

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

ALINE YOSHIE GOTO

Estudo da produção, composição e drenagem dos meios
oculares de *Carassius auratus* (Cyprinidae) variedades
padrão e *demekin*

São Paulo

2016

ALINE YOSHIE GOTO

Estudo da produção, composição e drenagem dos meios oculares de
Carassius auratus (Cyprinidae) variedades padrão e *demekin*

Versão corrigida

Dissertação apresentada ao Instituto de
Psicologia da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos para obtenção
do grau de Mestre em Ciências.

Área de concentração:

Neurociências e Comportamento

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Christina
Joselevitch

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Goto, Aline Yoshie.

Estudo da produção, composição e drenagem dos meios oculares de *Carassius auratus* (Cyprinidae) variedades padrão e demekin / Aline Yoshie Goto; orientadora Christina Joselevitch. -- São Paulo, 2016.

77 f.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Humor aquoso 2. Corpo vítreo 3. Glaucoma 4. Miopia 5. Modelos animais I. Título.

BF241

Nome: Goto, Aline Yoshie

Título: Estudo da produção, composição e drenagem dos meios oculares de *Carassius auratus* (Cyprinidae) variedades padrão e *demekin*

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 02/12/2016

Banca Examinadora:

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao financiamento concedido para a realização deste trabalho: processo nº 2014/17093-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Agradeço minha orientadora Christina Joselevitch pelos quatro anos em que me orientou na Iniciação Científica e no Mestrado. Sou grata por tudo que aprendi com você e parto desta jornada mais confiante, experiente, consciente e gentil comigo mesma. E nostálgica.

Às professoras Dora Ventura e Daniela Bonci do Laboratório de Psicofisiologia Sensorial, onde realizei meu estudo, pelos conselhos e contribuições generosas e por torcerem pelo meu sucesso.

Ao professor Roberto Tedesco e aos mestres Rodrigo Barbosa e Alex Nasaré, do Departamento de Morfologia e Genética da UNIFESP, pelo treinamento na técnica de inclusão em historresina e ótima companhia durante o trabalho no laboratório.

Às professoras Dânia Emi Hamassaki e Carolina Del Debbio e à técnica Priscilla Sayami Akamine, do Laboratório de Biologia Celular da Retina (ICB-USP), pelo treinamento em extração de humor vítreo de ratos. Sou grata também à Gabriela Lustoza pela amizade e incentivo: a FeSBE deste ano não teria sido a melhor sem você.

Agradeço à professora Vanessa Freitas e à doutoranda Suély Viera, do Laboratório de Biologia da Matriz Extracelular (ICB-USP), pelo treinamento em técnicas bioquímicas para estudar a composição do humor vítreo.

Ao técnico Gaspar de Lima, do setor de Microscopia Eletrônica do ICB-USP e ao técnico do Setor de Microscopia Eletrônica Roberto Cabado pelo excelente trabalho com a microscopia e pela força e incentivo.

Agradeço profundamente a minha “família científica”, amigos que levarei para toda a vida: André Liber, Einat Hauzman, Vitor Corredor, Diego Decleva, Ricardo Tiosso, Guido Bittencourt, Kaê Leopoldo, Livia Lohis, Luise Garcia, Felipe Galante, Luiz Baran, Priscila Souza, Hannes Lemos, Leonardo Henriques, Valéria Duarte, Gabriela Ioshimoto.

Aos meus pais e meu irmão, por serem os meus maiores incentivadores, desde sempre. E por me aguentarem nos diversos momentos em que estava surtando de preocupação. Vocês são o meu porto seguro.

Ao Rafael, por estar sempre por perto, me ajudando a encontrar aquele último sopro de coragem que me fez chegar até aqui.

“As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.”

RESUMO

Goto, A. Y. (2016). Estudo da produção, composição e drenagem dos meios oculares de *Carassius auratus* (Cyprinidae) variedades padrão e *demekin* (Dissertação de Mestrado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O peixe dourado é extensivamente utilizado em pesquisas sobre visão devido a diversos fatores: é um animal pecilotermo, o que possibilita manter sua retina *ex-vivo* viável para manipulação experimental por mais tempo; apresenta uma organização retiniana semelhante à de mamíferos; possui neurônios grandes, facilitando estudos eletrofisiológicos e morfológicos e, diferentemente de mamíferos, é dotado de neurogênese constante de alguns tipos celulares retinianos. A produção, composição e escoamento dos meios oculares nesta espécie, fundamentais para a formação de imagens sobre a retina, são, entretanto, pouco conhecidos. A variedade padrão desta espécie apresenta desenvolvimento ocular normal, enquanto a variedade *demekin* é extremamente míope por possuir crescimento ocular exagerado (bftalmia), condição característica de alguns tipos de glaucoma em mamíferos. O presente trabalho investigou aspectos morfofisiológicos do sistema de produção e drenagem do humor aquoso e a composição do humor vítreo nestas duas variedades de peixe dourado, com o objetivo de melhor compreender as causas subjacentes ao crescimento ocular do *demekin*. Para estudar a drenagem do humor aquoso, foram realizadas injeções de corante na câmara anterior de animais das duas variedades, com processamento histológico posterior em intervalos de tempo pré-determinados (5, 15, 30, 60, 120 minutos e 1, 2, 3 4 e 7 dias, n <= 3 olhos de cada variedade por grupo experimental). Não foram observadas diferenças na drenagem de humor aquoso entre as duas variedades. Em ambas, o humor aquoso é drenado principalmente pela malha trabecular contida na porção ventral do ângulo de drenagem, entre a íris e o ligamento anular. Duas vias secundárias de drenagem foram encontradas nas duas variedades de peixe dourado estudadas: (i) a via irídica e (ii) a drenagem através de vasos epirretinianos. Estas vias são aparentemente mais lentas do que a via trabecular, uma vez que foi encontrado corante nessas regiões até quatro dias após as injeções de corante na câmara anterior. Foi realizado também estudo ultraestrutural da retina e epitélio ciliar em ambas as variedades através de microscopia eletrônica de transmissão.

O epitélio pigmentado da retina do *demekin* apresentou grânulos de melanina mais escassos, e observamos certa desorganização da camada de fotorreceptores, bem como redução da sua densidade. Através de aparato invasivo construído por Joselevitch e Smith (1997), foi mensurada a pressão intraocular (PIO) de 14 olhos de cada variedade. O *demekin* apresentou valores de PIO ligeiramente aumentados em relação ao animal padrão ($3,6 \pm 0,9$ mmH₂O para o *demekin* e $1,9 \pm 0,6$ mmH₂O para o peixe dourado padrão). A composição proteica do corpo vítreo foi estudada através de eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando um *pool* de humor vítreo de 4 animais da variedade padrão e 2 da variedade *demekin*. As proteínas de baixa massa molecular (entre 15 a 25 kDa) estavam expressas em ambas - embora com maior expressão na variedade padrão - e outras, de maior massa molecular, expressas apenas no humor vítreo do *demekin* (50-75 kDa e 150 kDa). Os resultados obtidos sugerem, portanto, que há diferenças importantes na ultraestrutura retiniana, na composição proteica do humor vítreo e na pressão intraocular do *demekin*. Para melhor compreensão do crescimento ocular desta variedade faz-se necessária a realização de um estudo proteômico, identificando quais são as proteínas do humor vítreo evidenciadas através da eletroforese, bem como estudos morfológicos em animais de diferentes tamanhos visando a quantificação dos danos retinianos decorrentes do seu crescimento ocular.

Palavras-chave: Olho. Visão. Humor aquoso. Humor vítreo. Glaucoma. Miopia.

ABSTRACT

Goto, A. Y. (2016). Study of the production, composition and outflow of intraocular media in standard and Black Moor goldfish (*Carassius auratus*). Dissertação de Mestrado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The goldfish is extensively used in vision research due to several factors: it is a poikilothermic animal, which allows *ex-vivo* experiments using its retina for longer periods of time; its retinal organization is very similar to that of mammals; it has large neurons, which facilitates electrophysiological and morphological studies and, unlike mammals, it is endowed with constant neurogenesis of some retinal cell types. However, the production, composition and outflow of ocular media in this species, which are fundamental for image formation onto the retina, are poorly understood. The standard goldfish has normal eye development, while the Black Moor goldfish is extremely myopic due to excessive eye growth (*buphthalmos*), a condition that is present in certain types of mammalian glaucoma. The present study investigated morphophysiological aspects of the aqueous humor production and drainage system and vitreous humor composition in these two varieties of goldfish to better understand the causes underlying the eye growth of the Black Moor. To study the drainage of the aqueous humor, anterior chamber dye injections and histological processing were performed in animals of both varieties after predetermined time intervals (5, 15, 30, 60, 120 minutes and 1, 2, 3, 4, and 7 days, $n \leq 3$ eyes of each variety for each experimental group). No differences were observed in the drainage of aqueous humor between the two varieties. In both, the aqueous humor is drained mainly by the trabecular meshwork contained in the ventral portion of the drainage angle, between the iris and the annular ligament. Two secondary drainage routes were found in the two goldfish varieties studied: (i) the iridic route and (ii) drainage through epiretinal vessels. These pathways are apparently slower than the trabecular route, since the dye was found in these regions 4 days after the injections. An ultrastructural study of the retina and ciliary epithelium was also carried out in both varieties through transmission electron microscopy. The retinal pigment epithelium of the Black Moor presented more scarce melanin granules and we observed some disorganization of the photoreceptor layer, as well as a reduction in its density. Through an invasive device constructed by Joselevitch

and Smith (1997), the intraocular pressure (IOP) of 14 eyes of each variety was measured. The Black Moor presented slightly increased IOP values compared to the standard animal (3.6 ± 0.9 mmH₂O for demekin and 1.9 ± 0.6 mmH₂O for the standard goldfish). The protein composition of the vitreous body was studied by polyacrylamide gel electrophoresis using a vitreous humor pool of 4 animals of the standard variety and 2 of the Black Moor variety. Low molecular weight proteins (15 to 25 kDa) were expressed in both - although with greater expression in the standard variety - and others of higher molecular mass, expressed only in the vitreous humor of the Black Moor (50-75 kDa and 150 kDa). These results suggest, therefore, that there are important differences in the retinal ultrastructure, the protein composition of the vitreous humor and the intraocular pressure of the Black Moor. To better understand the ocular growth in this variety, it is necessary to carry out a proteomic study, identifying which are the vitreous humor proteins evidenced through electrophoresis, as well as morphological studies in animals of different sizes aiming the quantification of the retinal damages caused by its ocular growth.

Keywords: Eye. Vision. Aqueous humor. Vitreous humor. Glaucoma. Myopia.

Sumário

Prólogo	11
1. Introdução	12
1.1. O olho	12
1.2. Meios oculares	14
1.3. O crescimento ocular	16
1.4. O demekin	17
2. Justificativa	20
3. Objetivo	20
4. Material e Métodos	21
4.1. Animais	21
4.2. Tonometria	21
4.3. Morfologia	22
4.4. Ultraestrutura	22
4.5. Dinâmica do humor aquoso	23
4.6. Bioquímica do humor vítreo	25
4.7. Análise dos Resultados	26
5. Resultados	27
5.1. Tonometria	27
5.2. Morfologia das vias de drenagem do humor aquoso	27
5.3. Dinâmica do humor aquoso	41
5.4. Retina	52
5.5. Bioquímica do humor vítreo	57
6. Discussão	58
7. Conclusões	63
Referências	64
Trabalhos resultantes deste estudo	68
Premiação	68
APÊNDICES	69
ANEXOS	75

Prólogo

Esta pesquisa foi continuação de projeto anterior (processo FAPESP 1995/7028-8). Desse modo, serão apresentados também os dados obtidos naquele estudo para compor os resultados e discussão do presente trabalho.

1. Introdução

1.1. O olho

O olho de um peixe dourado padrão é achatado em relação ao humano, sendo seu comprimento axial menor que o diâmetro horizontal. Assim como na grande maioria dos vertebrados, é uma estrutura oca formada por três camadas concêntricas de tecidos (**Figura 1**): a camada mais interna denomina-se *retina* e contém neurônios sensíveis à luz, sendo responsável por iniciar o processo visual; a camada intermediária inclui três estruturas distintas e contínuas, que constituem o chamado trato uveal (**corioide**, **zona ciliar** e **íris**) e a camada mais externa é a **esclera**, composta por fibras colágenas. Na sua parte anterior, este tecido torna-se transparente e dá origem à **córnea** (Walls, 1942).

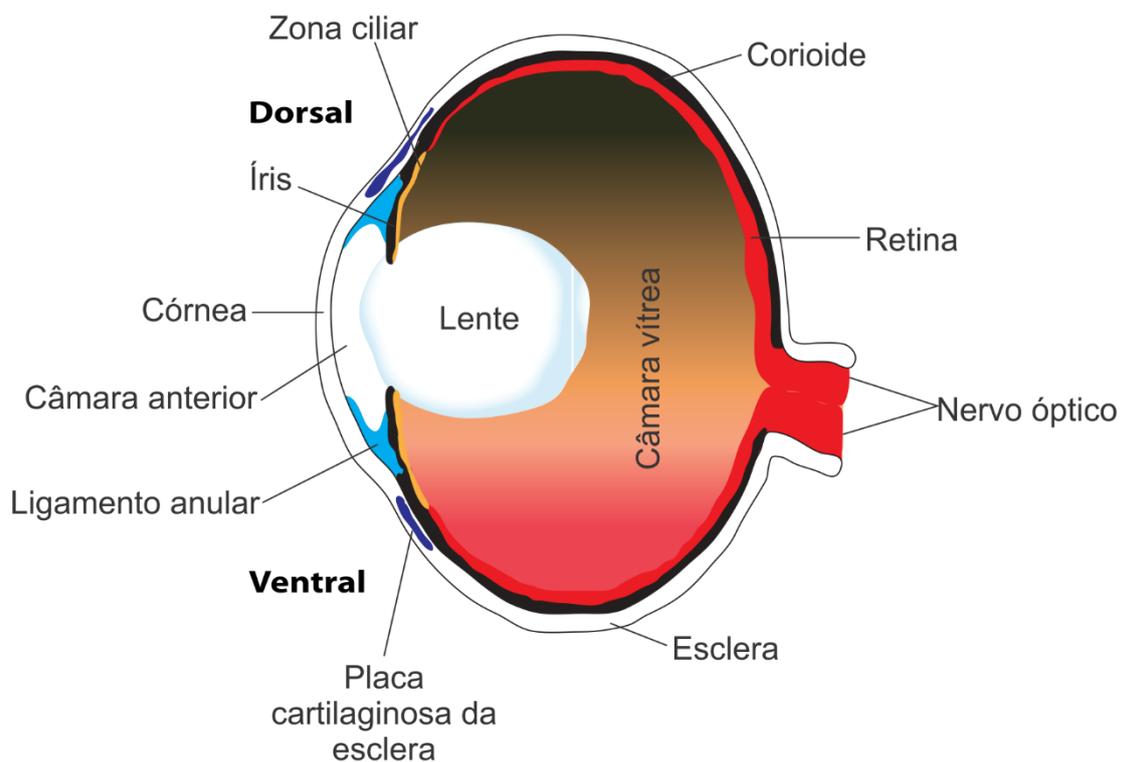


Figura 1. Desenho esquemático do olho de um peixe dourado e suas principais estruturas em seção vertical. Nota-se a ausência de uma fóvea, lente esférica e a presença do ligamento anular preenchendo a região do ângulo de drenagem na câmara anterior.

Nos vertebrados terrestres, a córnea é o meio de maior poder dióptrico, por possuir índice de refração distinto do ar. Em peixes, entretanto, ela não contribui para o poder dióptrico do olho, pois os índices refrativos da água, córnea e humor vítreo são

praticamente idênticos (Winkler et al., 2015). Assim, a refração da luz ambiente depende inteiramente da lente nestas espécies. A **lente** em peixes tem a forma esférica e não sofre deformação durante a acomodação, que geralmente é atingida pelo afastamento ou aproximação da lente em relação à retina pelo músculo *retractor lentis* (Walls, 1963). Em seres humanos a lente é biconvexa e flexível, tendo sua forma alterada pela musculatura ciliar durante o processo de acomodação (Glasser & Campbell, 1998).

A musculatura e os processos ciliares estão ausentes em peixes. A maioria dos teleósteos não apresenta mudanças no diâmetro pupilar em resposta à luz, como ocorre em mamíferos; esse ajuste é alcançado através de movimentos retinomotores, mais acentuados nestas espécies do que no homem (Burnside & Nagle, 1983).

Assim como a retina de mamíferos, a retina de peixes teleósteos também apresenta basicamente três camadas nucleares - camada nuclear externa, camada nuclear interna e camada de células ganglionares - e duas camadas plexiformes - externa e interna (Stenkamp, 2007). Enquanto peixes abissais apresentam fóvea (Warrant & Locket, 2004), a maioria dos teleósteos não dispõe deste tipo de especialização.

Preenchendo circunferencialmente a região do ângulo de drenagem encontra-se o **ligamento anular**, estrutura exclusiva de olhos de peixes. Até o momento, não há um consenso sobre sua composição e função. Um estudo de 1996 envolvendo o peixe australiano de água doce *Lepidogalaxias salamandroides* (“peixe salamandra”) encontrou no interior das células do ligamento anular um grande número de grânulos de glicogênio, sugerindo que esta estrutura constitui um tecido metabolicamente ativo, fornecendo energia para a córnea ou à malha trabecular (Collin & Collin, 1996). Anos depois, Asli, Mansoori e Sattari estudaram o ligamento anular do peixe marinho “fox face” (*Siganus sp.*), e descreveram uma estrutura constituída de fibras irregulares de tecido conjuntivo denso na qual encontram-se células vacuoladas contendo glicogênio, o que levou-os a concordar com Collin e Collin (1996) de que o ligamento anular provavelmente desempenhe um papel metabólico (Asli, Mansoori, & Sattari, 2012). Também foi realizado estudo do ligamento anular no “paulistinha” (*Danio rerio*), espécie com maior proximidade filogenética ao peixe dourado – ambos da família Cyprinidae – por Soules e Link (2005). No peixe paulistinha o ligamento anular tem aparência porosa, com células de núcleos pequenos e de formato irregular. Ultraestruturalmente, suas células contêm grande quantidade de grânulos não aderidos à membrana do que parece ser glicoproteína. Quanto à função do ligamento anular, os

autores acreditam que não seja uma estrutura análoga à malha trabecular de mamíferos, apesar de ambas ocuparem a região do ângulo de drenagem.

