Renato Grotta Grempel

Transição epígea/hipógea de *Pimelodella* spp. (Siluriformes:
Heptateridae): fisiologia da pigmentação

São Paulo

2011

Renato Grotta Grempel

Transição epígea/hipógea de *Pimelodella* spp. (Siluriformes:
Heptateridae): fisiologia da pigmentação

Epigeal/hipogeal transition in *Pimelodella* spp. (Siluriformes:
Heptateridae): physiology of pigmentation

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Ciências Biológicas, na
Área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Maria Aparecida Visconti

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica

Grotta Grempel, Renato
Transição epígea/hipógea de
Pimelodella spp. (Siluriformes:
Heptateridae): fisiologia da pigmentação
57 p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia Geral.

1.Organismos troglóbios 2.Ambientes
Subterrâneos 3. Fisiologia da pigmentação
I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Fisiologia
Geral.

Comissão Julgadora

Prof^(a). Dr^(a).

Prof^(a). Dr^(a).

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Visconti
Orientadora

Aos meus avós maternos

Mario e Beatriz Grotta (*in memoriam*).

“Bem-aventurado o homem que não anda segundo o conselho dos ímpios, nem se detém no caminho dos pecadores, nem se assenta na roda dos escarnecedores. Antes tem seu prazer na lei do Senhor, e na sua lei medita de dia e noite. Pois será como a árvore plantada junto às correntes de águas, a qual dá o seu fruto na estação própria, e cujas folhas não caem; e tudo quanto fizer prosperará”.

(Salmos 1: 1-3)

Sumário

Agradecimentos		ii
Resumo		iv
Abstract		v
1. Introdução		1
1.1 Organismos troglóbios e troglomorfismos		1
1.2 Células pigmentares		6
1.3 Hormônios e neurotransmissores		8
1.4 Hipótese		10
2. Objetivos		11
2.1 Objetivo geral		11
2.2 Objetivos específicos		11
3. Material e métodos		12
3.1 Gênero <i>Pimelodella</i>		12
3.2 Coleta e manutenção dos espécimes		16
3.3 Coleta de amostras, equipamento utilizado e funcionamento do sistema		17
3.4 Testes de resposta aos hormônios e Neurotransmissores		19
3.5 Tamanho e densidade dos cromatóforos		21
3.6 Testes de reação à L-Dopa		21
3.7 Análises dos dados e análise estatística		22
4. Resultados		23
4.1 Área da superfície celular		23
4.2 Densidade		24
4.3 L-Dopa		27
4.4 Resposta a hormônios e neurotransmissores		28
4.5 Curva DOSE-RESPOSTA das células que apresentaram resposta aos hormônios e neurotransmissores		29
5. Discussão		31
6. Conclusões		39
7. Referências bibliográficas		40

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida.

À professora Dr^a **Maria Aparecida Visconti**, minha orientadora, amiga e confidente, pela contribuição no meu aprendizado e amadurecimento pessoal e acadêmico. Obrigado pela compreensão e paciência durante esses anos tão delicados para mim. Apoio esse, fundamental para a conclusão dessa obra e de mais essa fase da minha vida. Muito obrigado!

À professora Dr^a **Eleonora Trajano**, com quem tanto aprendi nesses anos, quem me ensinou uma forma diferente, fantástica, de olhar para esse campo da biologia. Uma guerreira que tem um carinho de mãe pelos seus alunos. Muito obrigado!

À amiga **Telma Pazini**, pela sua amizade e demonstração de caráter. Por fundamental ajuda nos trabalhos em laboratório. Muito obrigado!

Aos **componentes da banca** de qualificação pela disponibilidade e pelas contribuições que com certeza enriqueceram esse trabalho.

Ao **Departamento de Fisiologia Geral** – IB/USP, por meio do seu coordenador José Guilherme Chaui-Berlink.

Aos **funcionários** do Instituto de Biociências (biblioteca, limpeza, portaria, cantina, telefonistas, recepcionistas e técnicos de laboratório) agradeço pela colaboração, satisfação em nos atender e eficiência de seus serviços. Obrigado!

À **Universidade Federal da Paraíba – Centro de Ciências Exatas e da Natureza** e a todos os meus ex-professores que contribuíram de forma ímpar, desde o início de minha formação profissional.

À **FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)**, pelo apoio científico e financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os **colegas** do departamento que, seja em bate papos (raríssimos) na copa, pizzas, sushis, cachorros-quentes, ou em reuniões de trabalho, contribuíram bastante para esse trabalho. Obrigado!

Aos **professores** do departamento que, seja nas disciplinas ministradas ou conversas particulares, contribuíram, não apenas para a conclusão desse trabalho, como também para meu amadurecimento científico. Ensinos que vou levar comigo o resto da vida. Muito obrigado!

Aos **colegas da Zoologia**, pelas viagens, auxílio nas coletas e conhecimentos compartilhados. Muito obrigado!

Aos **colegas de apartamento**, por terem diminuído a saudade de casa. Muito obrigado!

À minha única avó, **Gisela Gempel**, e aos meus avôs, já falecidos, incentivadores, mesmo que indiretamente, de todos os meus passos: **Mario Grotta e Beatriz Grotta e Heinz Werner Gempel**.

Aos meus pais **Mario Gempel e Marinei Grotta** por sempre terem me apoiado em todas minhas escolhas. Educação e valores que vou levar pelo resto de minha vida e espero poder passar para meus filhos da mesma forma que me foi passada. Muito obrigado, amo vocês!

Aos meus irmãos **Rafael**, pelo exemplo de perseverança e dedicação e **Eduardo**, por todo carinho e apoio, apesar da distância. Muito obrigado, amo vocês!

À minha eterna princesinha **Mônica**. Bênção de Deus na minha vida. Muito Obrigado por todo apoio e paciência. Te amo!

A todas as pessoas que contribuíram para a realização desse trabalho, direta ou indiretamente, meu agradecimento.

RESUMO

Os ambientes cavernícolas podem ser vistos como um experimento natural de exclusão de alguns fatores ecológicos, dentre os quais o mais importante é a ausência do fotoperíodo.

A perda ou redução dos olhos e da pigmentação cutânea melânica em relação aos indivíduos viventes na superfície são os exemplos mais comuns das alterações sofridas pelas espécies exclusivamente subterrâneas.

Alterações nas características relacionadas ao sistema ocular sempre receberam grande atenção por parte dos pesquisadores. Por outro lado, as publicações sobre a pigmentação nesses organismos são relativamente incomuns, com uma abrangência taxonômica bastante reduzida.

Nossos experimentos foram realizados com três espécies pertencentes ao mesmo gênero: *Pimelodella kronei* e *P. spelaea*, viventes em ambientes de caverna e *P. transitoria*, de superfície.

Visamos comparar se existe um padrão que correlacione o grau de redução da pigmentação, medida pelas características macroscópicas, com as características das células pigmentares.

Dentro do esperado, *P. spelaea* e *P. kronei* apresentaram menor tamanho e menor densidade de melanóforos do que seu congênere epígeo, *P. transitoria*.

Nossos resultados não apontaram para uma correlação positiva entre o grau de troglomorfo, medido pelas características macroscópicas, e a resposta fisiológica observada nos exemplares cavernícolas.

A variabilidade observada nos estados da pigmentação em peixes troglomórficos brasileiros é compatível com hipóteses envolvendo pressões seletivas neutras, corroborando, portanto, o modelo neutralista.

ABSTRACT

The cave environments can be seen as a natural experiment of exclusion of certain ecological factors, among which the most important is the absence of photoperiod.

The loss or reduction of eyes and skin melanin pigmentation in relation to individuals living on the surface are the most common examples of the changes undergone by the species exclusively subterranean.

Changes in characteristics related to the ocular system have always received great attention from researchers. However, publications on the pigmentation in these organisms are relatively uncommon, with a very small taxonomic range.

Our experiments were conducted with three species of the same genre: *Pimelodella kronei* and *P. spelaea*, living in cave environments, and *P. transitoria*, living in surface.

We aim to compare if there is a pattern that correlates the degree of reduction of the pigment with the characteristics of pigment cells.

As expected, *P. spelaea* and *P. kronei* showed smaller size and lower density of melanophores than its counterpart epigeal, *P. transitoria*.

Our results did not suggest a positive correlation between the degree of troglomorphy measured by macroscopic characteristics, and physiological response observed in cave specimens.

The variability observed in the states of pigmentation in Brazilian troglomorphic fish is compatible with neutral hypotheses involving selective pressures, supporting therefore the neutralist model.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Organismos troglóbios e troglomorfismos

Os habitats subterrâneos podem ser vistos como um experimento natural de exclusão de fatores ecológicos tais como: fotoperíodo, oscilação de temperatura e certas fontes de alimento, sendo a ausência de luz a principal característica comum a esses ambientes (Culver, 1982). Assim, os organismos troglóbios (organismos restritos aos ambientes subterrâneos) são considerados um extraordinário material para estudos evolutivos, uma vez que as pressões seletivas a que estão submetidos são relativamente fáceis de serem identificadas (Trajano e Bockmann, 1999; Jeffery, 2001).

