02
- Davies, W. I., Zheng, L., Hughes, S., Tamai, T. K., Turton, M., Halford, S., et al. (2011). Functional diversity of melanopsins and their global expression in the teleost retina. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 4115–4132. doi: 10.1007/s00018-011-0785-4
- De Lima, J. L., Soares, F. A., Remedios, A. C., Thom, G., Wirthlin, M., Aleixo, A., et al. (2015). A putative Ra-like region in the brain of the scale-backed antbird, *Willisornis poecilinotus* (Furnariidae, Suboscines, Passeriformes, Thamnophilidae). *Genet. Mol. Biol.* 38, 249–254. doi: 10.1590/S1415-475738320150010
- Diaz, N. M., Morera, L. P., and Guido, M. E. (2016). Melanopsin and the Non-visual Photochemistry in the Inner Retina of Vertebrates. *Photochem. Photobiol.* 92, 29–44. doi: 10.1111/php.12545
- Fernandes, A. M., Fero, K., Arrenberg, A. B., Bergeron, S. A., Driever, W., and Burgess, H. A. (2012). Deep brain photoreceptors control light-seeking behavior in zebrafish larvae. *Curr. Biol.* 22, 2042–2047. doi: 10.1016/j.cub.2012.08.016
- Figueiredo, M. B., Nunes, J. L., Almeida, Z. S., Paz, A. C., Piorski, N. M., and Reis, M. R. (2019). Feeding ecology of *Anableps Anableps* (Actinopterygii: Cyprinodontiformes: Anablepidae) off the north-eastern coast of Brazil. *Acta Ichthyol. Piscat.* 49, 213–219. doi: 10.3750/AIEP/02477
- Fischer, R. M., Fontinha, B. M., Kirchmaier, S., Steger, J., Bloch, S., Inoue, D., et al. (2013). Co-expression of Val- and Tmt-opsins uncovers ancient photosensory interneurons and motoneurons in the vertebrate brain. *PLoS Biol.* 11:e1001585. doi: 10.1371/journal.pbio.1001585
- Frau, S., Loentgen, G., Martin-Robles, A. J., and Munoz-Cueto, J. A. (2020). Ontogenetic expression rhythms of visual opsins in senegalese sole are modulated by photoperiod and light spectrum. *J. Comp. Physiol. B* 190, 185–204. doi: 10.1007/s00360-020-01264-7
- Fuller, R. C., and Claricoates, K. M. (2011). Rapid light-induced shifts in opsin expression: Finding new opsins, discerning mechanisms of change, and implications for visual sensitivity. *Mol. Ecol.* 20, 3321–3335. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05180.x
- Fuller, R. C., Carleton, K. L., Fadool, J. M., Spady, T. C., and Travis, J. (2005). Genetic and environmental variation in the visual properties of bluefin killifish, *Lucania goodei*. *J. Evol. Biol.* 18, 516–523. doi: 10.1111/j.1420-9101.2005.00886.x

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2022.995469/full#supplementary-material>

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

In situ hybridization showing the sense control riboprobes for the non-visual opsins: *opn4x1*, *opn4x2*, *opn4m3*, *tmt1b*.

SUPPLEMENTARY FIGURE 2

In situ hybridization showing the sense control riboprobes for the visual opsins *lws* and *rh2-1*.

SUPPLEMENTARY VIDEO 1

A group of five *Anableps anableps* specimens in the wild. Movie was recorded in the estuarine region of Bragança, Pará, Brazil (0°53'27.6''S 46°39'21.9''W).

SUPPLEMENTARY VIDEO 2

A fish tank with *Anableps anableps* specimens during the 30-day light induced experiments.