1.2. Meios oculares

O humor vítreo, também denominado corpo vítreo, é uma matriz extracelular que preenche a câmara vítrea e compreende aproximadamente 80% do volume ocular de um ser humano adulto. Cerca de 98% de seu conteúdo é água; seus demais componentes incluem macromoléculas estruturais como proteoglicanas, colágenos dos tipos II, V/VI e IX e proteínas não colágenas, como por exemplo o ácido hialurônico, a glicosaminoglicana mais abundante no vítreo de mamíferos, que preenche os espaços entre as fibras de colágeno (Bishop, 2000). O **Quadro 1 (Apêndice A)** apresenta um resumo da composição do vítreo em diversas espécies.

Dentre as funções fisiológicas do vítreo, podemos destacar: (i) a nutrição da lente, provendo um conduto para suas necessidades metabólicas (Fatt, 1977); (ii) a exclusão de células e macromoléculas, mantendo a sua transparência (Fatt, 1977), participação no crescimento ocular (Coulombre, 1956), proteção ao globo ocular em traumas mecânicos (Foulds, 1987) e inibição de angiogênese (Jacobson, Dorfman, Basu, & Hasany, 1985). O vítreo apresenta-se em sua maior parte acelular, com exceção do vítreo basal, que abriga uma pequena população de células denominadas hialócitos. Estas possuem de 10 a 15 μm de diâmetro e são provavelmente da mesma linhagem celular que os monócitos/macrófagos (Grabner, Boltz, & Forster, 1980; Lazarus & Hageman, 1994). Perturbações na estrutura do vítreo, sejam elas resultantes de processos de envelhecimento ou traumas mecânicos, podem resultar em diversas condições que causam cegueira. Por esse motivo é importante entender e estudar sua organização molecular.

O outro meio encontrado no interior do olho é o humor aquoso, líquido que circula pelas câmaras posterior e anterior, nutrindo a córnea e a lente, estruturas que não possuem vasos sanguíneos e são transparentes para permitir a passagem de luz (Levin et al., 2011). O fluxo constante e a taxa de produção e drenagem do humor aquoso também são responsáveis por manter a pressão intraocular (PIO) normal, que varia de 10,65 a 20,63 mmHg em seres humanos, com média de 15,64 mmHg (Bankes, Perkins, Tsoulakis, & Wright, 1968).

Em mamíferos, o humor aquoso flui da câmara posterior para a câmara anterior através da pupila, e é drenado do olho por duas rotas principais (**Figura 2**): (i) **Rota trabecular ou convencional (Figura 2 A)**, responsável por 90% da drenagem: o aquoso flui pela malha trabecular e desemboca no canal de Schlemm, onde é drenado pelas veias episclerais, e (ii) Rota uveoescleral (**Figura 2 B**), que corresponde aos 10% restantes da drenagem e ocorre através de vasos coroidais presentes na própria zona ciliar, corioide e esclera. Há também o escoamento por uma via de menor importância (iii), através da íris (**Figura 2 C**).

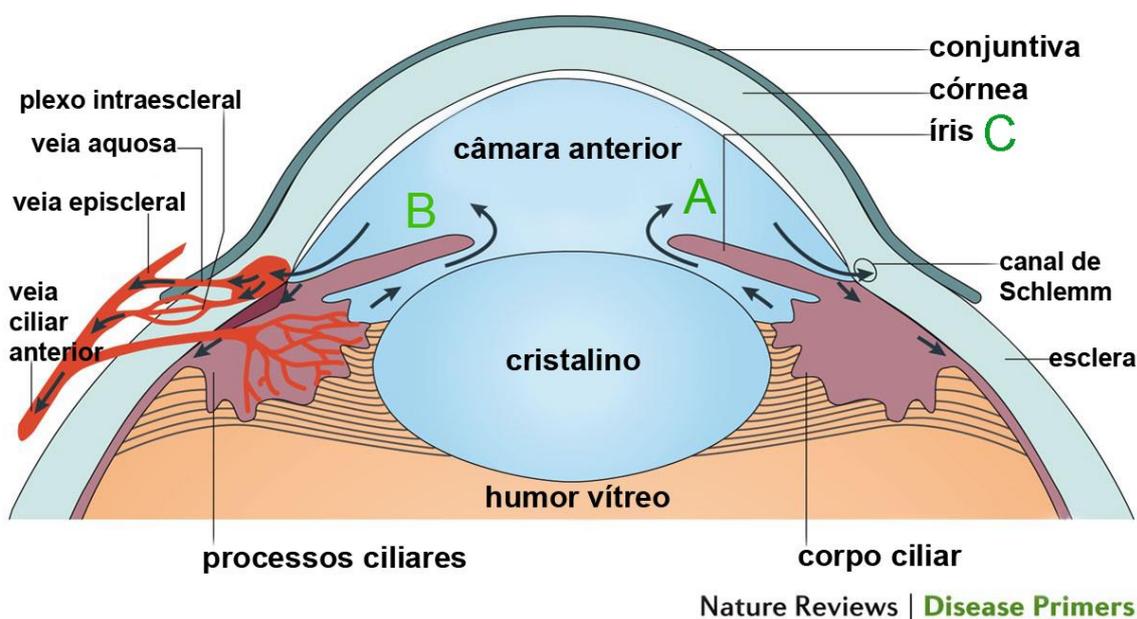


Figura 2. Desenho esquemático da região do ângulo de drenagem de um olho humano ilustrando as rotas de drenagem do humor aquoso. (A) Rota trabecular, (B) rota uveoescleral e (C) rota irídica. **Fonte:** Reproduzido e adaptado com permissão de Macmillan Publishers Ltd: *Nature Reviews Disease Primers*, Weinreb, R. N. *et al.*, copyright 2016 (Weinreb *et al.*, 2016).

Diferentemente do humor vítreo, o humor aquoso é pobre em proteínas e glicosaminoglicanas (Von & Moore, 1948). Seus principais componentes são íons e antioxidantes, como a glutatona e o ácido ascórbico, tendo seu pH tamponado principalmente por íons bicarbonato. A composição do humor aquoso em diversas espécies de vertebrados é apresentada no **Quadro 2 (Apêndice B)**.

1.3. O crescimento ocular

Os olhos, assim como qualquer outro órgão, têm seu crescimento regulado por mecanismos de controle homeostáticos. Entretanto, diferentemente dos demais órgãos, os olhos dependem de estímulos visuais para guiar o seu crescimento. Ao nascimento, os olhos de filhotes de aves, primatas, seres humanos e outras espécies ainda não atingiram seu tamanho definitivo; é através da exposição a estímulos visuais que os olhos passarão por um processo de crescimento que os levará a emetropia – estado em que há propriedades ótimas de refração da imagem sobre a retina (Wallman & Winawer, 2004). O comprimento axial do olho humano, por exemplo, aumenta de 17 mm ao nascer a 23 mm aos 13 anos de idade, mantendo praticamente a mesma dimensão na idade adulta (Larsen, 1971).

Desse modo, os diversos estímulos projetados na retina iniciam uma cascata de sinalização, que ultrapassa o epitélio pigmentado e a corioide e regula o crescimento ocular através do remodelamento ativo da esclera, o tecido conjuntivo que forma a camada externa do globo ocular. Desequilíbrios nessa via podem levar a erros de refração como a miopia e a hipermetropia (Wojciechowski & Hysi, 2013).

Os peixes, por apresentarem crescimento contínuo durante toda a vida, constituem modelos interessantes para o estudo dos mecanismos reguladores do crescimento ocular. Kroger e Fernald (1994) demonstraram em estudos realizados com o ciclídeo africano *Haplochromis burtoni* que, assim como em mamíferos, o crescimento ocular é guiado pela experiência visual do indivíduo. Neste estudo, os peixes foram mantidos sob seis condições luminosas diferentes: (i) luz branca de amplo espectro, (ii) escuro total, (iii) iluminação escotópica e (iv) três comprimentos de onda monocromáticos: verde (523 nm), azul (455 nm) e amarelo (562 nm). Peixes criados na escuridão total apresentaram maior variabilidade no diâmetro naso-temporal e no comprimento axial do olho. Os animais criados no escuro total e sob iluminação escotópica apresentaram olhos de dimensões significativamente maiores se comparados aos expostos à luz branca, indicando uma tendência à miopia induzida pela falta ou escassez de estímulos visuais. Em contrapartida, os animais criados sob as luzes monocromáticas não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle. Uma possível explicação para estes resultados é a participação de todos os tipos de cone na regulação do crescimento ocular, sendo que a sinalização de apenas um tipo já é suficiente para que o olho apresente crescimento normal (Kroger & Fernald, 1994).

1.4. O *demekin*

O peixe dourado (**Figura 3**) é um ótimo modelo para o estudo da visão em vertebrados em geral, incluindo mamíferos, pois seu globo ocular é de fácil manipulação, com neurogênese constante e seus neurônios são maiores e mais acessíveis para registro eletrofisiológico (Easter, Johns, & Braumann, 1977). Essas características fizeram desta espécie uma das mais empregadas para pesquisa básica em neurociências. Entretanto, há diferenças importantes entre o sistema visual de peixes e mamíferos. É, portanto, necessário estudar e entender estas diferenças para saber em que casos a espécie em questão pode ou não ser usada como modelo. Por exemplo, há uma variedade de peixe dourado, o *demekin* ou *Black Moor* (**Figura 3**), que apresenta olhos extremamente protrudentes com aumento da pressão intraocular (Raymond, Hitchcock, & Palopoli, 1988; Yew et al., 1991; Joselevitch & Smith, 1997).



Figura 3. Variedades de peixe dourado estudadas. Esquerda: Peixe dourado variedade padrão, de coloração alaranjada e olhos proporcionais ao corpo. **Direita:** Peixe dourado variedade *demekin*, com olhos exageradamente desenvolvidos.

Os olhos do *demekin* são dotados de características peculiares, pois apesar de seu grande volume (**Figura 4**), com distância retina-lente até seis vezes maior do que no peixe dourado padrão (Raymond et al., 1988; Seltner, Weerheim, & Sivak, 1989), o tamanho das lentes não é alterado. O aumento exagerado da câmara vítrea nesta variedade também levou autores a classificar o olho do *demekin* como extremamente miópico (Easter & Hitchcock, 1986; Raymond et al., 1988; Seltner et al., 1989).

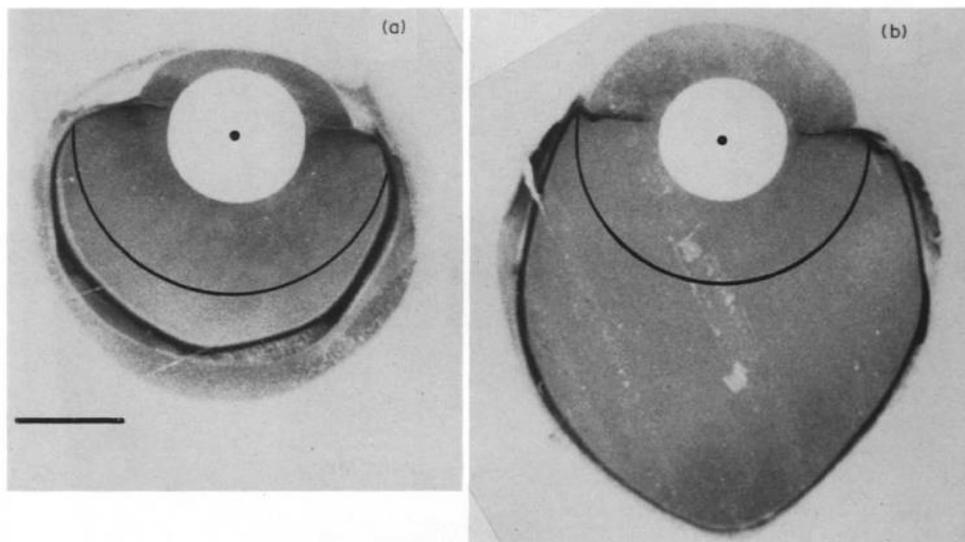


Figura 4. Fotografias mostrando secções transversais do olho esquerdo (a) e direito (b) de um mesmo peixe da variedade *demekin*. O ponto negro indica o centro da lente e a linha sólida desenhada na câmara vítrea corresponde à *distância focal*, região na qual a imagem estaria em foco. Como os olhos do *demekin* apresentam desenvolvimento exagerado e a lente não acompanha esse crescimento, a imagem não é formada sobre a retina, caracterizando olhos extremamente míopes. A assimetria entre os olhos do *demekin* é bastante comum. Barra de escala = 2 mm. **Fonte:** Reproduzido de *Vision Research*, Vol. 26/11, Easter, S. S. & Hitchcock, P. F., *The Myopic Eye of the Black Moor Goldfish*, p. 1831-1833, *Copyright (1986)*, com permissão de Elsevier.

O crescimento exagerado dos olhos do *demekin* inicia-se na fase de alevinagem, completando-se entre dois a seis meses de idade (Reddy & Lam, 1992). Geralmente, os olhos de um mesmo animal apresentam assimetria na fase adulta, e pode ocorrer crescimento abrupto nos globos oculares após a transformação inicial (Easter & Hitchcock, 1986; Raymond et al., 1988). Devido ao aumento descomunal dos olhos do *demekin*, a retina acaba sendo afetada (**Figura 5**), tendo suas camadas diminuídas em espessura, com desorganização de suas estruturas e o aparecimento de elementos estranhos ao tecido retiniano (Raymond et al., 1988; Yew et al., 1991).

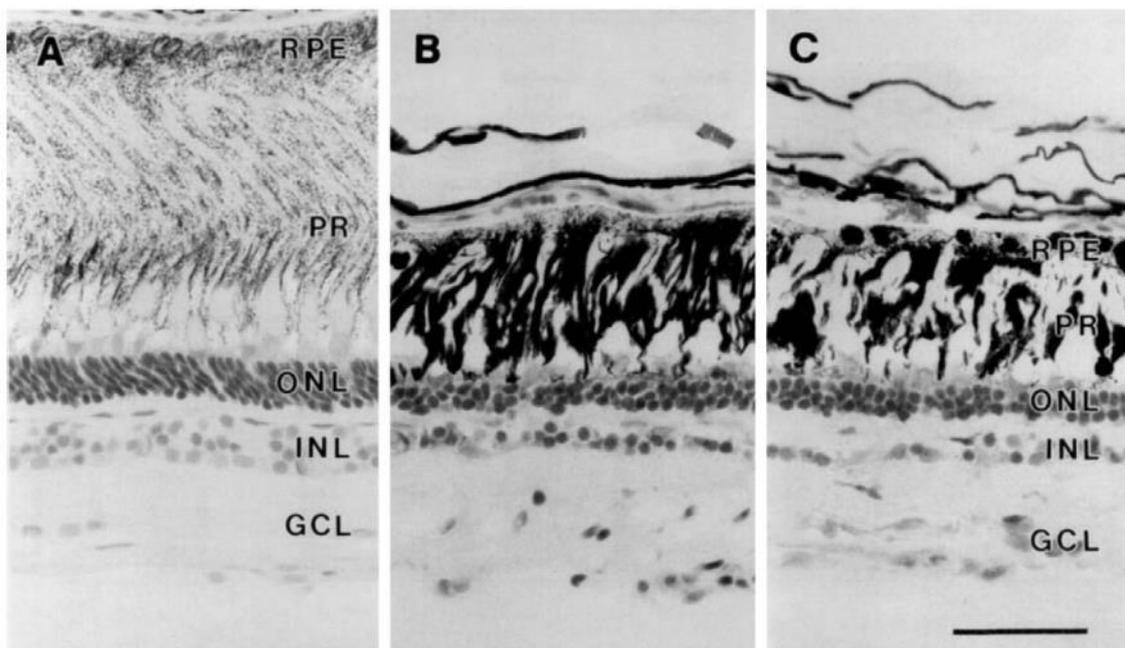


Figura 5. A retina central do peixe dourado nas duas variedades. (A) Retina de peixe dourado variedade padrão. **(B) e (C)** Retinas de um mesmo *demekin* (olho maior e olho menor, respectivamente). Observa-se no peixe padrão que os núcleos de bastonetes formam linhas de cerca de 4 núcleos de espessura, ao passo que no *demekin*, as linhas têm apenas 2 núcleos de espessura. A INL também se apresenta mais fina na retina do *demekin*; o epitélio pigmentado, por sua vez, tem aparência muito mais densa no *demekin* do que na variedade padrão. *RPE*: epitélio pigmentado retiniano; *PR*, segmentos externos de fotorreceptores; *ONL*: camada nuclear externa; *INL*: camada nuclear interna; *GCL*: camada de células ganglionares. Escala = 50 μ m. **Fonte:** Reproduzido de Journal of Comparative Neurology, Vol. 276, Raymond, P. A. et al., Neuronal Cell Proliferation and Ocular Enlargement in Black Moor Goldfish, p. 231-238, Copyright (1988), com permissão de John Wiley and Sons.

Esta variedade de peixe dourado poderia ser um modelo experimental interessante para glaucoma, caso o seu crescimento ocular seja em função de pressão intraocular elevada, ou para miopia extrema, visto que o animal é míope. Para tal, entretanto, faz-se necessário primeiramente caracterizar o sistema de produção e drenagem do humor aquoso nesta espécie, bem como a composição do humor vítreo, para num segundo momento comparar estes dados com os obtidos por outros autores em relação ao *demekin* e a espécies mamíferas.

2. Justificativa

O peixe dourado é uma das espécies mais utilizadas em ciência básica para o estudo da retina. Pouco se sabe, entretanto, a respeito das suas demais estruturas oculares, fundamentais para o processamento visual. O estudo de tais estruturas visa fornecer maior compreensão a respeito da visão nesta espécie e em outras espécies de teleósteos, e pode fornecer informações importantes a respeito do sistema de produção e drenagem de meios intraoculares em mamíferos. Poderemos também compreender melhor as prováveis causas do exagerado crescimento dos olhos do *demekin*, candidato promissor a modelo experimental natural para glaucoma.