Por apresentarem essas características e, conseqüentemente, condições peculiares, esses ambientes subterrâneos são altamente limitantes à colonização por organismos epígeos (da superfície), de modo que nem todos os táxons epígeos incluem representantes vivendo em habitats subterrâneos. Entre estes, destacam-se os organismos troglóbios, que geralmente apresentam uma série de autoapomorfias (troglomorfismos – características relacionadas à evolução nesses ambientes), incluindo características morfológicas, fisiológicas, comportamentais e ecológicas. Tais autoapomorfias são geralmente relacionadas às condições particulares do ambiente subterrâneo que, mesmo podendo apresentar condições extremas, é geralmente mais estável que o ambiente epígeo (superficial). De modo geral, essas espécies originam-se de populações troglófilas, ou seja, espécies que são capazes de completar seu ciclo de vida tanto no meio subterrâneo quanto no meio epígeo, que, uma vez isoladas geneticamente das epígeas, começaram a se diferenciar. Desse modo, os habitats cavernícolas podem constituir refúgio, onde populações sobrevivem e diferenciam-se durante períodos de

estresse climático na superfície (Barr, 1968; Trajano e Bockmann, 1999; Trajano e Bichuette, 2005).

Quanto às características morfológicas, a redução ou mesmo a perda dos olhos e da pigmentação cutânea melânica em relação aos aparentados epígeos são os exemplos mais comuns em espécies exclusivamente subterrâneas (Wilkins, 1988). Outras estruturas tais como órgãos sensoriais, número de escamas e taxas metabólicas, também sofrem modificações (Hüppop, 1986; Wilkins, 1988; Jeffery *et al.*, 2000; Wilkins, 2001). Além das alterações morfológicas e fisiológicas, os peixes teleósteos troglóbios também apresentam mudanças comportamentais, tais como diminuição da resposta fóbica e diminuição da agressão (Parzefall e Trajano, 2010).

Devido às circunstâncias ecológicas, algumas características podem apresentar sua função perdida ou diminuída e por isso se tornarem vestigiais e desaparecer (Dobzhansky, 1970). Este é o caso de características sobre as quais a luz exerce forte pressão seletiva, tais como órgãos visuais e pigmentação (Trajano e Bockmann, 1999).

A primeira espécie de peixe subterrâneo troglóbica a ser descrita foi *Amblyopsis spelaea*, nos Estados Unidos (Dekay, 1842). Desde então, mais de 149 espécies (até dezembro de 2008) foram descobertas em todos os continentes, com exceção da Europa, inclusive em algumas ilhas como, por exemplo, Cuba e Madagascar.

Dentre essas espécies, mais de trinta e cinco são conhecidas do México, Caribe, Venezuela, Equador, Peru, Bolívia e Brasil, incluindo vários táxons ainda não descritos (Proudlove, 2010). A grande maioria são siluriformes pertencentes às famílias Heptapteridae (*Rhamdia* e *Pimelodella*, entre outros), Trichomycteridae (*Trichomycterus* e *Ituglanis*) e Loricariidae (*Ancistrus*) (Trajano e Bichuette, 2010).

A ictiofauna subterrânea brasileira é notável, não apenas devido à riqueza de espécies, mas também por sua alta diversidade ecológica e evolutiva. São conhecidas

atualmente mais de 25 espécies com diferentes graus de especialização morfológica, que vivem em uma grande diversidade de habitats, desde regiões epicársticas até riachos correntes no nível de base e corpos d'água freáticos, em diferentes regiões cársticas e algumas não cársticas (Trajano e Bichuette, 2010). Essas áreas são submetidas a climas distintos, às vezes contrastantes. Por isso, peixes subterrâneos devem se adaptar a diferentes condições ecológicas, variando de uma falta acentuada de alimento, muitas vezes sazonal, até certa estabilidade climática e, em alguns casos, abundância de recursos alimentares.

A primeira espécie descrita no Brasil foi *Pimelodella kronei*, proveniente do Alto Ribeira, São Paulo, descrito inicialmente como *Typhlobagrus kronei* Ribeiro, 1907. Também conhecido com Bagre Cego, foi a primeira espécie subterrânea estudada em detalhes na América do Sul por Pavan (1945) e posteriormente por Trajano (1987). Por isso, esse peixe subterrâneo representa uma importante referência histórica no desenvolvimento do estudo da biologia subterrânea no nosso país.

Nas últimas duas décadas, estudos sobre a taxonomia, história natural, ecologia populacional e o comportamento dos peixes troglóbios do Brasil têm semultiplicado, abrangendo diversas espécies que vivem em diferentes tipos de habitats subterrâneos e mostrando diferentes graus de redução de olhos e pigmentação melânica (Parzefall e Trajano, 2010).

Esses caracteres apresentam uma distribuição em mosaico, sem uma correlação taxonômica, uma vez que espécies aparentadas podem diferir mais entre si quanto a esses caracteres do que em relação a espécies menos relacionadas. Assim, são encontradas desde populações pouco mais claras e com olhos um pouco menores que os de seus parentes epígeos (p. ex. *Pimelodella spelaea*), até espécies em que nenhum indivíduo possui olhos visíveis e são completamente despigmentados (p. ex. *Ancistrus*

formoso). Também existem várias populações com grande variação individual quanto ao grau de redução dos olhos e da pigmentação.

Dentre os dois troglomorfismos clássicos - redução dos olhos e da pigmentação melânica cutânea - o primeiro sempre recebeu grande atenção por parte dos pesquisadores. De fato, há várias dezenas de publicações dedicadas às estruturas receptoras de luz em vertebrados troglóbios enfocando da morfologia básica à ultraestrutura e biologia molecular (e.g. Erickson, 1993; Jeffery, 2001; Protas *et al.*, 2006; Wilkens, 2007). Por outro lado, são relativamente incomuns as publicações sobre a pigmentação nesses organismos e com uma abrangência taxonômica bastante reduzida.

Diversas espécies, principalmente do México, Brasil, Índia e norte da África, tem sido estudadas em maior ou menor detalhe. No entanto, o *Astyanax* tem sido mais intensamente estudado do que todos os outros grupos importantes com várias características troglóbias. Os ciprinídeos ainda são muito pouco estudados e os siluriformes encontram-se no meio termo. A relativa escassez no estudo de grupos de indivíduos impede que padrões gerais sejam estabelecidos.

Como dito anteriormente, o isolamento em ambientes subterrâneos pode ter influenciado na mudança de algumas características destes indivíduos, como por exemplo, na pigmentação, através da diminuição do tamanho e na densidade de melanóforos, bem como pela perda da capacidade de sintetizar melanina, levando ao empalidecimento desses peixes, como por exemplo, o bagre brasileiro, *Pimelodella spelaea* (Trajano *et al.*, 2004). Além disso, pode haver também a perda ou redução da capacidade de responder a hormônios e neurotransmissores envolvidos no controle da pigmentação.

De acordo com Felice e outros (2008) a abordagem molecular tem sido muito utilizada em estudos genéticos acerca de disfunções da pigmentação tais como o albinismo oculocutâneo (OCA, do inglês *oculocutaneous albinism*), que se caracteriza pela redução ou ausência da biossíntese de melanina nos melanócitos da pele, dos folículos pilosos e dos olhos. Este poderia ser o mecanismo envolvido na redução da pigmentação em algumas espécies brasileiras.

Existem quatro tipos de OCA. O tipo 1 (tirosinase-negativa) e o tipo 3 (TRP-1) são causados respectivamente por mutações genéticas que levam à perda da função da tirosinase ou TRP-1 respectivamente e ao aumento da degradação proteossômica da tirosinase (Yamagushi *et al.*, 2007). Os tipos 2 e 4 são causados pela falha no endereçamento da tirosinase para os melanossomos. Esses tipos 2 e 4 são conhecidos como albinismo tirosinase-positivo.

A presença de melanina nas células de amostras de *Stygichthys typhlops*, *Ancistrus formoso*, *Rhamdiopsis* sp., *Taunayia* sp. e *Astyanax* sp. sugere que essas espécies não são homozigóticas e a diferenciação dos melanóforos estaria sob o controle de um sistema poligênico aditivo.

Por outro lado, a distribuição descontínua de fenótipos pigmentados e despigmentados em *T. itacarambienses*, onde um terço da população não responde à administração de Dopa e dois terços são claramente pigmentados, porém com variabilidade contínua na cor, do cinza escuro ao mais claro, é condizente com o modelo recessivo monogênico de herança de fenótipos despigmentados.

Nota-se, portanto, que diferentes mecanismos genéticos de redução da melanina ocorrem em peixes troglóbios, os quais podem coexistir nas mesmas espécies: um sistema poligênico, que estaria envolvido na redução dos melanóforos determinando sua densidade na pele, e sistemas monogênicos, que estariam envolvidos na habilidade de

sintetizar melanina, podendo ser perdidos devido ao bloqueio de uma ou mais etapas na síntese desse pigmento (Felice *et al.*, 2008).