- Guido, M. E., Marchese, N. A., Rios, M. N., Morera, L. P., Diaz, N. M., Garbarino-Pico, E., et al. (2020). Non-visual Opsins and Novel Photo-Detectors in the Vertebrate Inner Retina Mediate Light Responses Within the Blue Spectrum Region. *Cell. Mol. Neurobiol.* 42, 59–83. doi: 10.1007/s10571-020-00997-x
- Hauser, F. E., and Chang, B. S. W. (2017). Insights into visual pigment adaptation and diversity from model ecological and evolutionary systems. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 47, 110–120. doi: 10.1016/j.gde.2017.09.005
- Hofmann, C. M., and Carleton, K. L. (2009). Gene duplication and differential gene expression play an important role in the diversification of visual pigments in fish. *Integr. Comp. Biol.* 49, 630–643. doi: 10.1093/icb/icmp079
- Jeffery, W. R. (2020). Astyanax surface and cave fish morphs. *EvoDevo* 11:14. doi: 10.1186/s13227-020-00159-6
- Kojima, D., and Fukada, Y. (1999). Non-visual photoreception by a variety of vertebrate opsins. *Novartis Found Symp.* 224, 265–279. doi: 10.1002/9780470515693.ch15
- Kranz, A. M., Forgan, L. G., Cole, G. L., and Endler, J. A. (2018). Light environment change induces differential expression of guppy opsins in a multi-generational evolution experiment. *Evolution* 72, 1656–1676. doi: 10.1111/evo.13519
- Lovell, P. V., Carleton, J. B., and Mello, C. V. (2013). Genomics analysis of potassium channel genes in songbirds reveals molecular specializations of brain circuits for the maintenance and production of learned vocalizations. *BMC Genom.* 14:470. doi: 10.1186/1471-2164-14-470
- Luehrmann, M., Stieb, S. M., Carleton, K. L., Pietzker, A., Cheney, K. L., and Marshall, N. J. (2018). Short-term colour vision plasticity on the reef: Changes in opsin expression under varying light conditions differ between ecologically distinct fish species. *J. Exp. Biol.* 221:jeb175281. doi: 10.1242/jeb.175281
- Lunghi, E., Zhao, Y., Sun, X., and Zhao, Y. (2019). Morphometrics of eight Chinese cavefish species. *Sci. Data* 6:233. doi: 10.1038/s41597-019-0257-5
- Maruska, K. P., and Butler, J. M. (2021). Reproductive- and Social-State Plasticity of Multiple Sensory Systems in a Cichlid Fish. *Integr. Comp. Biol.* 61, 249–268. doi: 10.1093/icb/icab062
- Matos-Cruz, V., Blasic, J., Nickle, B., Robinson, P. R., Hattar, S., and Halpern, M. E. (2011). Unexpected diversity and photoperiod dependence of the zebrafish melanopsin system. *PLoS One* 6:e25111. doi: 10.1371/journal.pone.0025111
- Moutsaki, P., Whitmore, D., Bellingham, J., Sakamoto, K., David-Gray, Z. K., and Foster, R. G. (2003). Teleost multiple tissue (tmt) opsin: A candidate photopigment regulating the peripheral clocks of zebrafish? *Brain Res. Mol. Brain Res.* 112, 135–145. doi: 10.1016/S0169-328X(03)00059-7
- Okano, T., Yoshizawa, T., and Fukada, Y. (1994). Pinopsin is a chicken pineal photoreceptive molecule. *Nature* 372, 94–97. doi: 10.1038/372094a0
- Owens, G. L., Rennison, D. J., Allison, W. T., and Taylor, J. S. (2012). 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.* 8, 86–89. doi: 10.1098/rsbl.2011.0582
- Peirson, S. N., Halford, S., and Foster, R. G. (2009). The evolution of irradiance detection: Melanopsin and the non-visual opsins. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 364, 2849–2865. doi: 10.1098/rstb.2009.0050
- Perez, L. N., Lorena, J., Costa, C. M., Araujo, M. S., Frota-Lima, G. N., Matos-Rodrigues, G. E., et al. (2017). Eye development in the four-eyed fish *Anableps anableps*: Cranial and retinal adaptations to simultaneous aerial and aquatic vision. *Proc. Biol. Sci.* 284:20170157. doi: 10.1098/rspb.2017.0157
- Sakai, K., Yamashita, T., Imamoto, Y., and Shichida, Y. (2015). Diversity of Active States in Tmt Opsins. *PLoS One* 10:e0141238. doi: 10.1371/journal.pone.0141238
- Sandbakken, M., Ebbesson, L., Stefansson, S., and Helvik, J. V. (2012). Isolation and characterization of melanopsin photoreceptors of *Atlantic salmon* (*Salmo salar*). *J. Comp. Neurol.* 520, 3727–3744. doi: 10.1002/cne.23125
- Sato, K., Yamashita, T., Kojima, K., Sakai, K., Matsutani, Y., Yanagawa, M., et al. (2018). Pinopsin evolved as the ancestral dim-light visual opsin in vertebrates. *Commun. Biol.* 1:156. doi: 10.1038/s42003-018-0164-x
- Schwab, I. R., Ho, V., Roth, A., Blankenship, T. N., and Fitzgerald, P. G. (2001). Evolutionary attempts at 4 eyes in vertebrates. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 99, 145–156.
- Shand, J., Davies, W. L., Thomas, N., Balmer, L., Cowing, J. A., Pointer, M., et al. (2008). The influence of ontogeny and light environment on the expression of visual pigment opsins in the retina of the black bream, *Acanthopagrus butcheri*. *J. Exp. Biol.* 211, 1495–1503. doi: 10.1242/jeb.012047
- Takechi, M., and Kawamura, S. (2005). Temporal and spatial changes in the expression pattern of multiple red and green subtype opsin genes during zebrafish development. *J. Exp. Biol.* 208, 1337–1345. doi: 10.1242/jeb.01532
- Thomas, K. N., Gower, D. J., Bell, R. C., Fujita, M. K., Schott, R. K., and Streicher, J. W. (2020). Eye size and investment in frogs and toads correlate with adult habitat, activity pattern and breeding ecology. *Proc. Biol. Sci.* 287:20201393. doi: 10.1098/rspb.2020.1393
- Van Gelder, R. N. (2001). Non-visual ocular photoreception. *Ophthalmic Genet.* 22, 195–205. doi: 10.1076/opge.22.4.195.2215
- Van Gelder, R. N., and Buhr, E. D. (2016). Melanopsin: The Tale of the Tail. *Neuron* 90, 909–911. doi: 10.1016/j.neuron.2016.05.033
- Veen, T., Brock, C., Rennison, D., and Bolnick, D. (2017). Plasticity contributes to a fine-scale depth gradient in sticklebacks' visual system. *Mol. Ecol.* 26, 4339–4350. doi: 10.1111/mec.14193
- Wald, G. (1968). The molecular basis of visual excitation. *Nature* 219, 800–807. doi: 10.1038/219800a0
- Warrant, E. J., and Locket, N. A. (2004). Vision in the deep sea. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 79, 671–712. doi: 10.1017/S1464793103006420
- Wright, D. S., Meijer, R., Van Eijk, R., Vos, W., Seehausen, O., and Maan, M. E. (2019). Geographic variation in opsin expression does not align with opsin genotype in Lake Victoria cichlid populations. *Ecol. Evol.* 9, 8676–8689. doi: 10.1002/ecc3.5411
- Yokoyama, S. (2000). Phylogenetic analysis and experimental approaches to study color vision in vertebrates. *Methods Enzymol.* 315, 312–325. doi: 10.1016/S0076-6879(00)15851-3