3. Objetivo

A finalidade do presente trabalho foi estudar comparativamente olhos de *Carassius auratus* das variedades padrão e *demekin*, verificando possíveis diferenças em relação à morfologia das estruturas oculares, composição bioquímica do humor vítreo, histologia retiniana e drenagem do humor aquoso que poderiam explicar o crescimento ocular anormal no *demekin*.

4. Material e Métodos

4.1. Animais

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (CEPA-IPUSP, protocolos 011.2010, 003.2014 e 4926170916, *Anexos*). Os animais utilizados neste estudo foram tratados de acordo com as Normas para o Uso de Animais em Pesquisa em Visão e Oftalmologia da Associação para Pesquisa em Visão e Oftalmologia (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*, ARVO, EUA).

Carassius auratus variedades padrão e *demekin* de diversos tamanhos foram adquiridos de um fornecedor local e mantidos no biotério do Departamento de Psicologia Experimental do IPUSP em dois aquários de 270 L de capacidade 28 °C (ciclo claro/escuro de 12 horas), equipados com sistema de filtração biológica interno e mecânico-química externo (TYP 2217, EHEIM, Alemanha). Foi fornecida alimentação adequada (ração) uma vez ao dia, e o controle da qualidade da água e limpeza dos aquários foi realizado quando necessário.

Para a realização de todos os experimentos *in vivo*, os animais foram anestesiados com benzocaína - anestésico eficiente e bastante utilizado para o manejo de peixes (Bittencourt et al., 2012) - dissolvida em acetona na concentração de 75 ppm (75 mg/L).

4.2. Tonometria

A tonometria foi realizada com um aparelho baseado no deslocamento de colunas de água (**Figura 6**) em 14 olhos de cada variedade. Este aparelho era composto de uma régua comum com graduação dupla acoplada a uma base de madeira de forma a ficar perpendicularmente posicionada em relação ao solo. A esta régua foram adaptados tubos de duas sondas endovenosas do tipo *butterfly* nº 21, preenchidos por uma solução de tinta nanquim vermelha e solução fisiológica, para facilitar a visualização da coluna.

Primeiramente, foi estabelecido o “zero” do aparelho – a posição inicial da coluna d’água, mantida estável pela obstrução da extremidade posterior dos *butterflies*. Em seguida, as agulhas de cada sonda foram cuidadosamente introduzidas na câmara anterior de um *demekin* e um peixe padrão sob lupa cirúrgica (D. F. Vasconcellos), com os animais fora da água. Após a desobstrução da outra extremidade dos tubos,

aguardamos a estabilização da coluna d'água em sua nova posição. A diferença entre os deslocamentos em mmH₂O nas duas variedades foi aferida em ambos os olhos, e os peixes retornaram ao aquário.

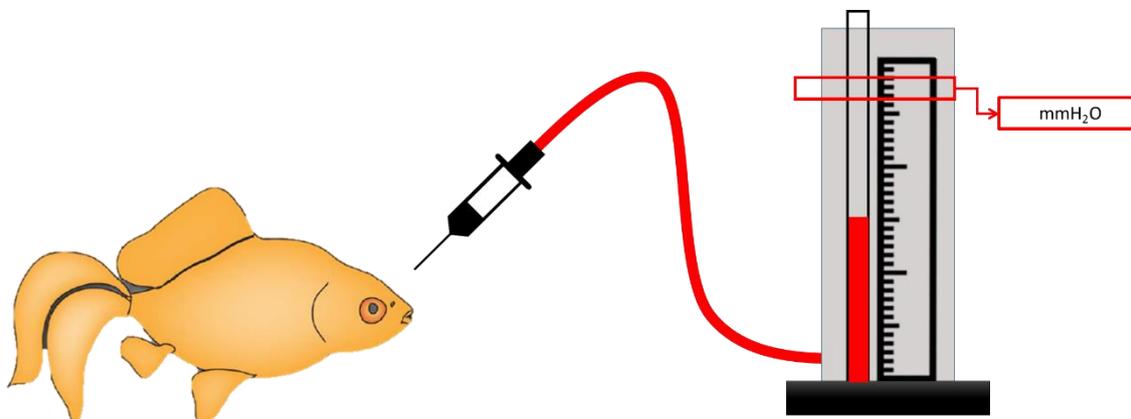


Figura 6. Equipamento utilizado neste estudo para aferir a pressão intraocular nas duas variedades de peixe dourado. Este aparelho era composto de uma régua comum com graduação dupla acoplada a uma base de madeira de forma a ficar perpendicularmente posicionada em relação ao solo. A esta régua foram adaptados tubos de sondas endovenosas do tipo *butterfly* nº 21, preenchidos por uma solução de tinta nanquim vermelha e solução fisiológica, para facilitar a visualização da coluna. As imagens não estão em escala.

4.3. Morfologia

Após eutanásia por decapitação e espinhalamento, os olhos foram enucleados e imersos em fixador (paraformaldeído 4% em tampão fosfato-salina, PBS) por 24 horas, após a realização de cortes circulares na esclera para facilitar a penetração do fixador. A seguir, o material passou por sequência de álcoois nas concentrações 10%, 20% 30% por 15 minutos cada, e nas concentrações 40%, 50%, 60% 70%, 80%, 90% e 100% por 10 minutos cada, com três passagens por álcool 100% para desidratação e inclusão em historresina (Technovit 7100, Kulzer, Alemanha). Cortes de 2 µm dos globos oculares foram realizados com micrótomo (Spencer 820, American Optical Company, EUA) e as lâminas assim obtidas foram secas em estufa a 37°C e coradas com solução de azul de toluidina a 1% com borato de sódio 1% ou hematoxilina-eosina.

4.4. Ultraestrutura

Os experimentos para observação da ultraestrutura do ângulo de drenagem foram realizados no ICB-USP, com auxílio do técnico Gaspar Ferreira de Lima (Setor de Microscopia Eletrônica). Os olhos enucleados foram mergulhados em solução fixadora

composta de glutaraldeído 2% em tampão cacodilato de sódio por 2 horas a 4°C. Fragmentos da câmara anterior e retina foram lavados em tampão cacodilato de sódio, refixados em OsO₄ 1%, e lavados e desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 95% e 100%). A inclusão em resina Spurr (EMS, EUA) foi realizada após passagem em óxido de propileno puro. Secções semifinas (0,5 µm) e ultrafinas (80-90 nm) foram obtidas em ultramicrotomo (EMUC6, Leica Microsystems GmbH, Alemanha) e dispostas sobre telas de cobre (3 mm, 200 mesh/regular, EMS, EUA). Para realce da eletrondensidade, as telas foram expostas a soluções de citrato de sódio a 11% e nitrato de chumbo a 14% em NaOH 0,1 M e acetato de uranila 0,5% em sacarose 10,5% para exame em microscópio eletrônico de transmissão (JEM 1010, Jeol, EUA) e digitalização de imagens. Fotomicrografias de 1024 x 1024 pixels foram realizadas com resolução de 173 ppi.

4.5. Dinâmica do humor aquoso

Para estudo da dinâmica dos fluidos intraoculares, injeções de solução aquosa 50-75% de tinta nanquim preta ou amarela (corante à base de carvão em suspensão aquosa) na câmara anterior foram realizadas com seringa de insulina pela região temporal da córnea em animais anestesiados. De 1 a 3 olhos foram utilizados em cada grupo experimental: 5, 15, 30, 60, 120 minutos e 1, 2, 3, 4 e 7 dias. O corante preto foi inicialmente utilizado, porém por ser de difícil visualização no olho do *demekin* - devido a pigmentação escura em seus olhos - passou-se a utilizar o nanquim amarelo para obter maior contraste (**Figura 7**).

O escoamento do corante foi monitorado fotograficamente com auxílio de estereomicroscópio (SMZ-745T, Nikon, Japão) acoplado a câmara digital (AxioCam Carl Zeiss, Alemanha) e microcomputador. O controle da câmera e aquisição de imagens foram realizados por meio do *software* AxioVision (Carl Zeiss, Alemanha). Após tempos pré-determinados, os animais sofreram eutanásia e enucleação, e os olhos foram processados para histologia como descrito em 4.3. *Morfologia*. Pelo menos três olhos foram utilizados para cada um dos tempos escolhidos¹.

¹ Apresentaremos também dados obtidos em animais injetados com corante após 1, 2, 3, 4 e 7 dias, nas duas variedades.

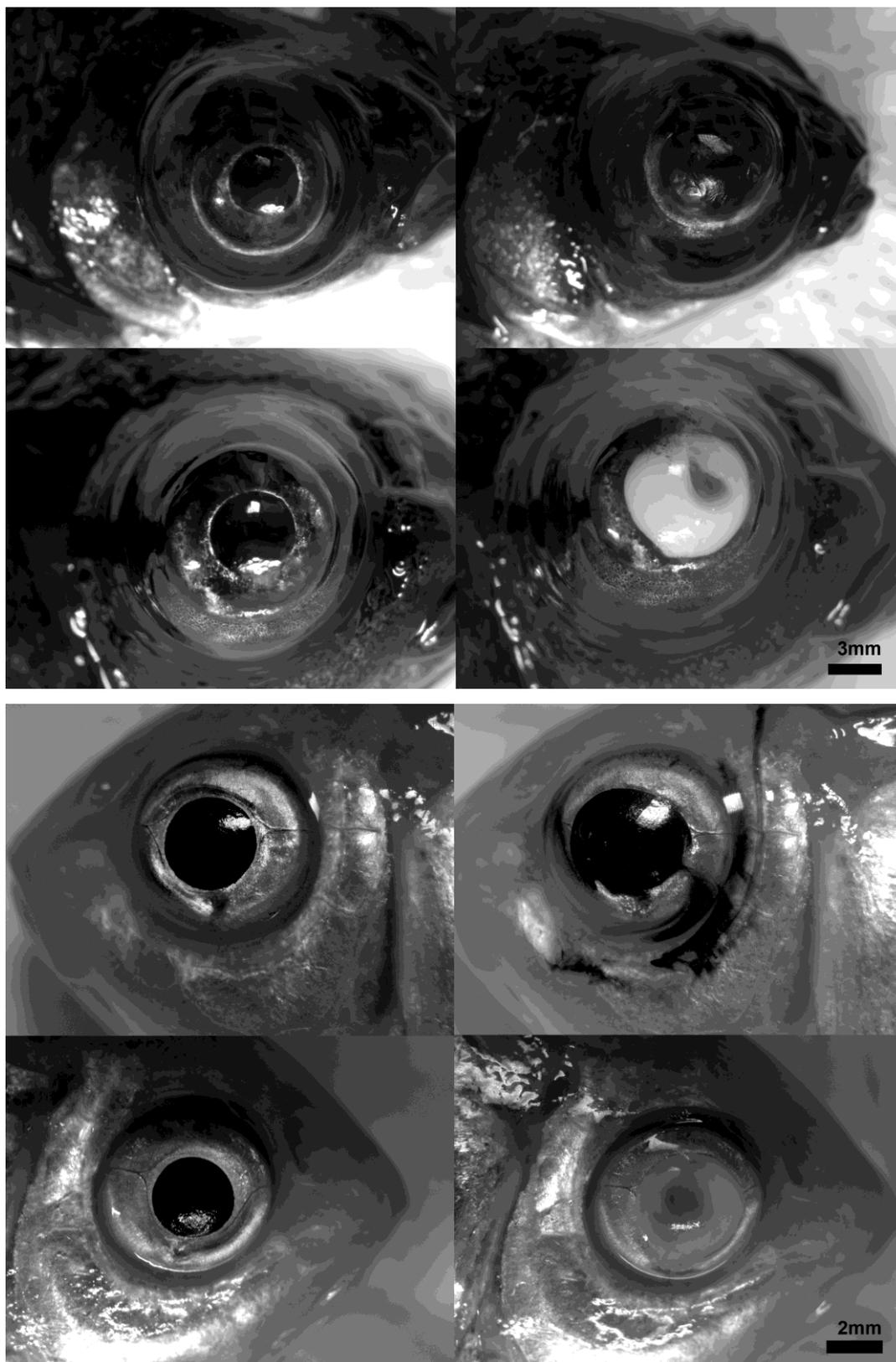


Figura 7. Fotografias obtidas durante o experimento para estudo da dinâmica do humor aquoso com auxílio de câmera digital acoplada a um estereomicroscópio. Nos painéis à esquerda, animal antes de receber a injeção de corante; à direita evidencia-se a diferença ao utilizar o corante preto e o amarelo, com melhor visibilidade ao injetar o corante amarelo. Painéis superiores – *demekin*. Painéis inferiores – peixe padrão.

4.6. Bioquímica do humor vítreo

Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia da Matriz Extracelular, sob orientação da Profa. Dra. Vanessa Freitas (Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, ICB-USP) e da aluna de doutorado Suély Vieira. Amostras de corpo vítreo de 4 animais da variedade padrão e 2 da variedade *demekin* foram coletadas da seguinte maneira:

- Peixe padrão – o olho foi enucleado e posicionado sobre uma placa de Petri virada forrada com papel toalha, de modo a ficar com a região posterior voltada para cima. Com uma micro tesoura, foi realizado o corte da esclera ao redor do nervo óptico, retirando-o. Amostras de humor vítreo foram coletadas utilizando-se uma pinça de ponta fina e um pincel e adicionadas a um microtubo. Por se tratar de um material de coleta mais difícil e por apresentar menor volume de humor vítreo por olho, utilizamos os olhos de 4 animais.
- *Demekin* – sobre uma placa de Petri virada e coberta com papel toalha o olho foi posicionado lateralmente, com a região posterior voltada para a direita e a anterior para a esquerda. Como o humor vítreo desta variedade é líquido, optou-se por coletá-lo com o auxílio de uma seringa e uma agulha 30 G. O olho foi perfurado com a ponta da agulha através da esclera, em direção ao centro do olho e foi feita a coleta do material tomando-se o cuidado de não aspirar o conteúdo até que o olho colapsasse, com o objetivo de evitar a coleta de humor aquoso concomitantemente, contaminando a amostra. O conteúdo aspirado foi acondicionado em um microtubo.

Logo após a coleta, as amostras foram acrescidas de coquetel de inibidores de protease (Sigma, EUA) e armazenadas em freezer -80 °C até o momento de uso. As amostras tiveram suas proteínas quantificadas pelo método de Bradford (Quick Start Bradford Protein Assay, Bio-Rad, EUA) e foram analisadas através de espectrofotometria (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, EUA). Posteriormente, as amostras foram diluídas em solução tampão corante contendo tris-HCl 1M, pH 6,8 + SDS 10% + glicerol + azul de bromofenol 0,5% + 2-mercaptoetanol e fervidas a 95 °C durante 5 minutos para desnaturação das proteínas. Após homogeneização do material, foi realizada semeadura de 30 µg com o auxílio de micropipeta em placa de vidro com gel de gradiente de poliacrilamida 4% a 15% (Mini-

Protean, Bio-Rad, CA, EUA) em triplicatas. Um padrão de peso molecular conhecido foi co-semeado para fins de identificação (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards #1610375, Bio Rad, EUA). Dois experimentos foram realizados em dias diferentes, utilizando as mesmas amostras, para confirmação dos resultados. Os géis foram corados com *coomassie blue* e fotografados com auxílio de *scanner* (HP Deskjet 2540 All in One Printer, HP, EUA) para verificação do padrão de bandas. Para fins de comparação, foi também semeada amostra de vítreo obtida de 4 ratos (*Rattus norvegicus*) no Laboratório de Biologia Celular da Retina, sob orientação da Profa. Dra. Dânia Emi Hamassaki (Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, ICB-USP) e da técnica Sayami Akamine.

4.7. Análise dos Resultados

Os valores médios de PIO obtidos a partir da tonometria invasiva foram analisados e comparados através do teste T-Student bicaudal.

O caminho percorrido pelo corante injetado intraocularmente e sua via de drenagem nesta espécie foi avaliado qualitativamente através da observação e comparação de fotomicrografias de campo claro obtidas com material dos diferentes grupos experimentais. Dados a respeito da região trabecular obtidos com microscopia eletrônica na região foram avaliados qualitativamente em fotomicrografias e comparados aos de mamíferos (dados de literatura). Para análise da composição dos meios oculares, as bandas obtidas foram comparadas qualitativamente às de mamíferos obtidas em publicações da área.

5. Resultados

5.1. Tonometria

Através da tonometria invasiva obtivemos valor médio de pressão intraocular para o peixe padrão de $1,9 \pm 0,6$ mmH₂O ($n = 14$ olhos) e para o *demekin*, $3,6 \pm 0,9$ mmH₂O ($n = 14$ olhos), visualizados na **Figura 8**. Com esta técnica de mensuração, os valores obtidos para o *demekin* foram significativamente maiores ($P = 7,43 \cdot 10^{-6}$, Teste T de Student bicaudal).

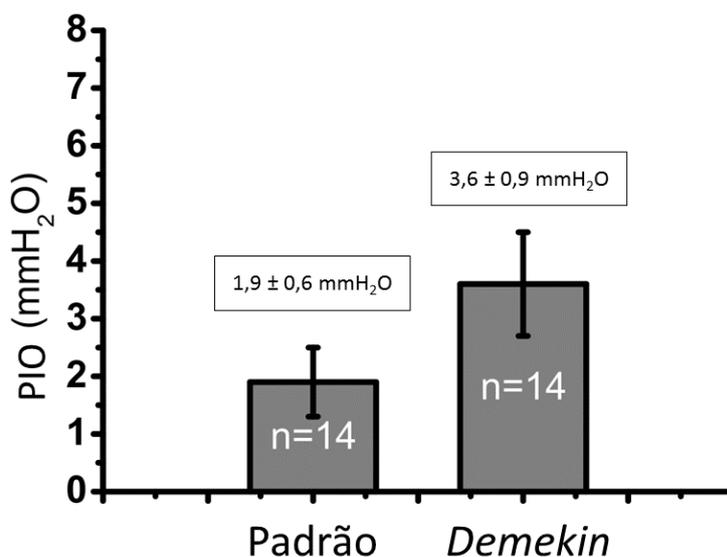


Figura 8. Valores de pressão intraocular (PIO) obtidos através da tonometria invasiva (mmH₂O). O n corresponde ao número de olhos testados. O método invasivo apresentou maior sensibilidade, registrando diferença estatisticamente significativa ($P=7,43 \cdot 10^{-6}$, Teste T de Student bicaudal) entre a variedade padrão e *demekin*.