1.2 Células pigmentares

Padrões de pigmentação são importantes indicadores em reconhecimento inter/intraespecífico, escolha de parceiros sexuais, defesas contra predadores e proteção UV (Parichy, 2001). Tais características são dependentes da presença de cromatóforos – células pigmentares (Fujii, 1993). Para que estratégias cromáticas possam ter efeito, em animais heterotérmicos e alguns invertebrados, faz-se necessário o desencadeamento de reações fisiológicas. Essas respostas são conhecidas como respostas fisiológicas rápidas por envolver apenas o deslocamento de grânulos de pigmento dentro das células pigmentares da pele.

Em teleósteos, a pigmentação corporal depende basicamente de cinco classes de cromatóforos:

- a) **Melanóforos:** são cromatóforos escuros, ricos em melanina e de aspecto dendrítico. Eles representam o tipo de cromatóforo mais comum nos peixes, assim como nas demais classes de vertebrados. Têm sido muito utilizados em estudos acerca dos fatores que influenciam a coloração e os cromatóforos.
- b) **Eritróforos:** são cromatóforos avermelhados, também de aspecto dendrítico, que contêm pigmentos carotenoides e pteridinas. São encontrados na derme de várias espécies de peixes e em geral, apresentam as mesmas características morfológicas dos melanóforos.

- c) **Xantóforos:** também são cromatóforos dendríticos, no entanto de coloração amarelada. Os compostos responsáveis pela cor são os carotenoides e as pteridinas, assim como nos eritróforos, neste caso com proporções diferentes. Estão geralmente distribuídos junto aos melanóforos e têm a função de dar um tom amarelado ao preto, fazendo surgir o tom marrom que é muito comum no tegumento dos peixes.
- d) **Iridóforos:** são células que contêm em seu citoplasma, cristais que refletem a luz. Esses cristais consistem principalmente de guanina e são muito frequentes na pele dos peixes, especialmente na região abdominal, que, em geral, apresenta coloração prateada ou esbranquiçada.
- e) **Leucóforos:** refletem a luz graças à presença de grânulos de purina. Dentro deles existem inúmeras organelas globulares limitadas por membranas que refletem a luz incidente em todas as direções (leucossomos).

Nos vertebrados, essas células originam-se da crista neural, grupo de células embrionárias pluripotentes (Hall, 1999) que migram através da via dorsolateral entre os somitos, até alcançarem seu maior sítio de diferenciação no saco vitelínico, derme e/ou epiderme e nadadeiras (Erickson, 1993; Jeffery, 2001).

A diferenciação dos melanóforos envolve a formação inicial de melanoblastos (indiferenciados), os quais sintetizam melanina e se tornam melanóforos funcionais. McCauley e outros (2004) verificaram que quanto mais despigmentados os indivíduos, maior a proporção de melanoblastos. Tal processo de diferenciação ocorre nos melanossomos (organelas citoplasmáticas) a partir do aminoácido tirosina e é conhecido como melanogênese (síntese de melanina). O primeiro evento deste processo é a transformação da tirosina em L-Dopa através da ação da enzima tirosinase (Figura 1).

Figura 1. Reações de formação da melanina

Mutações que afetam a funcionalidade da tirosinase resultam em indivíduos incapazes de produzir melanina. Estes, em biologia subterrânea, são chamados “despigmentados”, embora possam apresentar outros tipos de pigmentos, como a guanina (cor prateada, iridescente) e os carotenoides (cor amarelada). Um modo de se detectar indiretamente mutações no gene que codifica a tirosinase é fornecer L-Dopa às células e verificar se estas podem, então, completar a reação e produzir melanina. No caso de mutações que afetam passos na cadeia posteriores à síntese de L-Dopa, a aplicação desta não contornará a falha e os cromatóforos continuarão incapazes de produzir o pigmento escuro (Felice *et al.*, 2008).

Por essas e outras razões, esses animais podem ser considerados modelos para o entendimento da evolução dessas características e, segundo Mason e Mason (2000) têm atraído grande interesse entre os cientistas.

1.3 Hormônios e neurotransmissores

Algumas substâncias como hormônios e neurotransmissores e seus moduladores influenciam o movimento de grânulos de pigmento nos cromatóforos. Essa influência

pode ocorrer de diferentes formas, podendo ser endócrina, neural ou ainda ambos, como ocorre na maioria das células pigmentares de teleósteos (Fujii e Oshima, 1986; Fujii, 1993). No geral, grande parte dos estímulos ambientais é percebida pelos órgãos dos sentidos e essas informações são transferidas para o sistema nervoso central, onde são processadas e então convertidas em reações cromáticas apropriadas, originando uma “resposta cromática secundária”. Outros fatores como: luminosidade, temperatura, osmolaridade, entre outros podem influenciar os cromatóforos diretamente e por isso provocam uma “resposta cromática primária” (Fujii, 2000).

O hormônio MCH “*melanin-concentrating hormone*” é um peptídeo neuroipofisário sintetizado por neurônios hipotalâmicos e liberado por terminais axonais no lobo neuro-intermédio (Bittencourt *et al.*, 1992). O papel do MCH na mudança da coloração dos vertebrados heterotérmicos, mais especificamente teleósteos, tem sido bem documentado (Baker, 1991). Em vários estudos, MCH tem se mostrado eficaz na agregação de melanossomos de teleósteos (e.g. Nagai *et al.*, 1986; Kawauchi, 2006; Logan *et al.*, 2006). Todavia, Castrucci e outros (1988) verificaram que no muçum, *Symbranchus marmoratus*, em altas concentrações, este agiu dispersando grânulos de pigmento, tendo efeito contrário em concentrações mais baixas.

Catecolaminas, sintetizadas e liberadas pelo sistema nervoso simpático e glândula adrenal, são potentes agregadores de grânulos (Fujii e Oshima, 1986; Visconti e Castrucci, 1993; deOliveira *et al.*, 1996). Cromatóforos de vários peixes são regulados primariamente pelo sistema nervoso simpático (Fujii, 1961). Por isso, a agregação das células pigmentares é induzida através da ativação de receptores adrenérgicos presentes na membrana celular. De fato, a adrenalina, uma das mais conspícuas catecolaminas (Fujii, 2000), desempenha um papel muito importante na mudança da coloração de

peixes e, se mostrou um eficiente agregador de melanóforos de teleósteos (Fujii, 1961; Scott *et al.*, 1962; Scheline, 1963).

A transmissão periférica até os melanóforos também pode ser colinérgica de acordo com Hayashi e Fujii (1991) e, neste caso, o neurotransmissor é acetilcolina ao invés de adrenalina. A acetilcolina se mostrou eficiente agente agregador de pigmentos em algumas espécies (Fujii e Miyashita, 1978).

1.4 Hipótese

Animais isolados em habitats subterrâneos, perpetuamente escuros, tendem a apresentar, além de outras características, graus variáveis de regressão da pigmentação, com uma redução do tamanho e/ou densidade das células pigmentares. Nossa hipótese é a de que, além dessas alterações morfológicas, há uma diminuição da resposta a neurotransmissores e hormônios melanotrópicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o grau de redução do tamanho e densidade dos cromatóforos, e das respostas destas células a hormônios e neurotransmissores, de duas espécies troglóbias, *Pimelodella kronei* e *Pimelodella spelaea*, comparando-as com uma espécie congênere, *Pimelodella transitoria*, epígea.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar o tamanho e a densidade das células pigmentares, em áreas homólogas do corpo de exemplares pertencentes às três espécies em questão;
- Verificar o percentual das células que respondem a hormônios e neurotransmissores;
- Verificar o padrão da resposta dos grânulos de pigmento a hormônios e neurotransmissores, em diferentes concentrações;
- Verificar a resposta das células dos exemplares expostos a L-Dopa, buscando-se comparar a proporção entre melanoblastos (células não diferenciadas evidenciadas por L-Dopa) e melanóforos (células diferenciadas);
- Verificar se há um padrão que correlacione o grau de redução da pigmentação com as características das células pigmentares, comparando duas espécies troglóbias e uma epígea.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As três espécies são de acesso relativamente fácil, as populações suportam coletas e transporte prolongado. Há a possibilidade de se manter os exemplares em laboratório por períodos relativamente longos e mostram-se um excelente material para estudos comparativos no que diz respeito a diferentes graus de redução dos olhos e da pigmentação (Trajano e Bichuette, 2005; Felice *et al.*, 2008).

3.1 Gênero *Pimelodella*

O gênero *Pimelodella*, com 71 espécies válidas distribuídas desde o Panamá até o Paraguai e no sudeste do Brasil, é o maior dentre os gêneros da família Heptapteridae (Bockmann e Guazelli, 2003), sendo conhecidos popularmente como bagres. Eingenmann (1917) diagnosticou o gênero baseado em várias características não exclusivas, mas considerando algumas que, quando combinadas, fornecem um diagnóstico. Algumas dessas características são: uma nadadeira adiposa longa; nadadeira caudal profundamente bifurcada; presença de fontanelas frontal e parietal, a última atingindo a base do processo occipital, que é estreito e atinge, ou quase atinge a placa em frente à dorsal. Tal metodologia é utilizada até hoje para se identificar o gênero.