5.2. Morfologia das vias de drenagem do humor aquoso

Inicialmente, estudamos a morfologia da região do ângulo de drenagem do olho do peixe dourado padrão (**Figura 9**) e *demekin* (**Figura 10**). Notam-se na região as seguintes estruturas: (i) íris, faixa circular de tecido composta por dois tipos de células (**Figura 9 e 10, A**); (ii) malha trabecular, imediatamente adjacente à íris e estendendo-se da câmara anterior à córnea (**Figura 9 e 10, B**); (iii) ligamento anular (**Figura 9 e 10, C**), estrutura triangular e loculada que preenche a maior parte do ângulo iridocorneano, circunferencialmente (por isso o nome “anular”). Está presente em diversas espécies de peixes, porém sua morfologia e composição são altamente variáveis dependendo da

espécie; (iv) córnea, caracterizada por células achatadas, cuja matriz extracelular contém fibras colágenas organizadas em feixes paralelos (**Figura 9 e 10, D**); (v) junção córneo-escleral, com minúsculos canalículos de escoamento (**Figura 9 e 10, E**) e (vi) zona ciliar, localizado na região posterior da íris e composto por uma camada externa de células pigmentadas e uma camada interna de células não pigmentadas (**Figura 9 e 10, F**). Estas estruturas são mostradas em maiores detalhes na **Figura 11**.

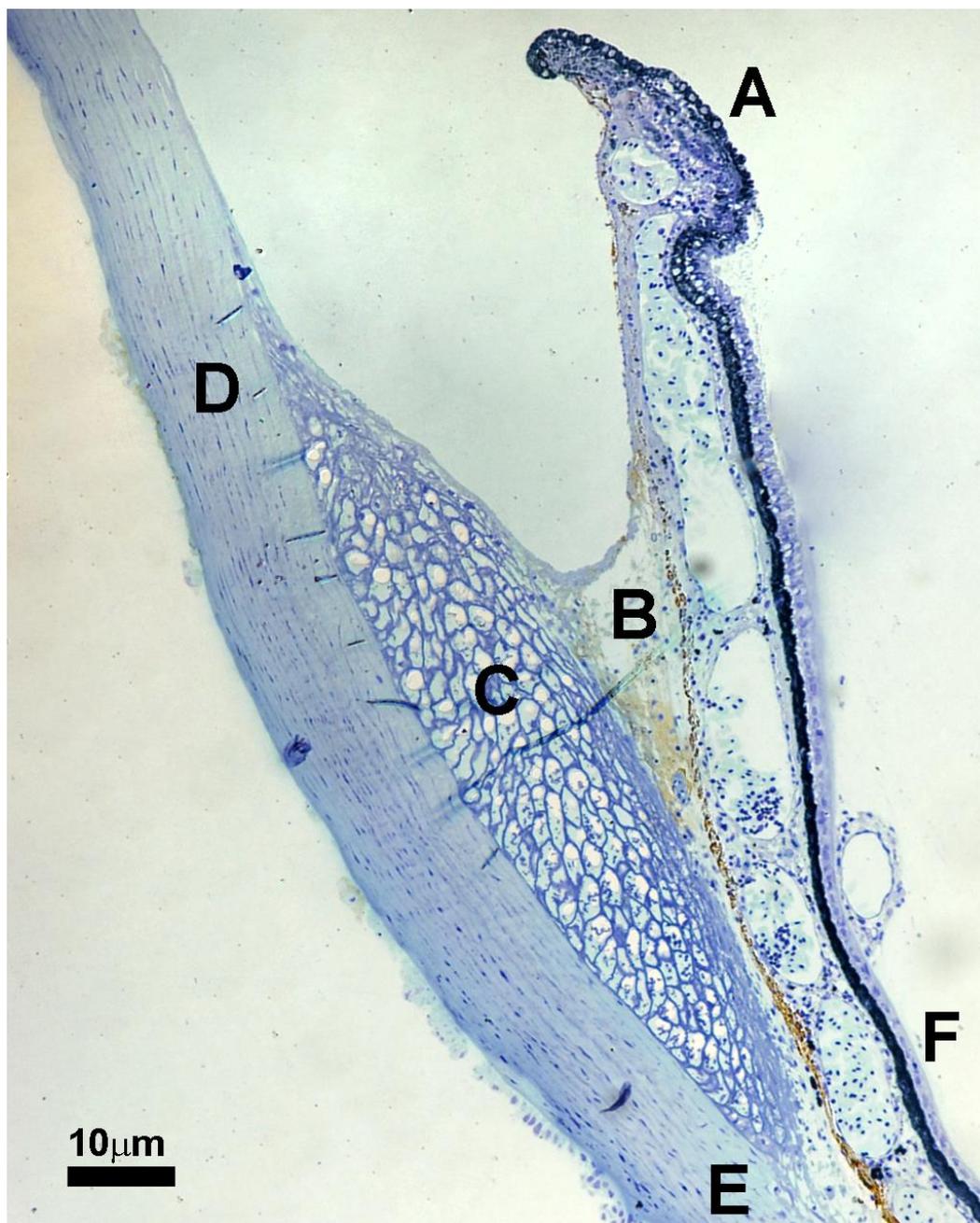


Figura 9. O ângulo de drenagem do peixe dourado padrão, porção ventral. Fotomicrografia de campo claro de seção semifina (2 μm) de olho de peixe dourado variedade padrão. (A) Íris; (B) Malha trabecular; (C) Ligamento anular; (D) Córnea; (E) Junção corneoescleral; (F) Epitélio ciliar não pigmentado.

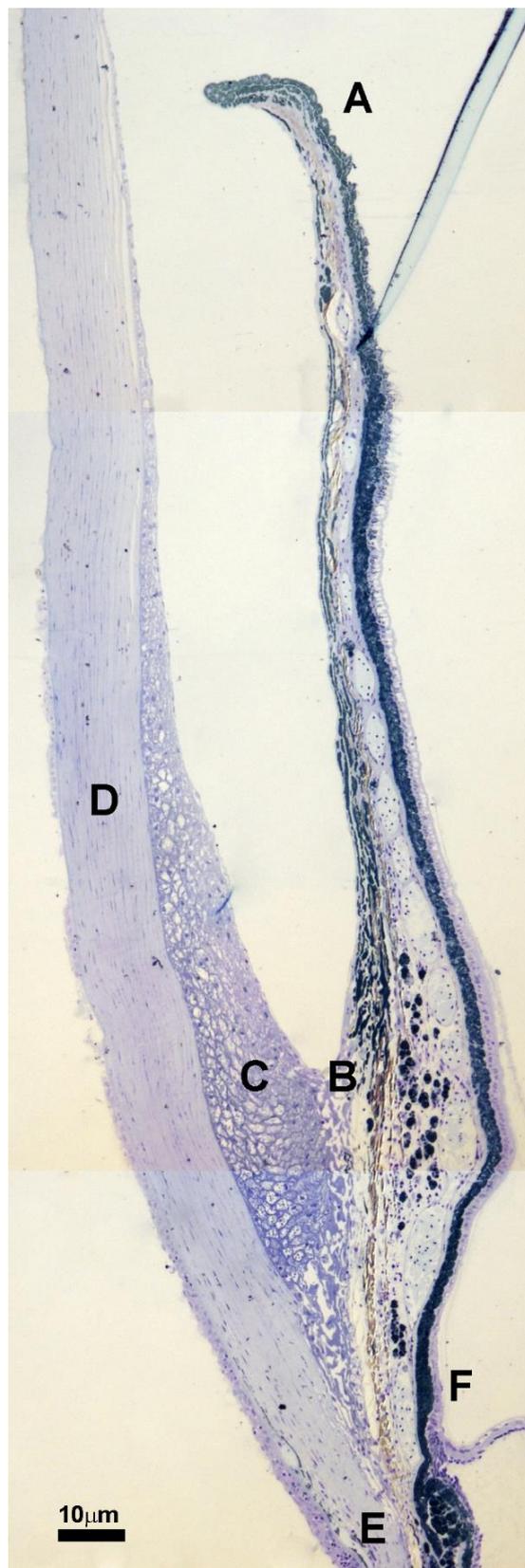


Figura 10. O ângulo de drenagem do peixe dourado *demekin*, porção ventral. Fotomicrografia de campo claro de seção semifina (2 μm) de olho de peixe dourado variedade *demekin*. (A) Íris; (B) Malha trabecular; (C) Ligamento anular; (D) Córnea; (E) Junção corneoescleral; (F) Epitélio ciliar não pigmentado.

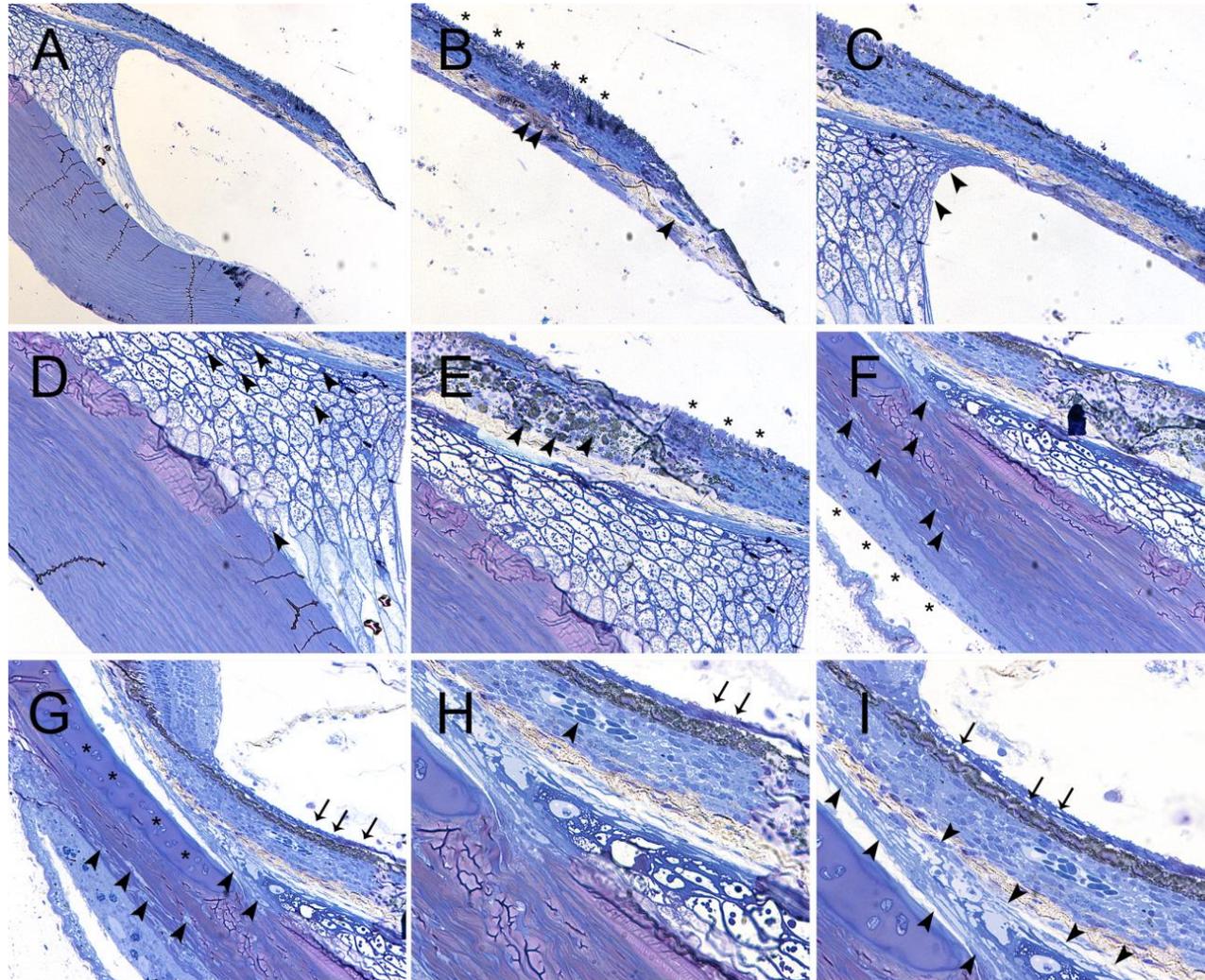


Figura 11. Detalhes da região do ângulo de drenagem do peixe dourado padrão, porção ventral. (A) Fotomicrografia de campo claro de seção fina (0.5 μ m) de olho de peixe dourado variedade padrão. (A) Aumento de 10x, mostrando as principais estruturas da região, aumentadas nos demais painéis. (B)

Aumento de 20x do estroma irídico. Nota-se a presença de vasos com hemácias nucleadas (ponta de seta única), aglomerados pigmentares (duas pontas de seta) e, na face voltada para a câmara posterior, a presença de células epiteliais contendo vilosidades (asteriscos). **(C)** Aumento de 20x da junção irido-anular. Nesta região, as células de revestimento do estroma irídico dão origem a uma fina malha trabecular, que apresenta continuidade com o ligamento anular. Embora a trabécula não se diferencie do ligamento anular neste aumento, na interface com a câmara anterior notam-se pequenas descontinuidades (pontas de seta), por onde o humor aquoso provavelmente é drenado. Tais descontinuidades não foram observadas no ângulo dorsal. **(D)** Aumento de 20x do ligamento anular, constituído por malha loculada de conteúdo granular. As paredes do ligamento são formadas por células de aspecto alongado (alguns núcleos estão indicados por pontas de setas). O conteúdo dos *loci* varia de granular a reticulado. **(E)** Aumento de 20x da junção irido-anular. Nota-se a variação de aspecto no conteúdo dos *loci* do ligamento anular, aglomerados pigmentares do estroma irídico (pontas de seta) e as vilosidades das células epiteliais recobrimo a face posterior da íris (asteriscos). **(F)** Aumento de 20x da junção córneo-escleral. Nesta região encontram-se discretos canalículos (pontas de seta). O epitélio corneano continua-se com a conjuntiva (asteriscos) e, embebida na esclera, encontram-se placas cartilaginosas que dão forma e sustentação ao globo ocular em peixes. **(G)** Aumento de 20x da junção córneo-escleral, evidenciando a placa cartilaginosa (asteriscos), e um complexo capilar na junção entre córnea e conjuntiva e na junção entre a malha trabecular e a córnea (pontas de seta). Na face interna, nota-se a continuidade entre o estroma corneano à direita, a zona marginal ciliar ao centro e a retina à esquerda. Nesta região do ângulo ventral, as células não pigmentadas da face posterior da íris não parecem possuir vilosidades neste aumento (setas). **(H)** Aumento de 40x da junção córneo-escleral, mostrando em maiores detalhes vaso no estroma irídico (ponta de seta), vilosidades no epitélio não pigmentado da face posterior da íris (setas) e as células que compõem as finas paredes do ligamento anular, bem como o conteúdo granular dos *loci*. Neste aumento, nota-se a fina malha trabecular na interface entre o estroma irídico e o ligamento anular. Esta circunda o ligamento anular na sua porção mais posterior, continuando-se com a córnea. **(I)** Aumento de 40x da zona ciliar marginal. O epitélio ciliar não pigmentado continua-se com o epitélio irídico não pigmentado. Nesta região, este epitélio apresenta vacúolos (setas) em adição às vilosidades, sugerindo função secretora ou absorptiva. Também aqui nota-se a malha trabecular circundando o ligamento anular em sua porção posterior e indo de encontro à córnea (pontas de seta).

Visualizado nas secções meridionais como uma área triangular preenchida por um conjunto de espaços de forma irregular (alguns circulares, outros ovalados ou alongados), cujas paredes assemelham-se a fibras achatadas, o ligamento anular estende-se por toda a circunferência da região de transição iridocorneana em local análogo ao do ligamento pectinado nos demais vertebrados, possuindo contudo aspecto mais robusto e compacto. Suas dimensões e aspecto variam muito num mesmo animal, podendo ora apresentar-se vasto e com loculações amplas ou estreito e com certo preenchimento interno, dependendo da região do olho presente nas secções. As paredes dos *loci* são compostas por células alongadas e de núcleos achatados (**Figuras 12**, setas). Os *loci* do ligamento possuem algum tipo de conteúdo granular, que assemelha-se a pequenos glóbulos de diâmetros diversos, imersos em algum tipo de líquido ou rede trabecular delicada.

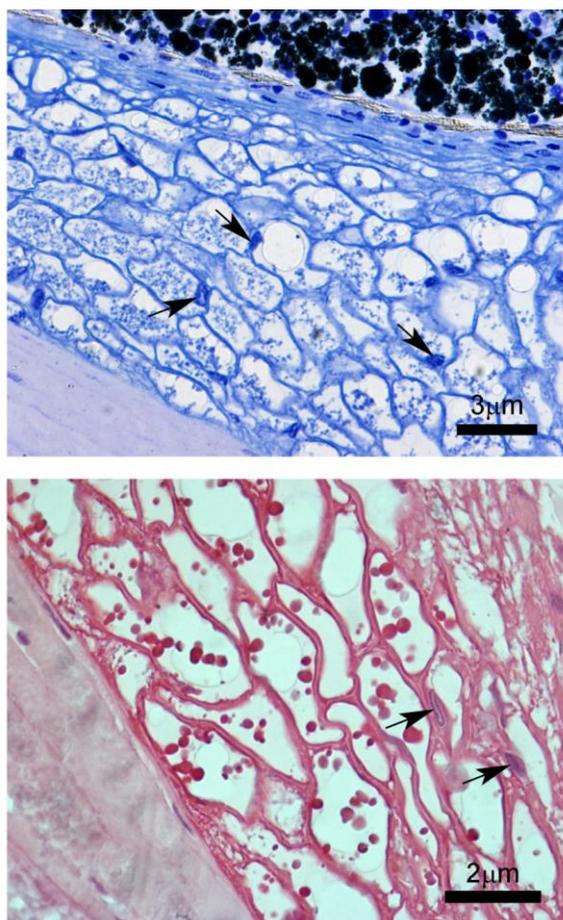


Figura 12. Detalhes do ligamento anular. (A) Fotomicrografia de campo claro de seção semifina (2 µm) de olho de peixe dourado variedade padrão, corada com azul de toluidina. (B) Fotomicrografia de campo claro de seção semifina (1 µm) de olho de peixe dourado

variedade padrão, corada com hematoxilina e eosina. Em ambos os painéis, nota-se a variação de forma dos *loci* e do diâmetro e aspecto dos grânulos em seu interior. As pontas de seta indicam os núcleos das células que compõem as paredes dos *loci*.