Entre as três espécies utilizadas neste estudo, *Pimelodella kronei* (Miranda Ribeiro, 1907), *Pimelodella spelaea* (Trajano *et al.*, 2004) e *Pimelodella transitoria* (Miranda Ribeiro, 1907), as duas primeiras habitam exclusivamente ambientes de caverna e apresentam diferentes graus de redução. *P. transitoria* habita ambientes de superfície, podendo constituir populações troglófilas, e possui as características

morfológicas e fisiológicas típicas de organismos epígeos, o que proporciona um excelente modelo comparativo.

Pimelodella transitoria (Figura 2) habita ambientes epígeos da bacia do rio Ribeira de Iguape, no Vale do Ribeira, no estado de São Paulo. Os indivíduos desta espécie são relativamente sedentários e a sua territorialidade está centrada principalmente na defesa de esconderijos, diferentemente de *P. kronei*, que defende principalmente os seus recursos alimentares (Trajano, 2001). Taxas médias de crescimento similares às registradas para *P. kronei* foram calculadas por Gerhard (1999) para *P. transitoria*, em córregos epígeos da área cárstica do Alto Ribeira durante a estação chuvosa (1.0 mm mês^{-1}), e taxas menores foram registradas na estação seca (0.5 mm mês^{-1}). Nessa espécie são observados casos de crescimento negativo, no entanto de uma forma mais rara do que *P. spelaea*. Com relação ao tamanho corporal, os indivíduos de *P. transitoria* apresentam, assim, comprimento máximo de 13 cm e sua longevidade é estimada em 4.1-12.4 anos (Trajano, 2001).

Figura 2. Indivíduo de *Pimelodella transitoria*.

Pimelodella kronei (Figura 3), popularmente chamado bagre cego, é uma espécie troglóbia que habita riachos de cabeceira nas cavernas, com leitos rochosos e corredeiras intercaladas com muitas piscinas de fundo macio. São animais de hábito

alimentar generalista. Não apresentam comportamento críptico bem desenvolvido, provavelmente devido à ausência de predadores nas cavernas. Esses peixes são predadores ativos que frequentemente exploram a coluna d'água e a superfície e não exibem fotofobia (Trajano, 1989), comportamento que os torna muito vulneráveis à captura. Os indivíduos de *Pimelodella kronei* apresentam tamanho máximo médio de 15,4 cm, lentas taxas de crescimento individual ($0,1 \text{ cm mês}^{-1}$) e alta longevidade (10-15 anos) (Trajano, 1991). Além disso, a grande maioria dos espécimes não apresenta olhos visíveis (Trajano e Britski, 1992).

Figura 3. Exemplar de *Pimelodella kronei*, o bagre cego.

Assim como os troglóbios em geral, esses animais são vulneráveis a estresses ambientais devido a fatores como o seu habitat restrito, sua distribuição geográfica e populações reduzidas e a sua relativa baixa tolerância a flutuações ambientais, entre outros fatores, que fazem da recuperação de populações em declínio um processo lento (Trajano, 1997).

Pimelodella spelaea (Figura 4) é uma espécie descrita de um riacho subterrâneo tributário do rio São Bernardo dentro da caverna São Bernardo, na área cárstica de São Domingos, alto rio Tocantins, Goiás, Brasil. Ela pode ser distinguida dos seus

congêneres epígeos (de superfície) por características troglomórficas derivadas tais como olhos e pigmentação reduzidos. No entanto, os olhos de *P. spelaea*, apesar de menores que os das espécies epígeas relacionadas, apresentam um menor grau de redução em comparação com outros heptapterídeos troglóbios, tais como *P. kronei*, (a grande maioria dos espécimes com olhos não visíveis externamente) e os heptapterídeos do Estado da Bahia, completamente sem olhos e despigmentados.

Apesar de ser nitidamente mais pálida do que a maioria dos seus parentes epígeos, o padrão de coloração de *P. spelaea* segue o padrão típico dos bagres pertencentes ao gênero *Pimelodella*. Segundo Trajano e outros (2004), A pigmentação em *P. spelaea* não é tão reduzida quando comparada aos indivíduos de *P. kronei*.

Figura 4. Exemplar de *Pimelodella spelaea*.

Não se sabe a extensão atual do habitat de *P. spelaea*, mas a topografia da caverna, a ausência de registros em outra localidade e a ausência de adaptações para a vida em pequenos espaços freáticos indica um habitat geograficamente restrito. Portanto, estima-se o tamanho total da população de *P. spelaea* em centenas, talvez atingindo 1000 indivíduos, o que é considerado um pequeno tamanho populacional até mesmo para o padrão dos peixes cavernícolas (Trajano, 2001; Trajano *et al.*,

2004). Casos de crescimento negativo foram registrados para essa espécie, sugerindo que o estresse alimentar também ocorre nos habitats epígeos

3.2 Coleta e manutenção dos espécimes

Os exemplares de *P. spelaea* foram coletados de um riacho subterrâneo tributário do rio São Bernardo dentro da caverna São Bernardo, na área cárstica de São Domingos, Alto Rio Tocantins – GO, entre 17 a 23 de outubro de 2008. Os exemplares de *P. kronei* e *P. transitoria* foram coletados na bacia do rio Betari, Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira – PETAR – SP entre 27 a 30 de março de 2009.

Após a coleta, os exemplares de *P. spelaea* e *P. kronei* foram mantidos no Laboratório de Biologia Subterrânea do Departamento de Zoologia – IBUSP, em escuro constante e temperatura entre 20 e 22°C. Duas vezes por semana, os animais recebiam alimento vivo, crustáceos *Artemia* e minhocas.

Os exemplares de *P. transitoria* foram mantidos no Laboratório de Fisiologia Comparativa da Pigmentação do Departamento de Fisiologia Geral – IB USP, sob ciclo claro/escuro de 12h:12h. Esses exemplares foram alimentados com minhocas, também duas vezes por semana, mantidos em temperatura ambiente de aproximadamente 25°C.

Foram utilizados todos os indivíduos disponíveis nos laboratórios. Oito exemplares adultos de *P. kronei*, sete de *P. spelaea* e seis de *P. transitoria*, totalizando 21 indivíduos.

3.3 Coleta de amostras, equipamento utilizado e funcionamento do sistema

Nos experimentos, foram utilizadas fragmentos da nadadeira caudal que se regeneram naturalmente, portanto não foi necessário o sacrifício dos animais. O processo de excisão é extremamente rápido visando o mínimo desconforto possível para os indivíduos. O desgaste da nadadeira é um processo que também ocorre na natureza o que implicaria em um processo de recuperação ainda menos traumático.

Durante o procedimento, os animais eram imobilizados sobre uma esponja molhada, enrolados em gaze. Após a remoção do fragmento, o local do corte era desinfetado e os peixes devolvidos rapidamente aos aquários ou caixas de origem.

Com tesoura esterilizada, parte da nadadeira era excisada e o material era acondicionado em uma placa de petri contendo 5 ml de solução fisiológica (NaCl – 7,48 g / KCl – 0,2 g / CaCl₂ – 0,2 g / NaHCO₃ – 0,2 g / Glicose – 1,0 g) por um período de 30 minutos para posterior análise ao microscópio.

Optamos por não anestésiar os peixes, pois a anestesia provoca alterações fisiológicas que poderiam afetar os resultados. Segundo a literatura, anestésicos como MS-222 e similares destroem, de forma reversível, o epitélio olfativo, de modo que seu uso impediria, por várias semanas, a utilização do mesmo indivíduo em estudos comportamentais, sobretudo os de comunicação química. Além disso, o procedimento de imobilização e corte do lobo da nadadeira é muito rápido, tomando 10-15 seg. no máximo e provocando um estresse aparentemente mínimo, do qual os peixes se recuperam rapidamente.

As observações das células foram realizadas com o auxílio de um microscópio óptico invertido da marca Zeiss – Axiovert100– onde foi acoplado um sistema (Figura 5), composto por: suporte metálico com seringa de vidro de 5 ml (A), câmara de

perfusão (B), bomba peristáltica (C) e um recipiente de vidro para descarte (D), interligados por cânulas de silicone e de polietileno e uma câmera fotográfica da marca Canon – A640, acoplada ao microscópio.

Figura 5. Esquema da montagem do sistema utilizado. Para maiores detalhes, ver descrição no texto.

A câmara de perfusão (Figura 5B; Figura 6) de 2,5 cm de diâmetro e 2,0 mm de espessura era fixada à platina do microscópio, sendo constituída de dois anéis de metal que se ajustavam a um anel intermediário de polietileno, cujos vãos eram fechados por duas lamínulas, colocadas entre o anel de polietileno e cada um dos anéis de metal. Estes eram aparafusados entre si, ficando assim a câmara hermeticamente fechada. O anel de polietileno era perfurado em dois lados opostos onde eram inseridas duas cânulas, também de polietileno.

Figura 6. Esquema da câmara de perfusão utilizada.
Para maiores detalhes, ver descrição no texto.

Após o período de 30 min., o fragmento da nadadeira era transferido para a câmara e fixado a uma das lamínulas com fita adesiva. Por meio das cânulas se procedia à troca das soluções. Uma das cânulas estava ligada à seringa de vidro pela qual eram introduzidas as soluções de interesse. A outra cânula estava ligada à bomba de sucção que gerava uma pressão negativa dentro da câmara de perfusão para esvaziá-la a uma velocidade constante de 5 ml por segundo.

As respostas dos melanóforos às soluções utilizadas eram avaliadas por meio de imagens capturadas pela câmera fotográfica digital acoplada ao microscópio.

3.4 Testes de resposta aos hormônios e neurotransmissores

Os hormônios e neurotransmissores utilizados foram analisados nas seguintes concentrações (em mM): adrenalina [10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5}]; acetilcolina [10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5}] e MCH [10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6}]. Para se avaliar a resposta dos cromatóforos, subdividiu-se o fragmento extraído da nadadeira caudal em três menores e cada um deles foi fixado em uma lamínula. Cada pedaço foi exposto a apenas um tipo de

hormônio ou neurotransmissor, evitando assim a sobreposição de respostas. O hormônio ou neurotransmissor era administrado ao fragmento a partir da solução menos concentrada para a mais concentrada, em intervalos de 5 min (adrenalina), 10 min (acetilcolina) e 15 min (MCH) entre uma e outra.

Cada indivíduo foi submetido a apenas um experimento. Para posterior análise dos dados foram feitos registros fotográficos do comportamento dessas células durante todo o experimento. Os resultados foram comparados ao índice cromatoforotrópico de Hogben e Slome (apud Bagnara e Hadley, 1973). Neste método, o grau de dispersão dos melanóforos é determinado de acordo com uma escala de 5 níveis, para produzir um índice cromatoforotrópico que varia entre 1 e 5. O método se baseia em cinco fases distintas que apresentam diferentes graus de dispersão de pigmento nos melanóforos; o estágio de maior agregação é designado como estágio 5 e o estágio de menor agregação, como estágio 1. Os estágios 2, 3 e 4 representam graus intermediários de dispersão dos pigmentos. Este método está atualmente sendo utilizado por muitos pesquisadores em todo o mundo para estudos relativos às respostas dos melanóforos de teleósteos, anfíbios e répteis a vários estímulos químicos, incluindo drogas e peptídeos melanotrópicos.

No nosso estudo o método foi modificado e foram considerados apenas quatro níveis de agregação, sendo o nível 4 o de maior agregação e o nível 1 de menor. A dificuldade de distinção entre as fases 3 e 4 do método original nos levou a realizar tal modificação.

Figura 7. Índice cromatoforotrópico de Hogben e Slome (1931) modificado.

3.5 Tamanho e densidade dos cromatóforos

Para se obter os dados referentes ao tamanho e densidade dos cromatóforos, foram feitas fotografias de áreas homólogas dos fragmentos de nadadeira de cada indivíduo.

Esses fragmentos eram expostos a adrenalina em concentração de 10^{-4} mM por cinco minutos antes do início da captura das imagens. Foi verificado que a adrenalina age como um forte agregador de cromatóforos, o que facilitou a contagem e medição dessas células por meio dos registros fotográficos e software apropriado.

3.6 Testes de reação à L-Dopa

Foram utilizados os mesmos passos do método descrito por Mishima (1960) e Hirobe (1982). Fragmentos do lobo inferior da nadadeira caudal foram removidos de animais vivos não anestesiados utilizando tesoura esterilizada. Estes fragmentos foram incubados em uma solução de tampão fosfato contendo 5% de formalina (pH 7,0), por 30 min a 4°C , lavados 2 vezes com água destilada e então incubados em uma solução com tampão fosfato (pH 6,8) contendo 0,1 % de L-Dopa, por 3,5 h a 37°C ; após 1,5 h do início do tratamento a solução foi substituída por uma nova. Os exemplares onde se

puder evidenciar melanóforos após os testes serão classificados como *Dopa* (+) e aqueles nos quais não se puder distinguir nenhuma célula pigmentada, como *Dopa* (-). Os registros fotográficos foram feitos antes (apenas com solução fisiológica) e depois do tratamento para que assim pudessem ser comparadas as proporções de melanoblastos e melanócitos.

Obs. Todos os indivíduos puderam ser utilizados posteriormente para estudos de escopo comportamental, realizado pelo grupo de pesquisa da Zoologia, pois todos os experimentos realizados são não invasivos.

3.7 Análise dos dados e análise estatística

A análise dos dados foi realizada com o auxílio dos programas: *Adobe® Photoshop® CS4*, *ImageJ 1.41N*, *Microsoft® Excel 2007* e *Graphpad®*. Foi utilizada a análise de variância – ANOVA, seguido de SNK. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Área da superfície celular:

A análise de variância revelou a existência de uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre a média das áreas dos melanóforos de *P. kronei* e *P. spelaea* em relação a *P. transitoria*. Enquanto as duas primeiras espécies apresentaram médias de 1212 unidades arbitrárias (u.a.) e 1067 u.a., respectivamente, a última apresentou média de 3374 u.a. A análise também revelou que a média das áreas dos melanóforos de *P. kronei* não diferiu da de *P. spelaea*. Deste modo, pôde-se observar uma clara redução no tamanho dos melanóforos dos animais que habitam os ambientes de caverna.

Os resultados são mostrados na Figura 8.

Figura 8. Média das áreas dos melanóforos de *Pimelodella* spp. e seus desvios padrão.

4.2 Densidade (número de células por área – 25 mm²):

Com relação à densidade (número de melanóforos por área – 25mm²), a análise de variância também revelou uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre *P. kronei* e *P. spelaea* em relação a *P. transitoria*. Os indivíduos das duas primeiras espécies apresentaram densidade média de 67 melanóforos/25mm² e 53 melanóforos/25mm², respectivamente, enquanto a última apresentou média de 116 melanóforos/25mm². A análise revelou ainda que a densidade média de melanóforos de *P. kronei* não diferiu significativamente da de *P. spelaea*. Neste caso, como também observado nos dados da área da superfície celular, pôde-se perceber uma clara redução no número de células pigmentares por área nos indivíduos residentes em ambientes subterrâneos.

Os resultados são mostrados na Figura 9.

Figura 9. Média da densidade dos melanóforos de *Pimelodella* spp. e seus desvios padrão.

A análise microscópica dos fragmentos das nadadeiras das três espécies mostra em detalhe a redução da densidade de melanóforos nas duas espécies hipógeas. A densidade em *P. transitoria* (Figura 10) é 1,73 vezes superior à densidade de *P. kronei* (Figura 11) e 2,19 vezes maior que em *P. spelaea* (Figura 12).

Figura 10. Fragmento da nadadeira de *P. transitoria* sob microscopia óptica (AT=150x). Densidade=130 células/25 mm².

Figura 11. Fragmento da nadadeira de *P. kronei* sob microscopia óptica (AT=150x). Densidade= 66 células/25 mm².

Figura 12. Fragmento da nadadeira de *P. spelaea* sob microscopia óptica (AT=150x). Densidade = 56 células/25 mm².

4.3 L-Dopa

Nas espécies estudadas, mesmo tendo sido administrado L-Dopa às três espécies, não foi observada nenhuma resposta à administração de L-Dopa em nenhum dos exemplares. Essa ausência de resposta é representada pelas imagens de *P. spelaea* mostradas nas figuras 13 e 14.

Figura 13. ANTES da administração do L-Dopa

Figura 15. DEPOIS da administração do L-Dopa, sem o indício de melanoblastos.

4.4 Resposta a hormônios

P. transitoria foi a espécie com o maior percentual de células responsivas à administração dos hormônios. Nessa espécie, uma média de 92,75% das células apresentou agregação na presença da adrenalina e 85,5% agregaram na presença do MCH.

Já em *P. kronei* e de *P. spelaea*, um número bem menor de células respondeu à administração desses hormônios. Em *P. kronei*, 42,8% das células agregaram na presença da adrenalina e 52% na presença do MCH. Em *P. spelaea*, a agregação média foi de 18,75% das células para a adrenalina e 36,2% das células para o MCH.

Nenhuma das três espécies apresentou resposta à acetilcolina.

Os dados estão mostrados na Tabela I.

Tabela I. Porcentagem células de *Pimelodella* spp. Que responderam a hormônios

(n.r. = não responde).

Hormônio Espécie	<i>Adrenalina</i>	<i>MCH</i>	<i>Acetilcolina</i>
<i>P. transitoria</i>	92,75 ± 8,2	85,5 ± 9,9	n.r.
<i>P. kronei</i>	42,8 ± 7,2	52 ± 7,8	n.r.
<i>P. spelaea</i>	18,75 ± 8,3	36,2 ± 14,7	n.r.