Na interface com a câmara anterior, nota-se a presença de um epitélio em continuidade com a córnea, recobrimdo toda a margem livre do ligamento. Este epitélio compõe-se de células achatadas, com pequenas aberturas na porção mais próxima à íris (**Figura 13**, setas), que poderiam viabilizar o escoamento do humor aquoso. Tais aberturas foram encontradas apenas na região ventral do ângulo, e não na porção dorsal. Aparentemente não há vasos ou quaisquer estruturas semelhantes permeando o ligamento anular, enquanto no estroma irídico a vascularização pode mostrar-se exuberante, com vasos mais ou menos dilatados (**Figura 14 A e B**, setas). Muitas vezes encontram-se grânulos de pigmento imiscuídos no tecido (**Figura 11 B e E; Figura 14 C**, setas).

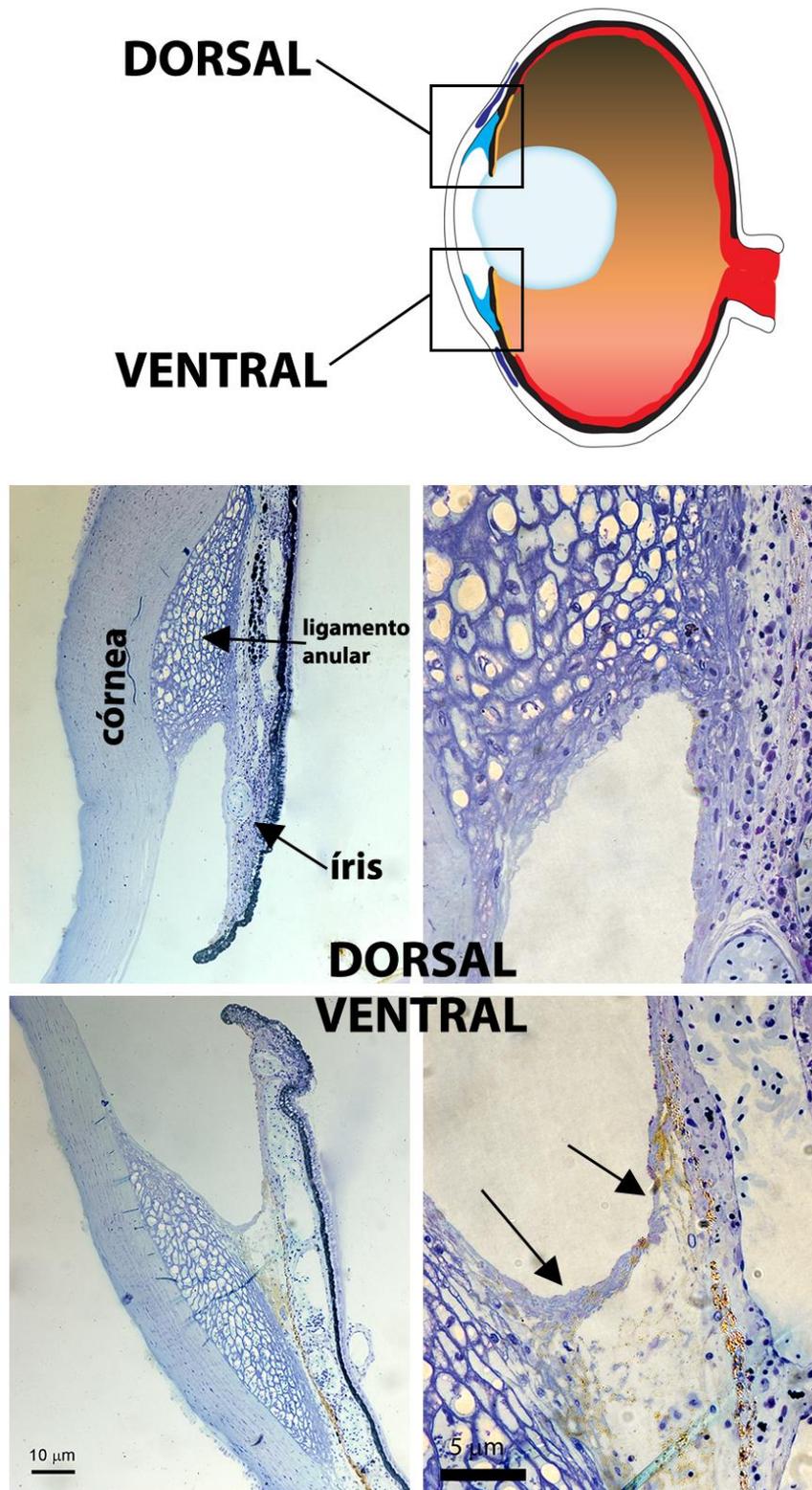


Figura 13. Fotomicrografias da região do ângulo de drenagem dorsal e ventral na variedade padrão do peixe dourado. Nota-se que existe uma diferenciação entre as regiões ventral e dorsal do olho: ventralmente, o ângulo é preenchido pelo ligamento anular e pela malha trabecular, tecido adjacente à íris (setas), já na região dorsal há apenas a presença do ligamento anular.

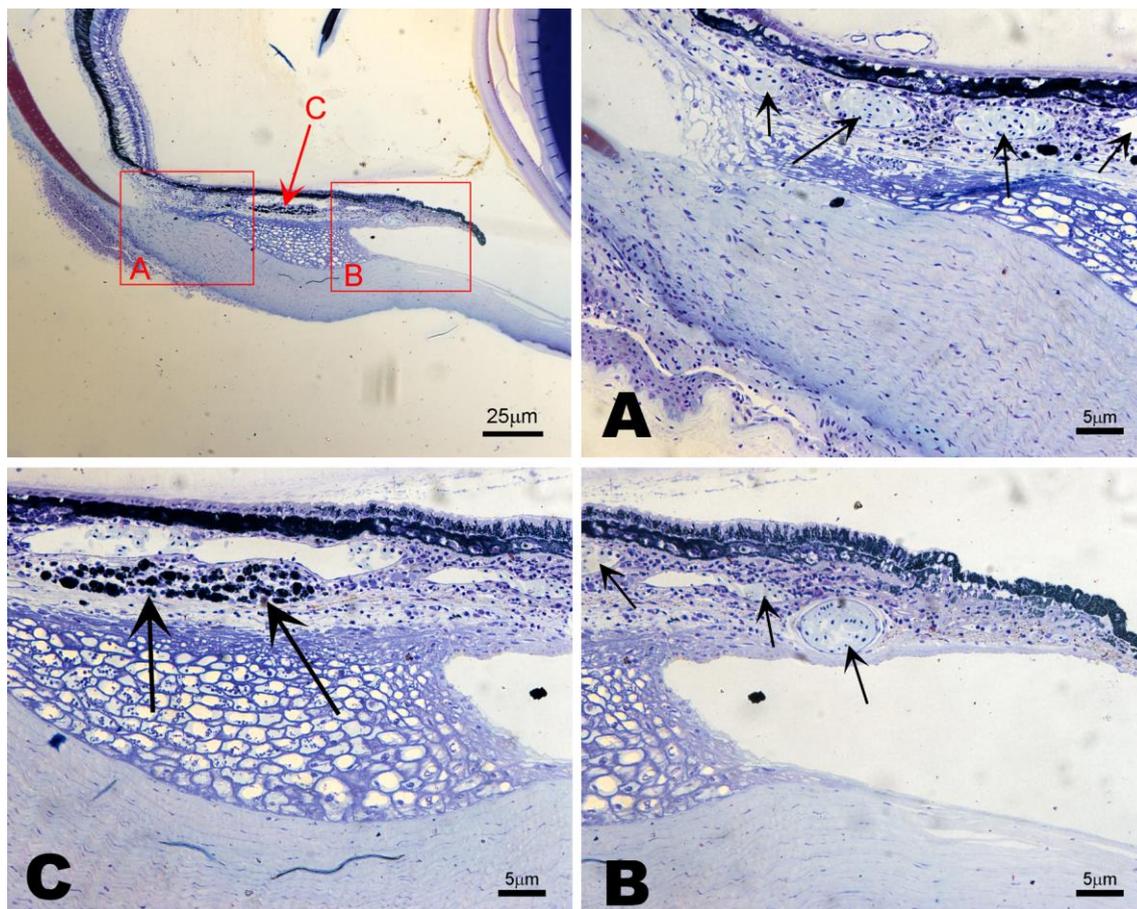


Figura 14. Fotomicrografia da região do ângulo de drenagem dorsal. (A) e (B) vascularização da íris, evidenciando vasos de diferentes calibres; (C) grânulos de pigmentos imiscuídos no estroma irídico.

Embora não tenhamos constatado a existência de canal de Schlemm ou estrutura semelhante em região análoga à dos mamíferos, observamos que há uma discreta malha trabecular na interface entre o ligamento anular e a íris. Esta circunda o ligamento anular em sua porção mais posterior (**Figura 11 I**, pontas de seta), continuando-se com um sistema de diminutos canalículos embebidos na córnea e na conjuntiva (**Figura 11 F**, pontas de seta).

Na região ciliar observa-se a presença de epitélio ciliar composto por uma camada de células pigmentadas externamente e uma camada de células não pigmentadas internamente. O estroma irídico apresenta-se bem vascularizado nesta região (**Figura 11 H**, ponta de seta). Não há corpo ou processos ciliares evidentes, mas apenas o epitélio retro-irídico de características semelhantes ao dos demais vertebrados. Em sua porção posterior, o epitélio pigmentado do estroma ciliar dá origem ao epitélio pigmentar retiniano, enquanto o epitélio não pigmentado continua-se com a retina (**Figura 11 G**).

Comparando-se o ângulo dorsal e ventral de um mesmo animal (**Figura 15**), observamos que o ligamento anular é consistentemente maior na região dorsal (**Figura 15 A**). A distribuição de pigmento no estroma irídico varia de animal para animal, podendo concentrar-se na região dorsal ou ventral. No exemplo da **Figura 16**, há maior quantidade de pigmento na íris dorsal. Nestes aumentos, não há outras diferenças evidentes entre as duas regiões no peixe dourado padrão.

Devido ao crescimento ocular exagerado, a câmara anterior do *demekin* apresenta-se distendida; como suas dimensões eram maiores do que as barcas de inclusão em historresina, foi necessário cortar parte da córnea e íris para realizar a inclusão. Em função disto, os cortes apresentados na **Figura 16** não abarcam toda a câmara anterior. Também no *demekin* (**Figura 16**), o ligamento anular é maior na região dorsal (**Figura 16 A**). Em relação à variedade padrão, nota-se que o estroma irídico é muito mais vascular tanto dorsal quanto ventralmente; os vasos ali presentes possuem lúmen amplo e repleto de hemácias.

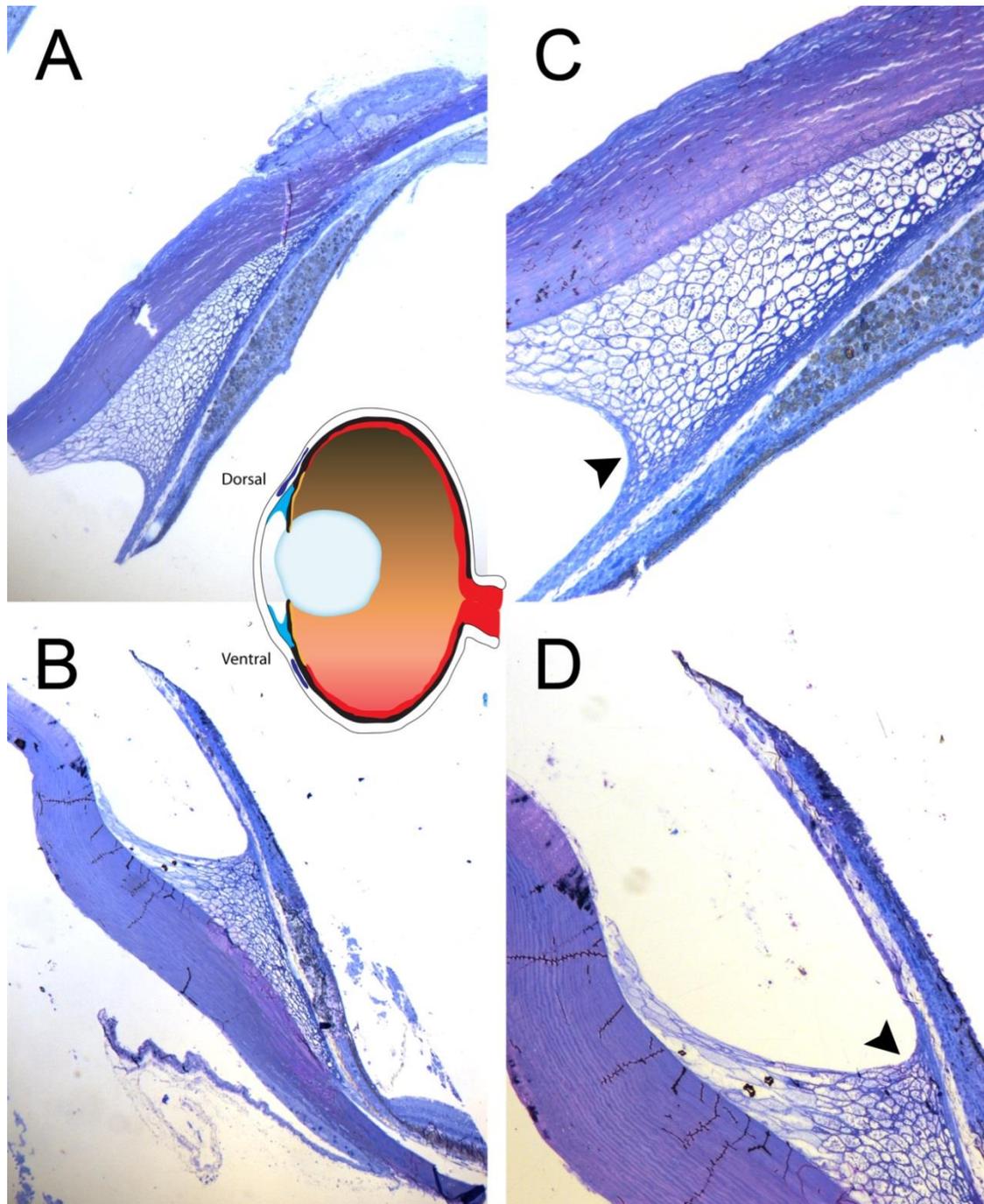


Figura 15. Regiões dorsal e ventral da região do ângulo de drenagem do peixe dourado padrão. **Centro:** Desenho esquemático do olho do peixe dourado, evidenciando a região do ligamento anular dorsal e ventral (azul), o epitélio pigmentado da íris, que posteriormente dá origem ao epitélio pigmentado retiniano (preto), o epitélio não pigmentado da íris (laranja), as placas cartilagosas da esclera (roxo) e a retina (vermelho). **(A)** Região dorsal. Aumento = 5x. **(B)** Região ventral Aumento = 5x. **(C)** Aumento de 10x da região em (A). A ponta de seta indica o epitélio de revestimento do ligamento anular, que nesta região apresenta-se mais espesso e sem fenestras, **(D)** Aumento de 10x da região em (B). A ponta de seta indica o epitélio de revestimento do ligamento anular, que nesta região apresenta-se mais delgado e com fenestras (detalhe desta região na **Figura 15C**), Em todos os painéis, espessura de corte = 0.5 μm .