4.5 Curvas DOSE-RESPOSTA das células que apresentaram resposta aos hormônios

Considerando apenas as células que apresentaram agregação em resposta aos hormônios e neurotransmissores testados, verificou-se pela análise de variância que não há diferença estatística significativa entre as três espécies. Ou seja, apesar de os resultados na Tabela I mostrarem um número significativamente menor de células responsivas de *P. kronei* e *P. spelaea*, ao analisarmos apenas aquelas células que apresentaram resposta, verificamos que estas responderam com a mesma intensidade que as células de *P. transitoria* às variações na concentração de adrenalina (Figura 15) e MCH (Figura 16). Portanto, a diferença está no percentual de células que sofrem agregação e não na capacidade de agregação nas três espécies.

Figura 15. Gráfico da curva dose x resposta das células que responderam à adrenalina e seus desvios padrão.

Figura 16. Gráfico da curva dose x resposta das células que responderam à MCH e seus desvios padrão

5 DISCUSSÃO

Os resultados das nossas observações e testes, caracterizados pela significativa variação pigmentar, tanto intra quanto interespecífica, apontam para a existência de diferentes mecanismos associados à redução da pigmentação melânica em *Pimelodella spelaea* e *P. kronei*. Esses mecanismos podem se interpor ao longo da diferenciação de cada espécie ou população, podendo também atuar em diferentes velocidades, formando um verdadeiro mosaico no que diz respeito ao grau de redução observado em cada uma dessas espécies/populações. Forma-se assim, uma situação bastante complexa, distinta daquela registrada na literatura, referente a pouquíssimas espécies de peixes subterrâneos principalmente do gênero *Astyanax*.

Como visto anteriormente, além dos outros tipos de células pigmentares, o padrão de coloração dos peixes de superfície é formado primordialmente por melanóforos. Estas células formam um padrão característico de cada espécie e se encontram em maior número na região dorsal do corpo.

No seu estudo com *Astyanax*, Wilkens (1988) observou que os peixes subterrâneos apresentam, em média, 40% menos melanóforos do que seus congêneres de superfície.

No nosso estudo, exemplares das espécies de *Pimelodella* vivendo exclusivamente em ambientes subterrâneos também exibiram número bastante inferior ao dos exemplares epígeos examinados. *Pimelodella kronei* apresentou uma redução de 42% e *P. spelaea* 54% em relação a *P. transitoria*.

Além dessa redução no número das células pigmentares, observou-se também uma redução da área dos melanóforos dos indivíduos de caverna, de 65% em *P. kronei* e 68% em *P. spelaea*. Esta redução pode estar associada a uma redução também na

quantidade total de melanina, contribuindo para a cor mais clara observada nos espécimes hipógeos.

Portanto, a coloração mais pálida dos indivíduos de *P. kronei* e *P. spelaea* pode ser atribuída a dois possíveis mecanismos: a menor densidade e o menor tamanho dos cromatóforos, quando comparadas à espécie congênere.

Wilkens (1988), em seu estudo em *Astyanax*, ao observar as proles com variabilidade no grau de redução da pigmentação melânica, propôs que tal diminuição deve-se a mutações em um sistema poligênico aditivo.

Segundo Jeffery (2001), em peixes de caverna, além do declínio no número total de melanóforos existe também uma redução ou uma eliminação da capacidade dessas células de sintetizar melanina. O mesmo autor (2006), ao estudar uma população totalmente despigmentada de *Astyanax*, corrobora outros autores quando afirma que a perda da melanina se deve a alguma mutação (ou mutações) na tirosinase, que, por sua vez, afeta a melanogênese. Tal mutação (ou mutações) impediria que a tirosina fosse convertida em L-Dopa e/ou a dopaquinona.

McCauley (2004) também identificou espécimes onde a deficiência provavelmente ocorreu na enzima tirosinase, desta forma impossibilitando a formação da melanina.

Baseado em estudos pretéritos realizados por Felice e outros (2008) pôde-se identificar espécies brasileiras que respondiam à administração de L-Dopa, ou seja, concluíam a formação da melanina (Dopa +), e por outro lado, espécies que não respondiam à administração de L-Dopa (Dopa -).

No presente estudo, *P. kronei* e *P. spelaea* foram identificadas como Dopa (-), pois não foram evidenciadas células indiferenciadas (melanoblastos) quando as preparações eram incubadas com L-Dopa. Essa ausência de resposta à administração de

L-Dopa sugere que a mutação (ou mutações) responsável pela quebra da cadeia da melanogênese ocorreu em um ponto à jusante da formação de L-Dopa e não à montante como observada em outros casos. Tal informação reforça a ideia de que existem diferentes mecanismos associados à redução da pigmentação melânica em peixes troglomórficos. Poderíamos classificá-los como OCA1 (tirosinase-negativa) ou 3 (TRP-1), causados respectivamente por mutações genéticas que levam à perda da função da tirosinase, ou TRP-1 e/ou ao aumento da degradação proteossômica da tirosinase (Yamaguchi *et al.* 2007).

Como já mencionado anteriormente, vários hormônios e neurotransmissores estão envolvidos no controle da migração pigmentar nos vertebrados heterotérmicos, dos quais o MCH, o α -MSH, as catecolaminas e a acetilcolina estão, indubitavelmente, entre os mais importantes e conhecidos quanto a sua função na regulação hormonal da célula pigmentar. (Fujii e Oshima, 1994; deOliveira *et al.*, 1996; Nery e Castrucci, 1997; Fujii 2000, Visconti e Grempel, no prelo)

Nossos experimentos demonstraram uma diferença significativa com relação à porcentagem de células que responderam aos hormônios e neurotransmissores entre as três espécies, mas não mostraram nenhuma diferença na velocidade e na intensidade de resposta dessas células. Tais resultados não apontam, portanto, para uma regressão sob o ponto de vista dos mecanismos fisiológicos de controle da migração celular nestas espécies e, sim, uma regressão no que diz respeito ao número de células que responderam a tais hormônios.

Ao estudar Pleuronectiformes, Burton (2002) observou que além das diferenças de tamanho observadas nos cromatóforos, existem também diferenças fisiológicas. No seu estudo, ele observou que as células presentes na derme desses indivíduos apresentaram respostas diferentes quando expostas a um mesmo substrato ou estímulo.

Melanóforos da mesma região responderam diferentemente a estímulos elétricos e a hormônios pituitários.

Segundo Burton, essa diferença de sensibilidade se deu pelo tipo de receptor catecolaminérgico presente: adrenoceptor β ou α e este podendo ser do subtipo α -1 e α -2 (Burton e Vokey, 2000).

A diferença da quantidade de células responsivas às substâncias aplicadas observada no nosso estudo pode estar relacionada a alguma diferença nos receptores presentes nas regiões homólogas dos exemplares. Observou-se que as células dos organismos hipógeos responderam em número bastante inferior quando comparadas às células presentes nos organismos epígeos.

Tal diferença pode ser causada por alguma modificação sofrida nos receptores presentes nas células pigmentares das espécies que se encontram em escuro constante. Essa modificação impossibilitaria algumas células de responderem da mesma forma de seus congêneres de superfície a determinadas substâncias.

Ao contrário do esperado, em *P. spelaea*, menos troglomórfica que *P. kronei*, a proporção de células que responderam a adrenalina e MCH foi menor que neste. *P. transitoria* apresentou, dentro do esperado, a maior proporção de células responsivas. Portanto, nossos resultados não apontaram para uma correlação positiva entre o grau de troglomorfismo nestas espécies (medido pelas características macroscópicas, grau de regressão da pigmentação) e o percentual de resposta das células aos hormônios e neurotransmissores. Por outro lado, todos os melanóforos que responderam o fizeram com a mesma capacidade. Houve, assim, uma diferença quantitativa, mas não qualitativa.

Com exceção dos resultados obtidos por nosso grupo de estudo, não encontramos nenhuma referência que remeta a mecanismos desta natureza em peixes

subterrâneos. Em alguns experimentos realizados previamente por nosso grupo, encontramos outras espécies que apresentaram tempo de resposta semelhante aos nossos resultados com *Pimelodella spelaea* e *P. kronei*, quando expostas a adrenalina. Os exemplares não foram expostos a MCH, mas algumas espécies responderam à acetilcolina enquanto as três espécies de *Pimelodella*, não (Felice e outros, dados não publicados).

Não existem dados na literatura referentes às respostas dos melanóforos de indivíduos da família Heptapteridae expostos à acetilcolina.

Alguns autores observaram que a administração de acetilcolina em melanóforos de algumas espécies de siluriformes resultou em agregação pigmentar (Fujii e Miyashita, 1978; Fujii, 1993b). Assim, o neurotransmissor do sistema nervoso simpático envolvido seria acetilcolina ao invés de adrenalina. No entanto, Hayashi e Fujii, (1991) observaram que os cromatóforos de algumas das famílias de siluriformes apresentam tanto receptores adrenérgicos quanto colinérgicos.

Outra questão muito discutida sobre a evolução desses animais troglóbios diz respeito aos mecanismos subjacentes à regressão de caracteres, usualmente afetando olhos e pigmentação melânica cutânea. O isolamento, a deriva genética e outros processos evolutivos levariam à diferenciação de alguns caracteres como os olhos e a pigmentação, resultando em especiação troglomórfica (Jeffery, 2001). Várias hipóteses têm sido propostas.