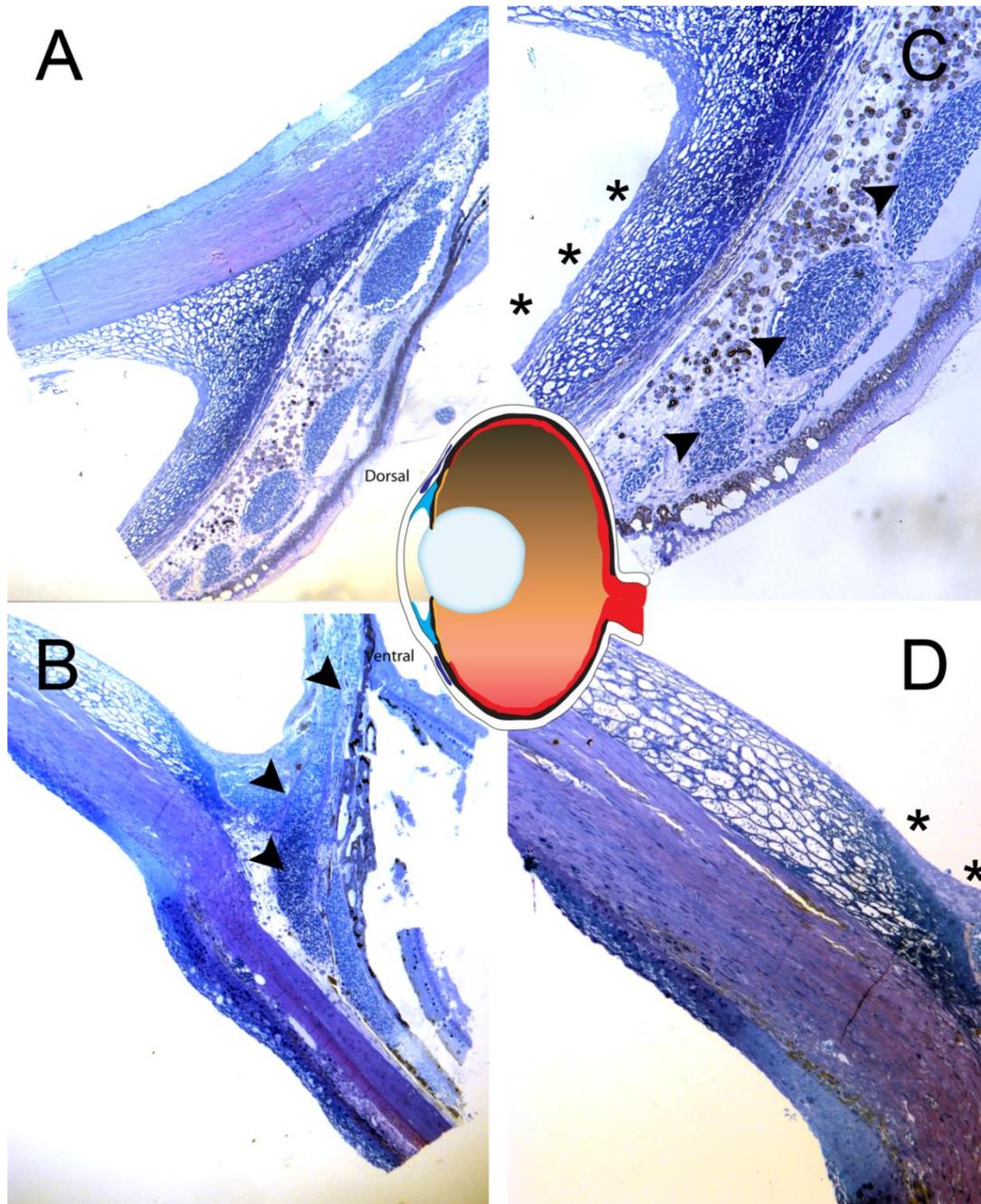


Figura 16 Regiões dorsal e ventral da região do ângulo de drenagem do *demekin*.

Centro: Desenho esquemático do olho do peixe dourado, evidenciando a região do ligamento anular dorsal e ventral (azul), o epitélio pigmentado da íris, que posteriormente dá origem ao epitélio pigmentado retiniano (preto), o epitélio não pigmentado da íris (laranja), as placas cartilagosas da esclera (roxo) e a retina (vermelho). **(A)** Região dorsal. Aumento = 5x. **(B)** Região ventral. As pontas de seta indicam complexo capilar. Asteriscos indicam epitélio de revestimento do ligamento anular. Aumento = 5x. **(C)** Aumento de 10x da região em (A). As pontas de seta indicam vasos repletos de hemácias. Os asteriscos mostram a região anterior do ligamento anular, que apresenta camada espessa de células epiteliais e sem fenestras aparentes. **(D)** Aumento de 10x da região em (B). Asteriscos indicam epitélio de revestimento do ligamento anular. Em todos os painéis, espessura de corte = 0.5 μm .

As características ultraestruturais do epitélio ciliar nas duas variedades de *Carassius auratus* pode ser observada nas **Figuras 17 e 18**. O epitélio ciliar dorsal (**Figura 17 A e B**) apresentou superfície mais irregular e vacúolos. O epitélio encontrado na região ventral do olho, por sua vez, tem a superfície celular mais lisa e uniforme.

No *demekin* também verificou-se a existência desta diferenciação do epitélio ciliar. Na **Figura 18** pode-se observar em maior detalhe o epitélio ciliar dorsal, mostrando diversas projeções citoplasmáticas e conteúdo vacuolar. Em C e D é possível observar a formação de uma vesícula englobando ou secretando partículas densas.

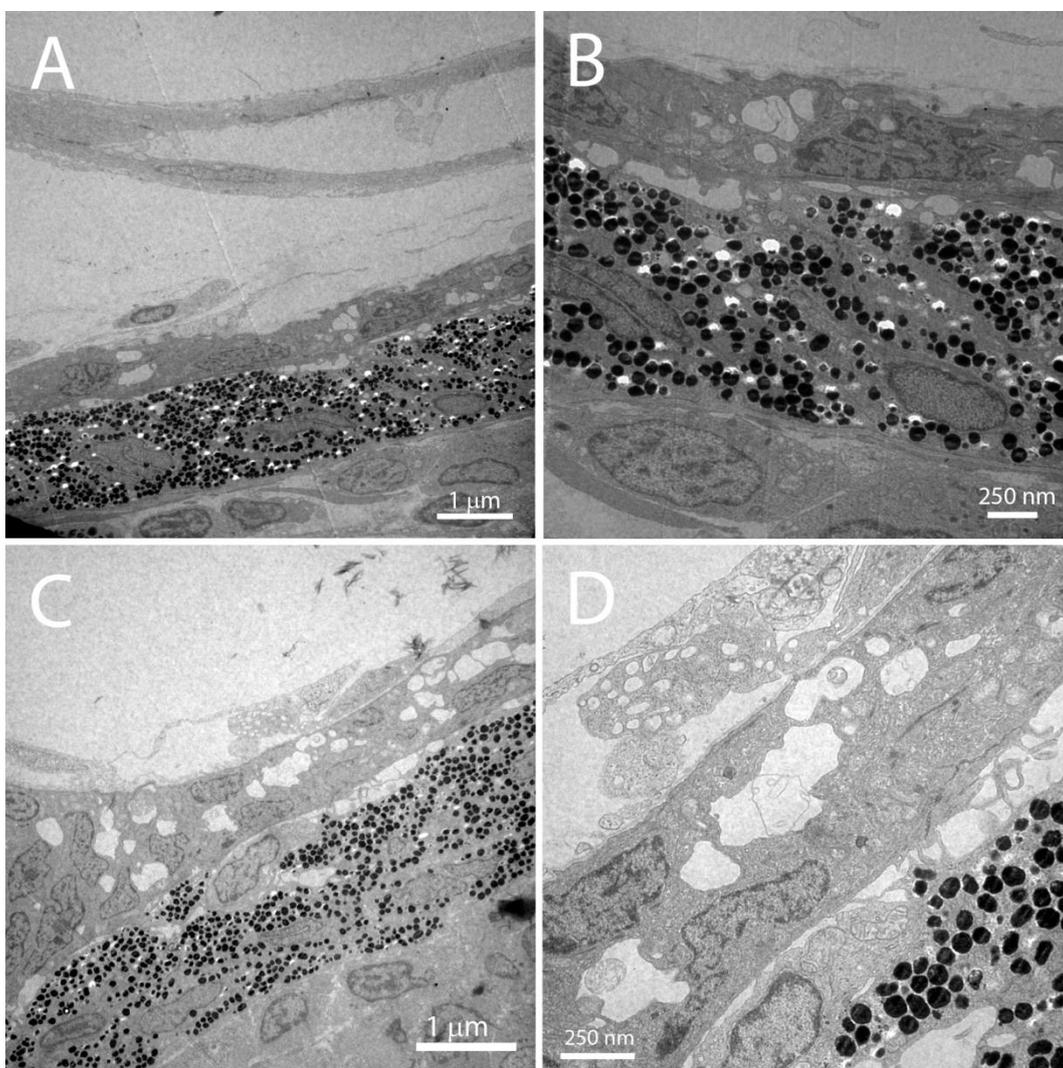


Figura 17. Eletromicrografias do epitélio ciliar na variedade padrão. (A) e (B) Epitélio ciliar dorsal, com pequenas irregularidades em sua superfície. **(C) e (D)** Epitélio ciliar ventral, de aspecto liso e uniforme.

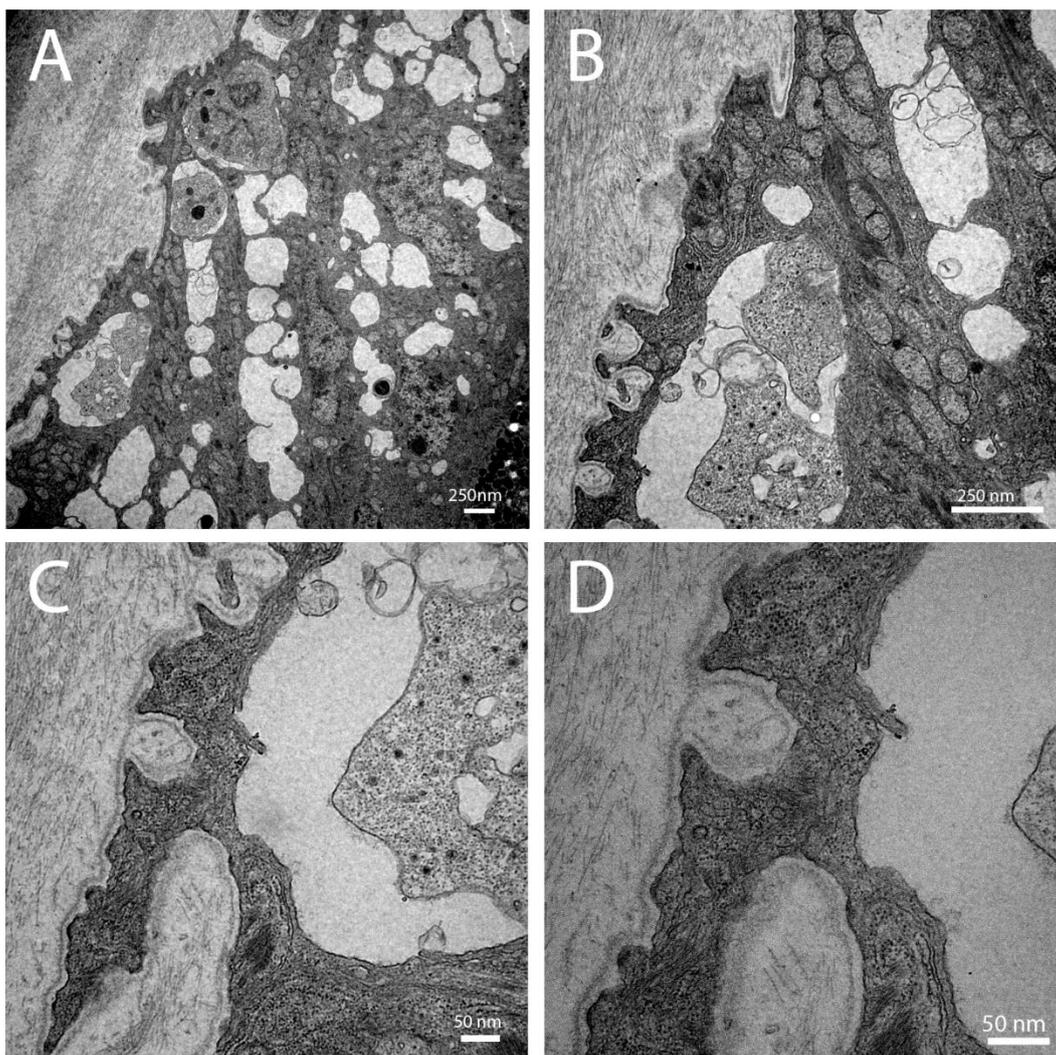


Figura 18. Eletronmicrografias do epitélio ciliar dorsal na variedade *demekin*, com diferentes magnificações. Em (C) e (D), nota-se a formação de vesícula englobando ou secretando partículas eletrondensas.

Ultraestruturalmente, o estroma irídico do peixe dourado padrão apresenta-se recoberto em sua porção posterior por duas camadas de células pigmentadas (**Figura 19**). A camada mais interna caracteriza-se por grânulos menores e mais numerosos, enquanto a camada externa, voltada para a câmara posterior, apresenta microvilosidades e estruturas vacuolares, características de epitélios secretores e/ou absorptivos. No citoplasma destas células, encontram-se inúmeras invaginações membranosas, de aspecto mais desorganizado do que o encontrado em retículos endoplasmáticos (**Figura 19 D**).

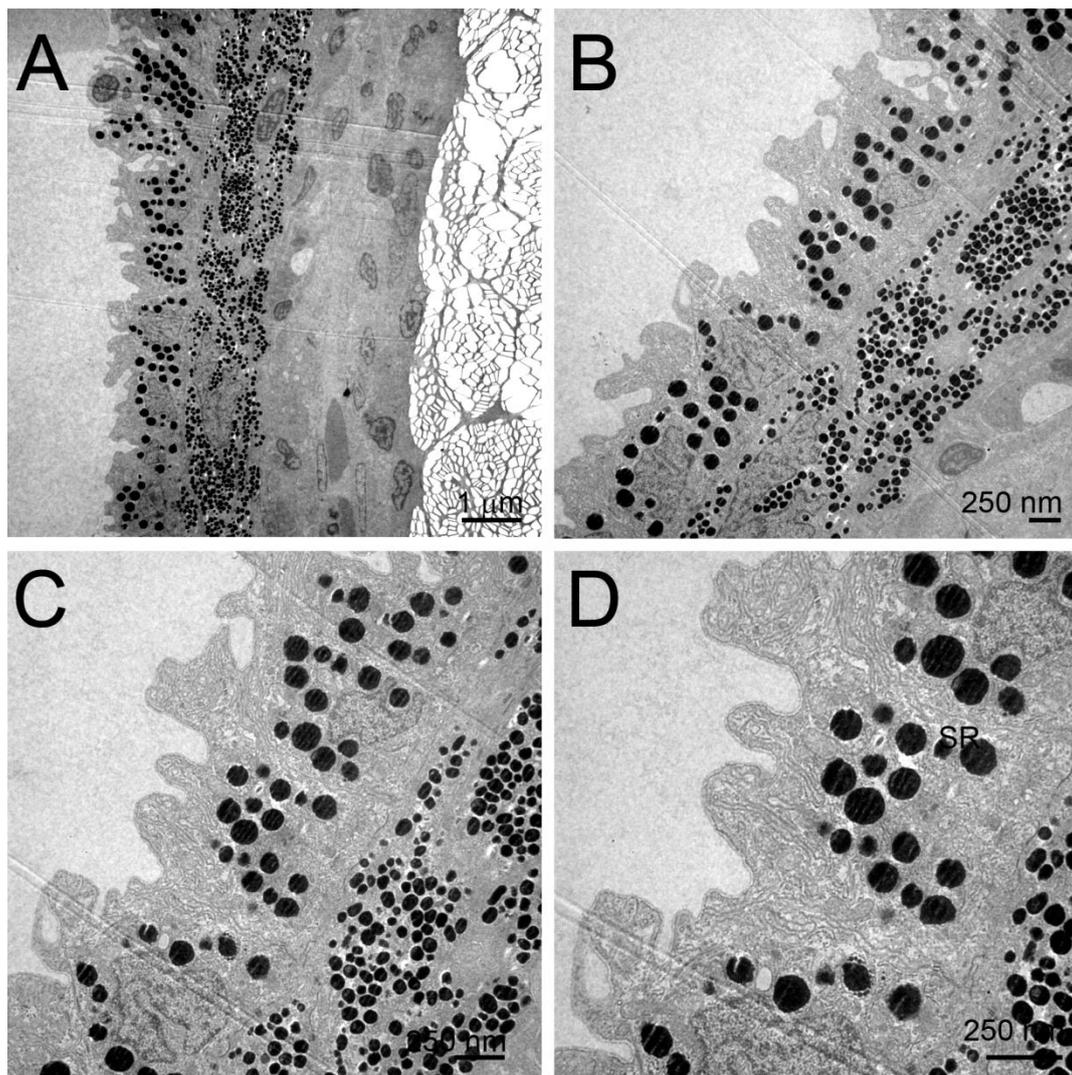


Figura 19. Ultraestrutura do estroma irídico do *Carassius auratus* padrão, região ventral. A camada mais interna caracteriza-se por grânulos menores e mais numerosos, enquanto a camada externa, voltada para a câmara posterior, apresenta microvilosidades e estruturas vacuolares, características de epitélios secretores e/ou absorptivos. No citoplasma destas células, encontram-se inúmeras invaginações membranosas (D), de aspecto mais desorganizado do que o encontrado em retículos endoplasmáticos.

5.3. Dinâmica do humor aquoso

A drenagem do humor aquoso foi avaliada através da injeção de corante na câmara anterior em intervalos de tempo definidos - 5, 15, 30 e 60 minutos. Os olhos dos animais foram fotografados *in vivo* em diversos momentos para que fosse possível acompanhar sequencialmente o fluxo do corante dentro do olho (Figuras 20 e 21). Logo após a injeção, ocorreu em alguns animais um pequeno extravasamento de corante através da perfuração na córnea (Figura 20, t=0). Para melhor visualizar a

movimentação do corante a superfície corneana foi delicadamente limpa com o auxílio de um cotonete embebido em solução salina 9% (**Figura 20**, t=32).

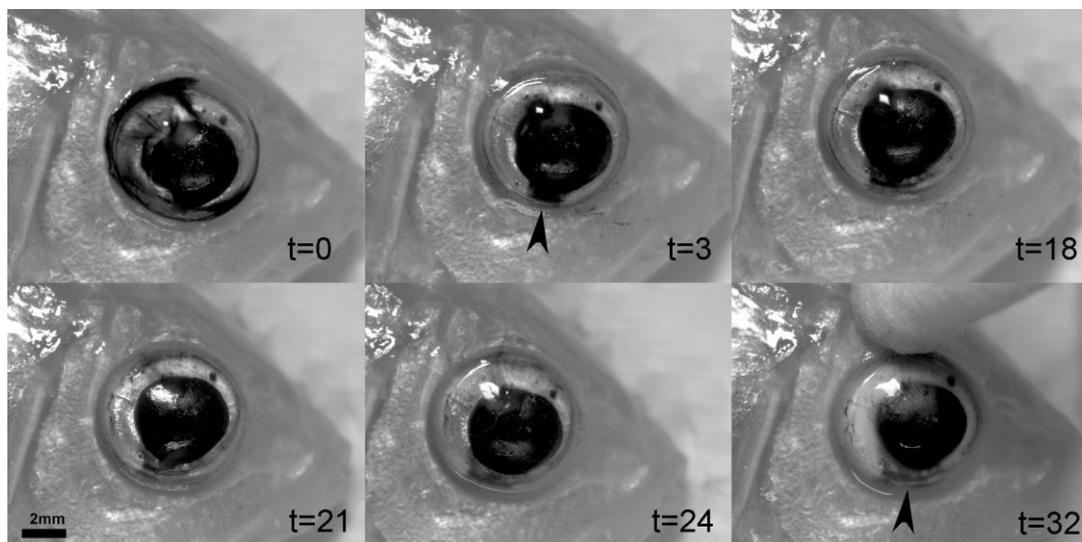


Figura 20. Exemplo de monitoramento fotográfico das injeções de corante na câmara anterior de *Carassius auratus* padrão. Em t=0 foi registrado o momento subsequente à injeção; em seguida, a superfície da córnea foi limpa com cotonete para remover o excesso de corante. A partir de t=3, é possível visualizar o escoamento do corante pela região ventral do olho (seta). Todo o procedimento foi realizado sob estereomicroscópio acoplado a câmara digital e microcomputador.

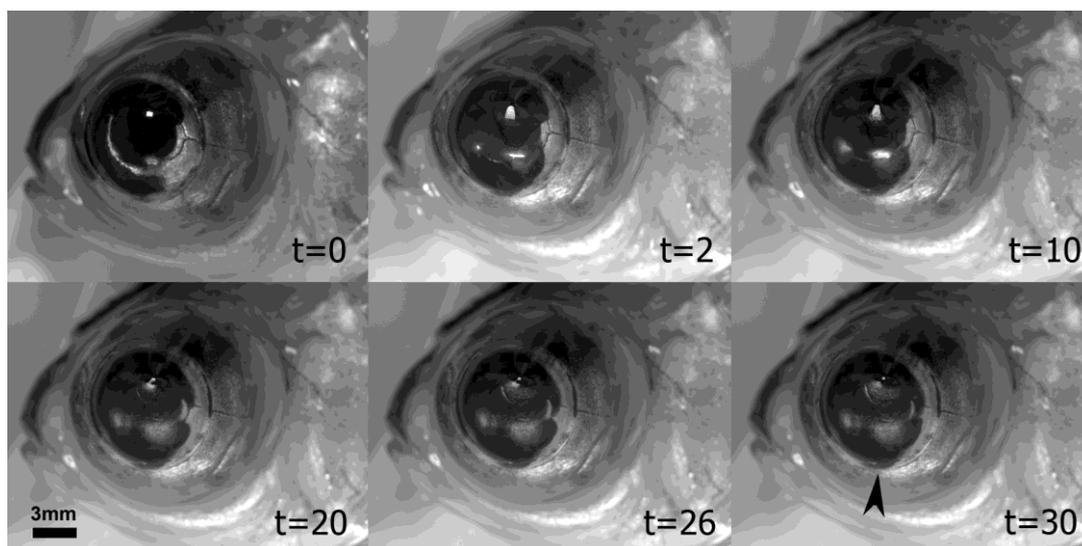


Figura 21. Exemplo de monitoramento fotográfico das injeções de corante na câmara anterior de *Carassius auratus* na variedade *demekin*. Em t=0 foi registrado o momento subsequente à injeção. Foi possível acompanhar o espalhamento do corante na câmara anterior. Ao final de 30 minutos nota-se um escoamento discreto de corante pela região ventral do olho (seta). Todo o procedimento foi realizado sob estereomicroscópio acoplado a câmara digital e microcomputador.

No *demekin*, em alguns casos, a visualização do corante foi dificultada pela ocorrência natural de pigmentação escura em seu globo ocular. A injeção de nanquim amarelo em outros animais desta variedade resolveu esta limitação.

O resultado da drenagem em um peixe padrão (ângulo ventral) após uma hora da injeção pode ser observado na **Figura 22**; o resultado de experimento semelhante para o *demekin* encontra-se na **Figura 23**. Em ambos os casos, o corante aparenta ainda estar em fluxo após 60 minutos, bem dissolvido no humor aquoso. A malha trabecular mostra-se isenta de corante, bem como os canalículos corneais. O intervalo de 60 minutos presumivelmente foi muito curto para que a drenagem no peixe dourado fosse “visível” através de nossa técnica, porém o fenômeno parece estar se iniciando na região do ângulo ventral (**Figura 22 B e D**).

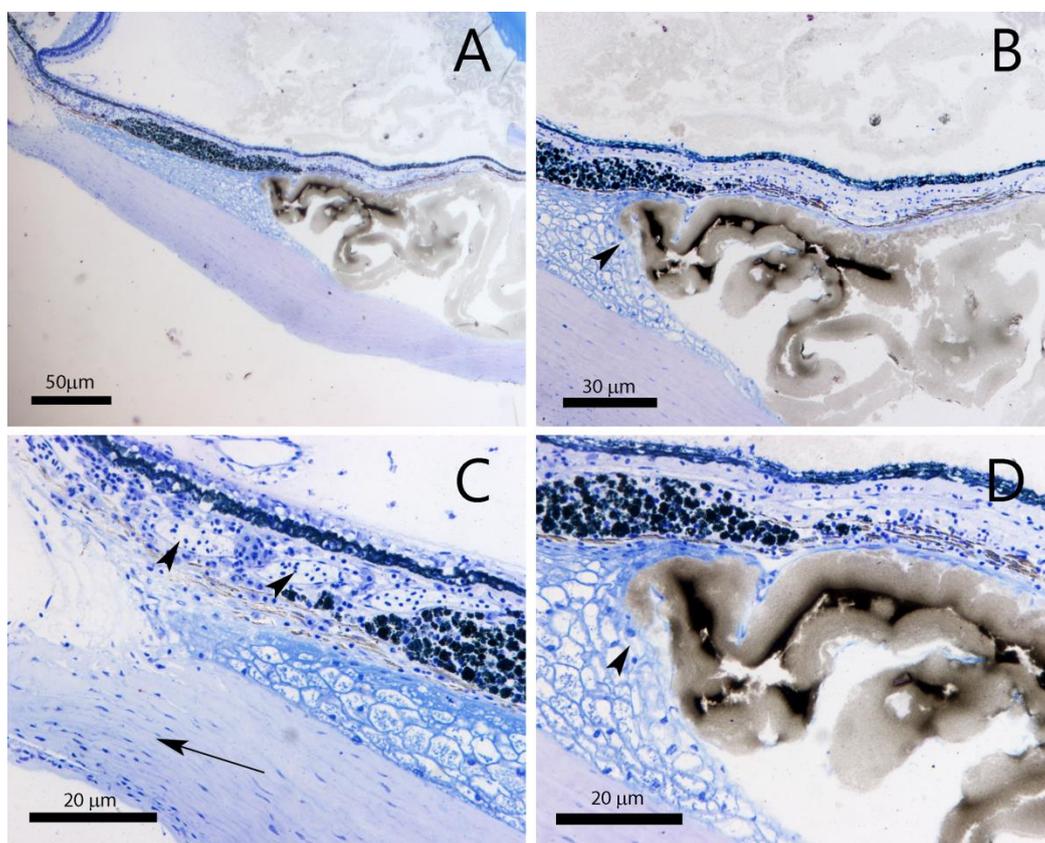


Figura 22. Drenagem no ângulo ventral de *Carassius auratus* padrão 60 minutos pós-injeção. (A) Observa-se algum escoamento de corante para a câmara vítrea; porém, a maior concentração encontra-se na câmara anterior, em região adjacente ao ângulo de drenagem. (B) Magnificação do painel (A), mostrando um possível início de drenagem pela malha trabecular (ponta de seta). Nota-se também alguma concentração de corante na porção anterior do estroma irídico, de aspecto diferente dos grânulos pigmentares característicos deste tecido. (C) Não foi observada presença de corante nos vasos da íris (pontas de seta) e nem nos canalículos córneo-esclerais (seta). (D) Maior aumento do painel (B),

evidenciando uma possível rota de drenagem do humor aquoso através da malha trabecular. Espessura de corte = 2 μm .

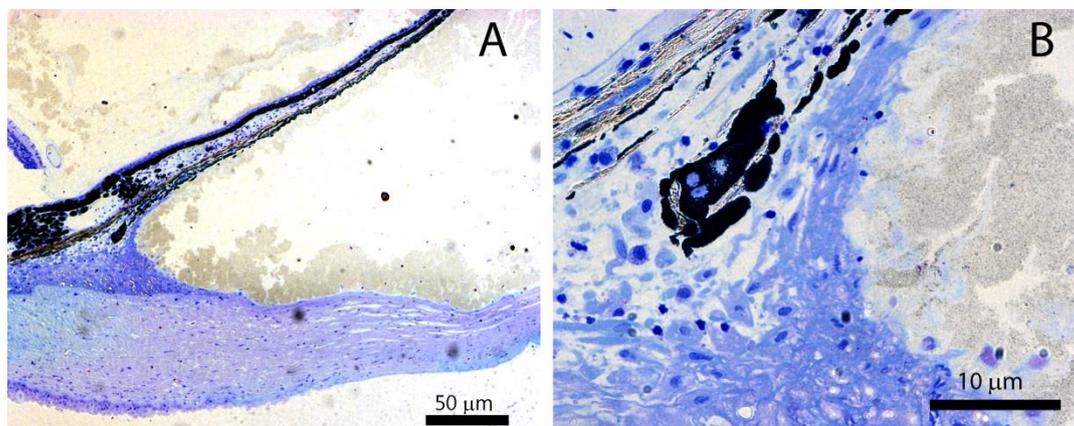


Figura 23. Drenagem no ângulo ventral de *Carassius auratus* variedade *demekin* 60 minutos pós-injeção. (A) O corante migrou para a câmara vítrea e regiões posteriores do olho, mas a maior parte ficou na região do ângulo de drenagem. **(B)** Magnificação do painel (A), mostrando um acúmulo de corante em região adjacente à malha trabecular. Espessura de corte = 2 μm .

Quantificamos a presença de corante nas estruturas oculares de acordo com o número de ocorrências observadas nos cortes histológicos (**Figuras 24 – 26**). Para isso, observamos algumas regiões de interesse no olho das variedades estudadas:

- Ângulo ventral e dorsal: regiões da câmara anterior localizadas na região em que se forma um ângulo entre a córnea e a íris, nos polos ventral e dorsal do olho.
- Trabécula ventral e dorsal: regiões localizadas entre ligamento anular e íris ventral e dorsalmente.
- Íris: estrutura que é contínua à retina e localiza-se na região anterior do olho.
- Canalículos: diminutos canalículos localizados na junção córneo-escleral.
- Câmara vítrea: maior câmara do olho do peixe dourado e de mamíferos. Observamos se havia corante em seu interior.
- Retina: camada mais interna do olho; observamos em especial a presença de corante nos vasos epirretinianos, que estão em contato com a câmara vítrea.

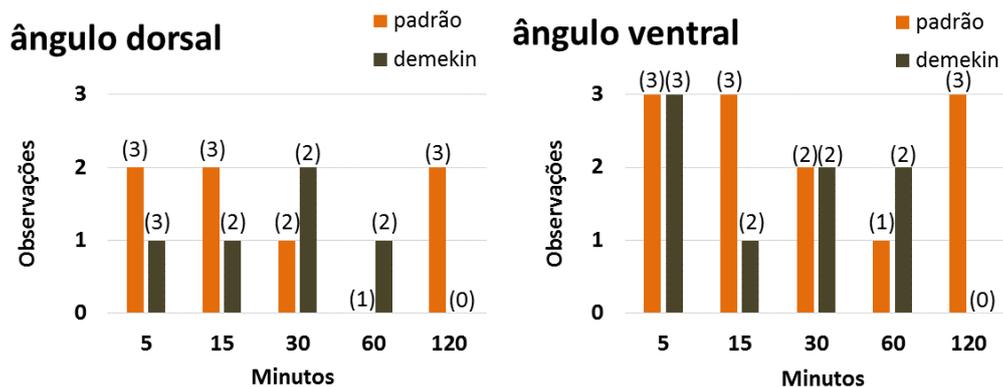


Figura 24. Gráficos ilustrando o número de observações da presença de corante nos ângulos dorsal e ventral, em ambas variedades de peixe dourado. Observou-se a presença de corante tanto na região do ângulo dorsal quanto na ventral, entretanto, o corante concentrou-se mais frequentemente na região ventral, o que é demonstrado em praticamente 100% das observações. O número entre parênteses indica o n utilizado.

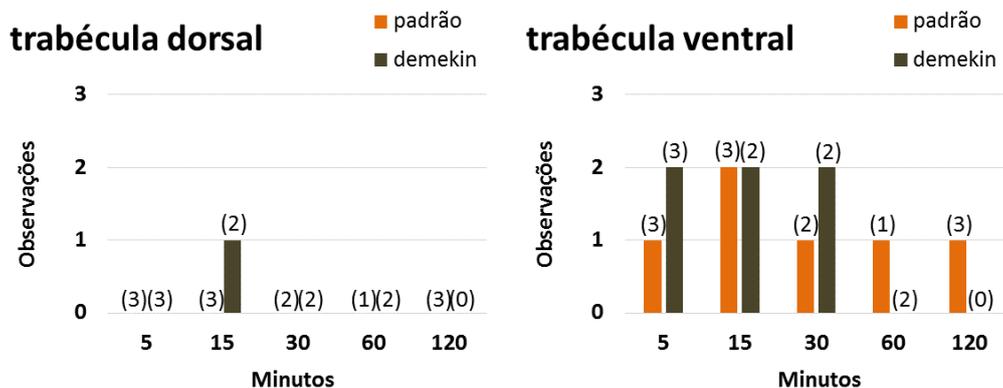


Figura 25. Gráficos ilustrando o número de observações da presença de corante na região trabecular dorsal e ventral, em ambas variedades de peixe dourado. Ao observar a região trabecular – entre ligamento anular e a íris – os resultados foram diferentes do que foi encontrado na região do ângulo de drenagem; apesar de terem sido observados casos em que o corante penetrou na trabécula dorsal, estes não foram predominantes; já na trabécula ventral encontramos o maior número de ocorrências. O número entre parênteses indica o n utilizado.

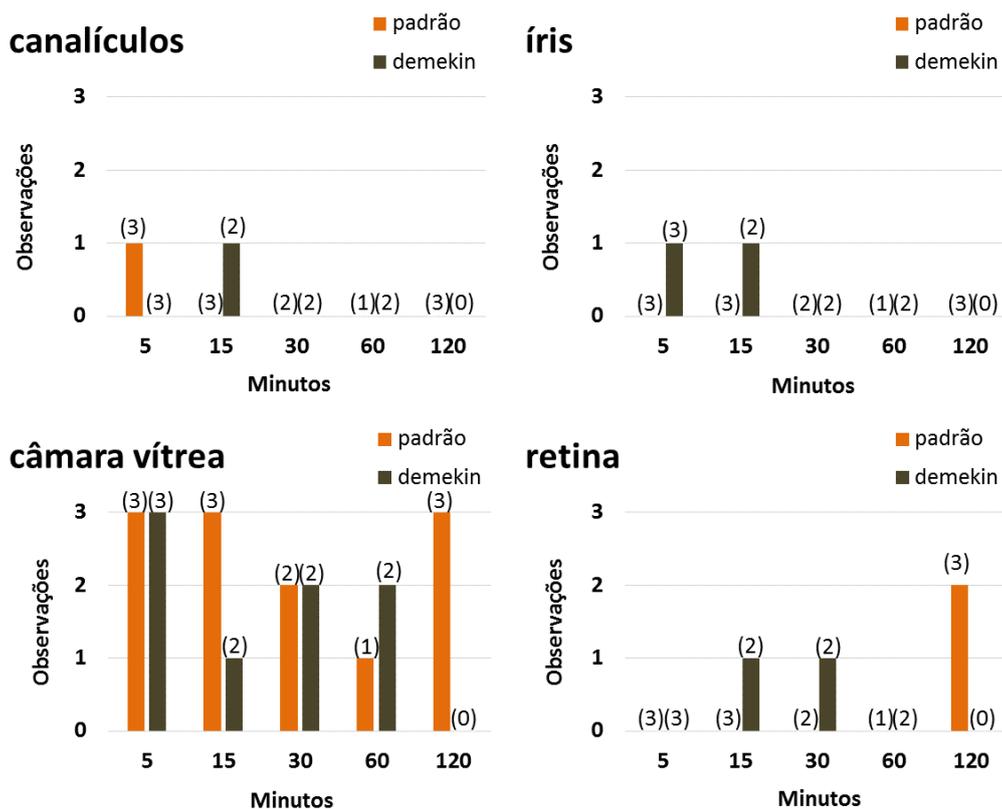


Figura 26. Gráficos ilustrando o número de observações da presença de corante na íris, canalículos na córnea, câmara vítrea e retina, em ambas variedades de peixe dourado. O corante também foi localizado em estruturas secundárias de drenagem (íris, canalículos e retina) e em quase 100% dos casos, espalhou-se pela câmara vítrea. O número entre parênteses indica o n utilizado.

Foi observada a presença de corante na câmara vítrea em praticamente 100% das observações, assim como nas regiões do ângulo dorsal e ventral na câmara anterior. No entanto, na região trabecular o corante concentrou-se quase que exclusivamente na região ventral. Observou-se a presença de corante também na íris, canalículos e vasos epirretinianos.

Após um dia da injeção (**Figura 27**), o corante assume a aparência de conglomerados de pigmento, com bordas irregulares e impregnados nas estruturas oculares. Nota-se a presença de corante nas câmaras anterior e vítrea, aderindo-se a lente e dirigindo-se para regiões mais posteriores. A tinta nanquim infiltrou-se por toda a região do ângulo de drenagem, preenchendo os canalículos córneo-esclerais, a malha trabecular e o estroma irídico. Também foi possível notar a presença de corante na região posterior da íris. O ligamento anular (**Figura 27**, asteriscos), por sua vez, apresentou-se livre de corante, aparentemente não participando do processo de

drenagem. O corante também foi detectado na membrana limitante interna da retina central (**Figura 27 D**).