Darwin, em seu livro “A Origem das espécies”, questionou o papel da seleção natural na perda ou na redução dos olhos em peixes de caverna: “*As it is difficult to imagine that eyes, although useless, could be in anyway injurious to animals living in darkness, I attribute it to desuse*” (Darwin, apud Protas *et al.*, 2007).

Atualmente os principais modelos para explicar a regressão de algumas características em troglóbios são divididos em dois grupos: os que direta ou indiretamente envolvem seleção natural (adaptativos) e aqueles que envolvem acúmulo de mutações neutras. Todos eles, no entanto, são baseados na observação de que estados regressivos de estruturas e comportamentos são geralmente aqueles que se tornam inoperantes para o habitat subterrâneo, ou seja, aqueles relacionados direta ou indiretamente à luz.

A marcante escassez de nutrientes, característica dos ecossistemas subterrâneos, estaria relacionada à primeira hipótese, por seleção natural. Não é surpreendente que a economia de energia foi uma das primeiras explicações evocadas para a regressão dessas características. Segundo este modelo, os indivíduos mutantes com olhos e pigmentação subdesenvolvidos, normalmente excluídos da população epígea, teriam uma vantagem sobre os indivíduos com olhos e pigmentação normais no habitat subterrâneo. Eles poderiam economizar energia extra para a sobrevivência e reprodução.

Embora atraente, este modelo não encontra um bom apoio a partir de dados empíricos e carece de generalidade. Nem todos os troglóbios que apresentam traços regressivos vivem em um ambiente com escassez de alimentos, e algumas cavernas podem ser bastante ricas em nutrientes, especialmente aquelas que abrigam grandes populações de troglótenos, como por exemplos os morcegos. Além disso, a regressão dos olhos e pigmentação também é observada em alguns organismos epígeos como os que vivem no solo profundo, em grandes rios de águas turvas, e também, endoparasitas, para as quais o alimento não é um fator limitante.

Na década de 40, Kosswig propôs uma hipótese para o acúmulo de mutações neutras como base na regressão dos olhos e pigmentação em troglóbios, como características que se tornaram inoperantes em um novo ambiente. A partir daquele

momento, muitos estudos genéticos, especialmente em *Astyanax*, foram projetados para apresentar provas para o modelo neutralista, como os de Wilkens (1988, 2010). Segundo a teoria neutralista, a principal causa da regressão de qualquer traço que perca sua função sob um novo regime seletivo é o acúmulo de mutações que se tornam neutras após uma mudança no modo de vida.

Existem evidências genéticas de que tais mutações, excluídas pela seleção estabilizadora sob o regime seletivo anterior, deixariam de ser eliminados e, porque as mutações são mais frequentemente deletérias do que construtivas, essas mutações se acumulariam e causariam desorganização das estruturas e perda de componentes fisiológicos e comportamentais (Trajano e Cobolli, em preparação).

Pré-adaptações (estado de caracteres que foram selecionados em um ambiente prévio independente e que conferem vantagem em um ambiente seletivo) aos ambientes hipógeos explicam o sucesso evolutivo de determinados táxons na colonização e estabelecimento de populações subterrâneas. Assim, a maioria dos peixes subterrâneos, troglófilos e troglóbios, pertencem a grupos caracteristicamente com hábitos de vida noturna e ênfase em sistemas quimio e mecanossensoriais, que os permitem encontrarem alimentos na ausência de luz. Assim, não é surpreendente o fato de que a grande maioria dos peixes troglomórficos neotropicais pertença à Ordem Siluriformes (peixes com hábitos noturnos e alta capacidade sensorial), inclusive no Brasil (Trajano, 1997; Trajano e Bichuette, 2010).

O isolamento desses bagres em habitats subterrâneos provavelmente ocorreu durante os períodos secos, como consequência de mudanças paleoclimáticas, quando corpos d'água cujas porções epígeas/hipógeas eram anteriormente contínuas, são fragmentados devido à quebra da continuidade hidrológica (Trajano, 1995; Cobolli-Sbordoni *et al.*, 1996; Trajano, 2001).

Durante esses períodos, a entrada de energia nas cavernas poderia diminuir devido à interrupção da drenagem da superfície e as comunidades aquáticas seriam isoladas em corpos d'água hipógeos descontínuos. Algumas dessas populações isoladas sobreviveriam após períodos de estresse climático, acumulando mudanças significativas que as levariam, eventualmente, a serem reconhecidas como espécies troglóbias filogeneticamente distintas. Outras sobreviveriam sem mudanças significativas, ou simplesmente não sobreviveriam (Trajano, 1995).

A variabilidade observada nos estados da pigmentação em peixes troglomórficos brasileiros é compatível com hipóteses envolvendo relaxamento de pressões seletivas, corroborando, portanto, o modelo neutralista. Estudos posteriores, com outras espécies da rica fauna subterrânea brasileira, poderão contribuir para estabelecer um elo mais preciso entre os mecanismos subjacentes à diferenciação em populações subterrâneas de peixes, dando origem a espécies troglóbias.

6 CONCLUSÕES

- a- Dentro do esperado, *P. spelaea* e *P. kronei* apresentaram menor tamanho e menor densidade de melanóforos do que seu congênere epígeo, *P. transitoria*.
- b- Nossos resultados não apontaram para uma correlação positiva entre o grau de troglomorfismo, medido pelas características macroscópicas, e o percentual de resposta das células aos hormônios e neurotransmissores.
- c- Nas três espécies, as células responsivas à administração dos hormônios e neurotransmissores o fizeram da mesma forma evidenciando, assim, uma diferença apenas quantitativa.
- d- A variabilidade observada nos estados da pigmentação em peixes troglomórficos brasileiros é compatível com hipóteses envolvendo relaxamento de pressões seletivas, corroborando, portanto, o modelo neutralista.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAGNARA, J. T.; HADLEY, M. E. Chromatophores and Color Change. **Prentice Hall, Englewood Cliffs**, 202pp, 1973.

BAKER, B. I. Melanin concentrating hormone: a general vertebrate neuropeptide. **International Review of Cytology**, 126:1-47, 1991.

BARR, T. C-Jr. Cave ecology and the evolution of troglobites. **Evolutionary Biology**, 2:35-102, 1968.

BITTENCOURT, J. C.; PRESSE, F.; ARIAS, C.; PETO, C.; VAUGHAN, J.; NAHON, J. L.; VALE, W.; SAWCHENKO, P. E. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno and hybridization histochemical characterization. **Journal of Comparative Neurology**, 319:218–245, 1992.

BOCKMANN, F.A.; G.M. GUAZZELLI. Heptapteridae (Heptapterids). p. 406-431. In R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris, Jr. (eds.). **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil, 2003.

BURTON, D. The Physiology of Flatfish Chromatophores. **Microscopy Research and Technique**, 58: 481-487, 2002.

BURTON, D.; VOKEY, J.E. $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -adrenoceptor mediation in melanosome aggregation in cryptic patterning of *Pleuronectes americanus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 125: 359-365, 2000.

CASTRUCCI, A. M. L.; VISCONTI, M. A.; HADLEY, M. E.; HRUBY, V. J.; OSHIMA, N.; FUJII, R. Melanin concentrating hormone (MCH) control of chromatophores. In: **Bagnara, J. T., Advances in Pigment Cell Research**. New York: Alan R. Liss; pp. 547-557, 1988.

COBOLLI, S.; DE MATTHAEIS, M; MATTOCCIA E; BERTI R. M; SBORDONI, V. Genetic variability and differentiation of hypogean Cyprinid fishes from Somalia. **Journal of Zoology**, Systematics and Evolution Research 34: 75 -84. 1996.

CULVER, D. **Cave Life, Evolution and Ecology**. Harvard Press, Cambridge, MA. 189 pp, 1982.

deOLIVEIRA, A. R.; CASTRUCCI, A. M. L.; VISCONTI, M. A. Cellular signalling in vertebrate pigment cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 29: 1743-1749, 1996.

DEKAY, J. E. **Zoology of New York or the New York fauna**. Part IV. Fishes. Albany: W. e A. White e J. Visscher, 1842.

DOBZHANSKY, T. **Genetics of the Evolutionary Process**. New York: Columbia University Press, 1970.

EINGENMANN, C. H. *Pimelodella* and *Typhlobagrus*. **Memories of Carnegie Museum**, 7:229-258. 1917.

ERICKSON, C. A. From the crest to the periphery: control of pigment cell migration and lineage segregation. **Pigment Cell Research**, 6: 336-347, 1993.

FELICE, V.; VISCONTI, M. A.; TRAJANO, E. Mechanisms of pigmentation loss in subterranean fishes. **Neotropical Ichthyology**, 6(4): 657-662, 2008.

FUJII, R. Demonstration of the adrenergic nature of transmission at the junction between melanophores-concentrating nerve and melanophores in bony fish. **Journal of the Faculty of Sciences**, University of Tokio IV. 9:171-196, 1961.

FUJII, R.; OSHIMA, N. Control of chromatophore movements in teleostean fishes. **Zoological Science**, 3:13-47, 1986.

FUJII, R. Coloration and chromatophores. In: Evans DH. **The Physiology of Fish**. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 535-562, 1993.

FUJII, R(b). Cytophysiology of fish chromatophores. **International Review of Cytology**, 143:191-225, 1993.

FUJII, R. Review. The Regulation of Motile Activity in Fish Chromatophores. **Pigment Cell Research**, 13:300-319, 2000.

FUJII, R.; MIYASHITA, Y. Receptor mechanisms in fish chromatophores – IV. Effect of melatonin and related substances on dermal and epidermal melanophores of the siluriform, *Parasilurus asotus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 59C:59-63, 1978.

FUJII, R.; OSHIMA, N. Factors influencing motile activities of fish chromatophores. In: **Advances in Comparative and Environmental Physiology**. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1-54. 1994.

GERHARD, P. Ecologia de populações e comportamento de quatro espécies de bagres Heptapterinae (Teleostei: Siluriformes) em riachos do Alto Vale do rio Ribeira (Iporanga, São Paulo). M. Sc. Thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo. P. 129.1999.

HALL, B. K. **The Neural Crest in Development and Evolution**. Springer, New York, 1999.

HAYASHI, H.; FUJII, R. Muscarinic cholinergic receptors mediate pigment aggregation within melanophores in some cyprinid fish, *Zacco*. **Zoological Science**, 8: 1055, 1991.

HIROBE, T. Origin of melanosome structures and cytochemical localizations of tyrosinase activity in differentiating epidermal melanocytes of newborn mouse skin. **Journal of Experimental Zoology**, 224: 355-363, 1982.

HÜPPOP, K. Oxygen consumption of *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). A comparison of epigeal and hypogeal populations. **Environmental Biology of Fishes**, 17: 299-308, 1986.

JEFFERY, W. R.; STRICKLER, A. G.; GUINEY, S.; HEYSER, D. G.; TOMAREV, S. I. *Prox 1* in eye degeneration and sensory organ compensation during development and evolution of the cavefish, *Astyanax*. **Development Genes and Evolution**, 210: 223-230, 2000.

JEFFERY, W. R. Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. **Developmental Biology** 231:1-12, 2001.

JEFFERY, W. R. Convergence of pigment regression in cave animals: developmental, biochemical and genetic progress toward understanding evolution of the colorless phenotype. P.38 In: Moldovan, O. T. (ed.). **XVIIIth International Symposium of Biospeleology – 100 years of Biospeleology**, Cluj-Napoca, SIBIOS – Société Internationale de Biospéologie [abstracts]. 2006.

KAWAUSHI, H. Functions of Melanin-Concentrating Hormone in Fish. **Journal of Experimental Zoology**, 302A: 751-760, 2006.

LOGAN, D. W.; BURN, S. F.; JACKSON, J. I. Regulation of Pigmentation in Zebrafish Melanophores. **Pigment Cell Research**, 19: 206-213, 2006.

MASON, K. A.; MASON, S. K. F. Evolution and development of pigment cells: at the crossroads of the discipline. **Pigment Cell Research**, 13 (suppl. 8):150-155, 2000.

MCCAULEY, D. W.; HIXON, E.; JEFFERY, W. Evolution of pigment cell regression in the cavefish *Astyanax*: a late step in melanogenesis. **Evolution & Development**, 6:4, 209-218, 2004.

MISHIMA, Y. New technique for comprehensive demonstration of melanin, premelanin and tyrosinase sites. Combined DOPA – premelanins reaction. **Journal of Investigative Dermatology**, 34: 355-360, 1960.

NAGAI, M.; OSHIMA, N.; FUJII, R. A comparative study of melanin-concentrating hormone (MCH) action on the teleost melanophores, **Biological Bulletin**, 171:360-370, 1986.

NERY, L. E.; CASTRUCCI, A.M.L. Pigment cell signaling for physiological color change. **Comparative Biochemistry and Physiology**, A, 118:1135-1144, 1997.

PARICHY, C. M. Pigment patterns of ectothermic vertebrates: heterochronic vs. nonheterochronic models for pigment pattern evolution. In M. L. Zelditch (ed.). **Beyond Heterochrony: The Evolution of Development**. Wiley-Liss, New York, pp. 229-269, 2001.

PARZEFALL, J.; TRAJANO, E. Behavioral patterns in subterranean fishes. p. 81-114. In: **Biology of Subterranean Fishes**. Science Publ., Enfield, 480 pp, 2010.

PAVAN, C. Os peixes cegos das cavernas de Iporanga e a evolução. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Biologia Geral**, 79:1-104, 1945.

PROTAS, E. M.; HERSEY, C.; KOCHANNEK, D.; ZHOU, Y.; WILKENS, H.; JEFFERY, W. R.; ZON, L. I.; BOROWSKY, R.; TABIN, C. J. Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. **Nature Genetics**, 38, N.1, 2006

PROTAS, E. M.; CONRAD, M.; GROSS, J. B.; Tabin, C.; BOROWSKY, R. Regressive Evolution in the Mexican Cave Tetra, *Astyanax mexicanus*. **Current Biology**, 17, 452-454. 2007.

SCOTT, G. T.; CLARK, R. L.; HICKMAN, J. C. Mechanism of chromatophore control in the common sand flounder *Scophthalmus aquosus*. **Biological Bulletin**, Woods Hole 123, 486-487, 1962a.

TRAJANO, E. Fauna cavernícola brasileira: composição e caracterização preliminar. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 3, n. 8, P. 533-561, 1987.

TRAJANO, E. . Estudo do comportamento espontâneo e alimentar e da dieta do bagre cavernícola, *Pimelodella kronei*, e seu provável ancestral epígeo, *Pimelodella transitoria* (Siluriformes, Pimelodidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 3, p. 757-769, 1989.

TRAJANO, E. .Population ecology of *Pimelodella kronei*, troglobitic catfish from southeastern Brazil (Siluriformes, Pimelodidae).**Environmental Biology of Fishes**, Guelph, v. 49, n. 3, p. 757-769, 1991.

TRAJANO, E. Evolution of tropical troglobites: Applicability of the model of Quaternary climatic fluctuations. **Serie documents** – Laboratoires outerrain du C.N.R.S, Moulis, v. 22, p. 203-209, 1995.

TRAJANO, E. Threatened fishes of the world: *Pimelodella kronei* (Ribeiro, 1907) (Pimelodidae). **Environmental Biology of Fishes**, 49: 332, 1997.

TRAJANO, E. Ecology of subterranean fishes: an overview. **Enviromental Biology of Fishes**, 62: 133-160, 2001.

TRAJANO, E.; REIS,R. R.; BICHUETTE, M.E. *Pimelodella spelaea*, a new cave catfish from Central Brazil, with data on ecology and evolutionary considerations (Siluriformes: Heptapteridae). **Copeia**, 315-325, 2004.

TRAJANO, E.; BOCKMANN, F.A. Evolution of ecology and behavior in Brazilian heptapteridae cavefishes, based on cladistic analysis (Teleost: Siluriformes). **Mémoires de Biospéologie**, Tome XXVI.P. 123-129, 1999.

TRAJANO, E.; BICHUETTE, M.E. Diversity of subterranean fishes in Brazil.*In*: GIBERT, J. (ed.). World Subterranean Biodiversity, **Proceedings of an International Symposium** held on 8-10 December 2004, in Villeurbaine P. 161-163, 2005.

TRAJANO, E.; BICHUETTE, M.E. Subterranean fishes of Brazil. p. 331-355. In: **Biology of Subterranean Fishes**, Science Publ., Enfield, 480 pp, 2010.

TRAJANO, E.; BRITSKI, H.A. *Pimelodella kronei* (Ribeiro, 1907) e seu sinônimo *Caecorhandella brasiliensis* (Borodin, 1927): morfologia externa, taxonomia e evolução (Teleostomi, Siluriformes). **Boletim de Zoologia**, São Paulo. 12: 53-89. 1992.

TRAJANO, E.; COBOLLI, M. Evolution of lineages. Em preparação.

VISCONTI, M. A.; CASTRUCCI, A. M. Melanotropin receptors in the cartilaginous fish, *Potamotrygon reticulata* and in the lungfish, *Lepidosiren paradoxa*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 106:523-528, 1993.

VISCONTI, M.A.; GREMPER, R.G. Coloração e Fisiologia da Pigmentação. In *Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce*. (Em edição).

WILKENS, H. Evolution and genetics of epigean and cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). **Journal of Evolution Biology**, 23: 271-376, 1988.

WILKENS, H. Convergent adaptations to cave life in the *Rhamdia laticauda* catfish group (Pimelodidae, Teleostei). **Environment Biology of Fishes**, 62: 251-261, 2001

WILKENS, H. Regressive evolution: ontogeny and genetics of cavefish eye rudimentation. **Biological Journal of the Linnean Society**, 92, 287-296, 2007.

WILKENS, H. Genes, modules and the evolution of cave fish. **Heredity**, 105, 413-422. 2010.

YAMAGUCHI, Y.; BRENNER, M.; HEARING, V.J. The regulation of skin pigmentation. **Journal of Biological Chemistry**, 282: 27557-27561, 2007.