A **Figura 28** ilustra os discretos canalículos na junção córneo-escleral (ponta de seta em A) de *Carassius auratus* padrão, preenchidos por corante 48 horas após a injeção. No painel B, destaque para a malha trabecular, também repleta de corante. Após 72 horas da injeção de corante, observa-se que o ligamento anular continua desprovido de nanquim (**Figura 29**). Nestes intervalos, praticamente não há mais corante na câmara anterior; este encontra-se concentrado no estroma irídico, provavelmente sendo drenado pelos vasos ali presentes; tal rota de drenagem também é observada em mamíferos.

Passados quatro dias da injeção (**Figura 30**), o perfil de infiltração do corante se mantém: a câmara anterior está livre de corante e o ligamento anular continua não participando do processo de drenagem. O estroma irídico, a malha trabecular, e os canalículos córneo-esclerais encontram-se repletos de corante. Em alguns casos, observou-se também acúmulo de corante no estroma corneano e na membrana limitante interna da retina.

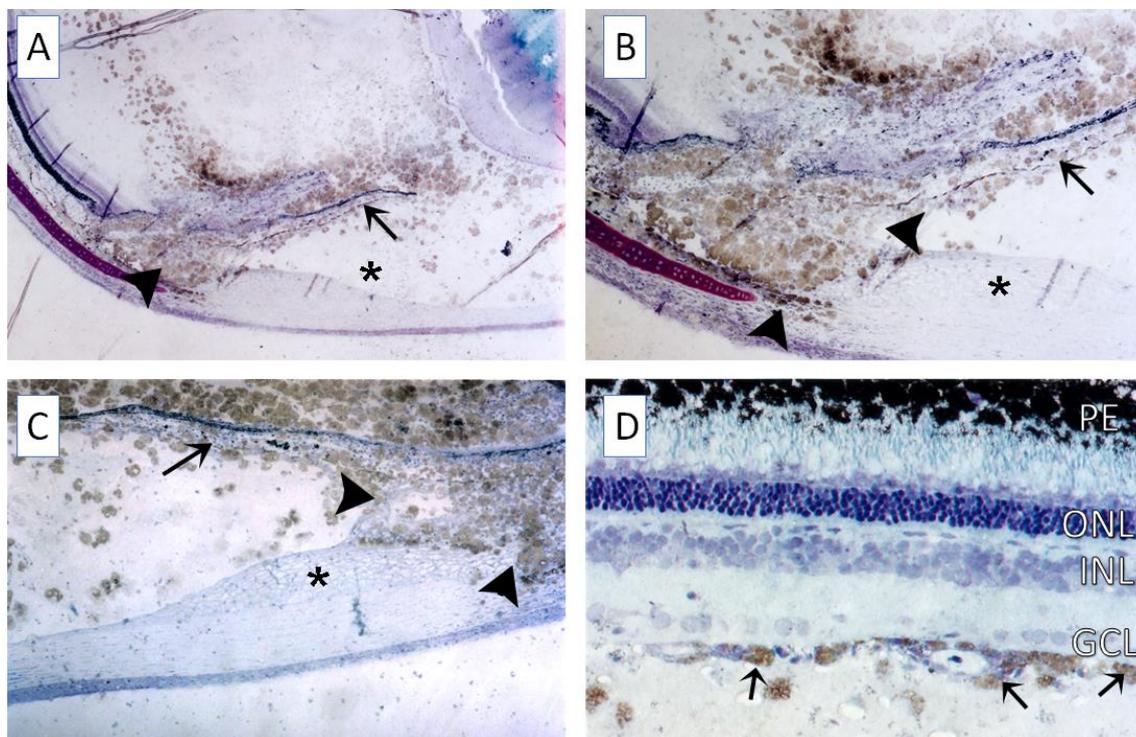


Figura 27. Drenagem do humor aquoso pela região ventral do olho do peixe dourado padrão 24 h após a injeção de corante. (A) Ângulo de drenagem ventral. Neste aumento, verifica-se que o corante passou para a câmara vítrea, rodeando a lente e atingindo áreas mais posteriores do olho. Destaca-se o ligamento anular (asterisco) livre de corante. Os canalículos córneo-esclerais (ponta de seta) encontraram-se preenchidos pelo corante, assim

como o estroma irídico (seta). Aumento de 5x. **(B)** Aumento de 10x do painel (A). O corante infiltrou-se pela malha trabecular (ponta de seta) e pelo estroma irídico (seta inteira). Também há a presença do corante na porção posterior da íris. O ligamento anular encontra-se livre de corante (asterisco). **(C)** Ângulo ventral de outro animal, mostrando a ausência de corante no ligamento anular (asterisco) e infiltração de corante pela malha trabecular e canalículos corneais (pontas de seta) e estroma irídico (seta inteira). Aumento de 10x. **(D)** Fatia de retina central. Observa-se a presença de corante (setas) aderidas à membrana limitante interna, bem próxima da camada de células ganglionares. Aumento de 40x. *PE*: epitélio pigmentado; *ONL*: camada nuclear externa; *INL*: camada nuclear interna; *GCL*: camada de células ganglionares (Joselevitch & Smith, 1997).

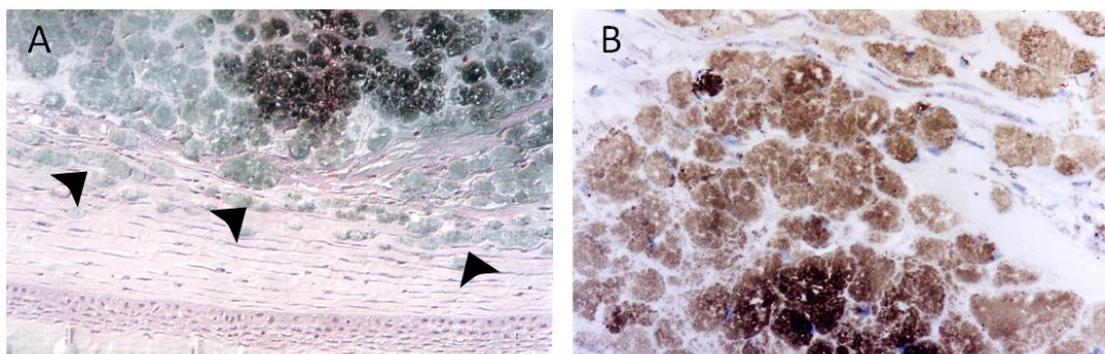


Figura 28. Junção córneo-escleral de *Carassius auratus* padrão 48 horas após injeção de corante. **(A)** Canalículos presentes na junção córneo-escleral (pontas de seta) preenchidos por corante. Aumento de 20 x. **(B)** Malha trabecular também preenchida pelo corante. Aumento de 40x. Lâminas coradas com hematoxilina-eosina; espessura dos cortes = 1 μ m (Joselevitch & Smith, 1997).

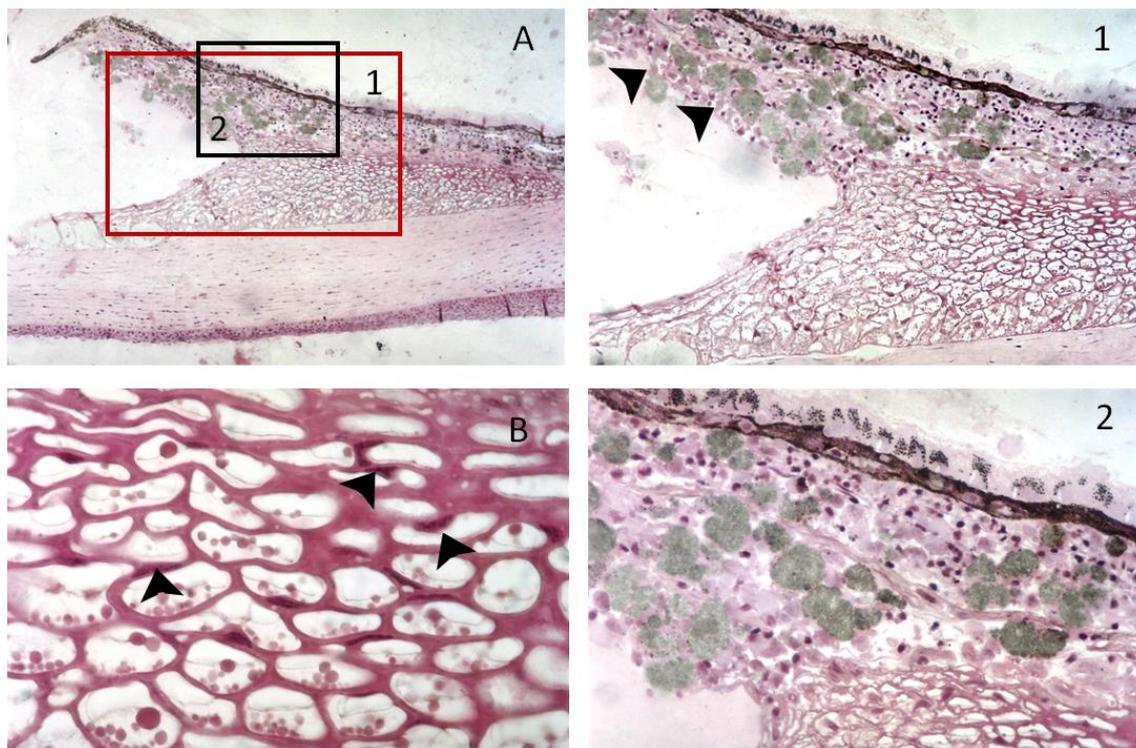


Figura 29. Região do ângulo de drenagem ventral de *Carassius auratus* padrão três dias após injeção de corante. (A) Panorama do ângulo de drenagem. A câmara anterior encontra-se livre de corante. Aumento de 10x. **(1)** Aumento da região 1 indicada no painel (A) mostrando com maior detalhamento o ligamento anular, com suas células livres de corante e uma porção da íris repleta de corante (pontas de seta). Aumento de 20x. **(2)** Maior aumento da região 2 indicada no painel (A), mostrando o estroma irídico preenchido por corante. Aumento de 40x. **(B)** Aumento de 100x do ligamento anular em (A), evidenciando os núcleos celulares (pontas de seta) e a ausência de corante em seu interior. Todas as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina; espessura dos cortes = 1 μm (Joselevitch & Smith, 1997).

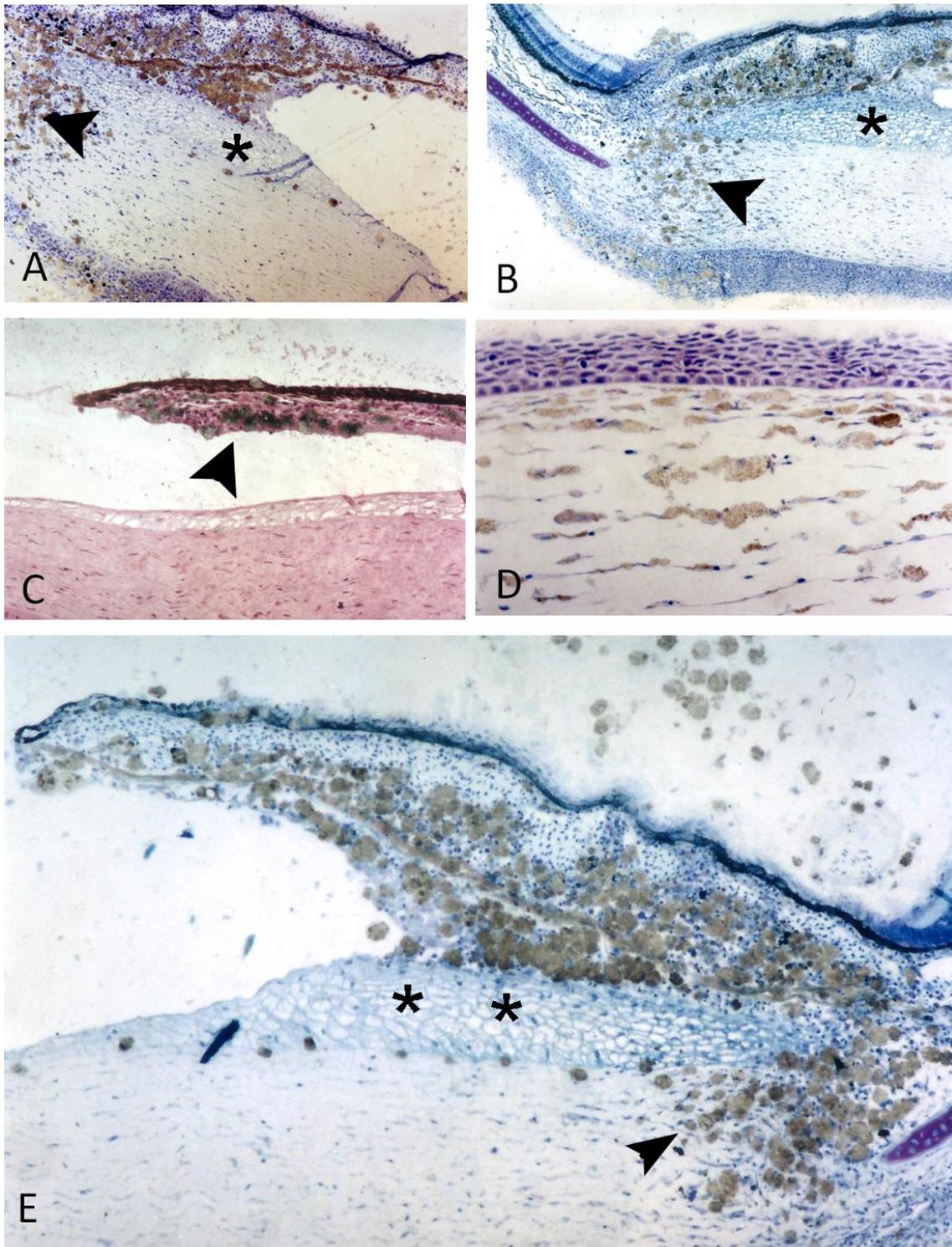


Figura 30. Drenagem no ângulo ventral de *Carassius auratus* padrão quatro dias após injeção de corante. (A) Região do ângulo de drenagem mostrando os canalículos córneo-esclerais repletos de corante (ponta de seta) e ligamento anular (asterisco) com cerca de três grumos de corante. Nota-se a malha trabecular ricamente preenchida por corante, assim como o estroma irídico. Aumento de 10x. **(B)** Mesmo que (A), outro animal. **(C)** Extremidade da íris: nota-se acúmulo de corante no estroma. Aumento de 20x. **(D)** Detalhe da região central da córnea. Em alguns animais foi observada a absorção de corante pelo estroma corneano. Aumento de 40x. **(E)** Ângulo ventral, aumento de 10x. Destacam-se o ligamento anular, livre de corante (asteriscos), e a íris, malha trabecular e canalículos (ponta de seta) preenchidos pelo corante. Lâminas A, B e E coradas com azul de toluidina; C e D, hematoxilina-eosina. Espessura de corte = 1 μ m.

Na variedade *demekin* também foi observada drenagem do corante pelas rotas irídica e trabecular sem a participação do ligamento anular (**Figura 31**, asteriscos). O nanquim foi encontrado na membrana limitante interna da retina (**Figura 31 D**, pontas de seta) e em abundância na íris e malha trabecular (**Figura 31 A, B e C**).

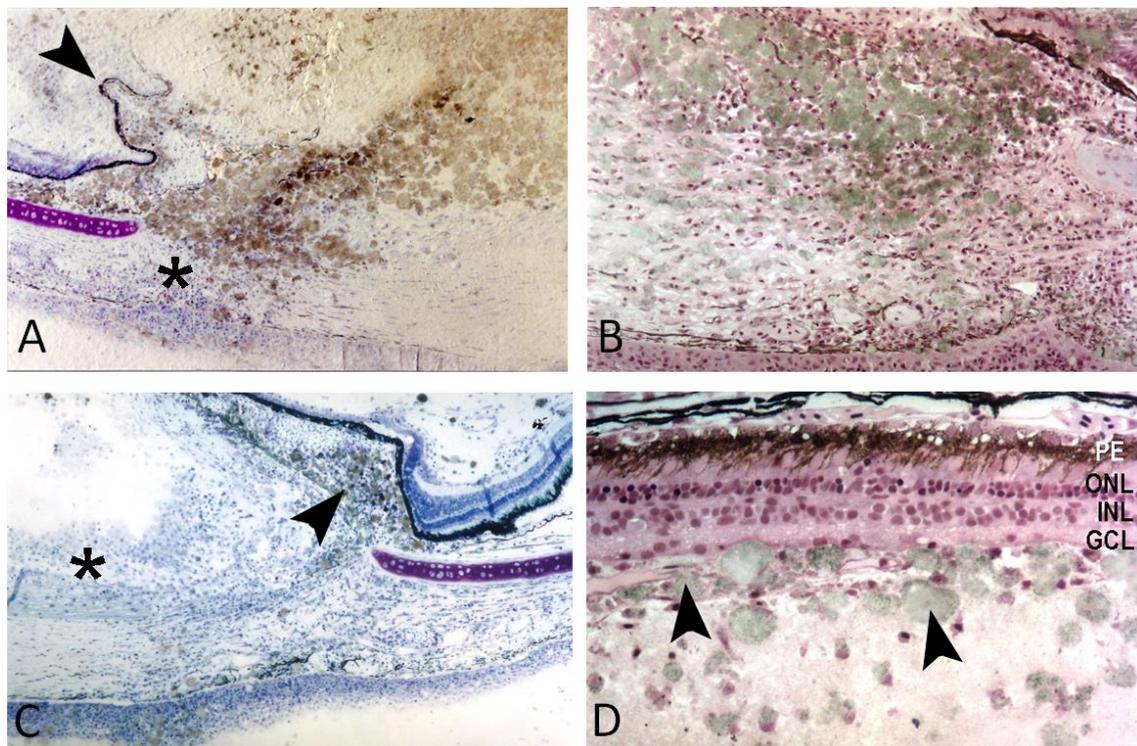


Figura 31. Drenagem em *Carassius auratus* variedade *demekin* após processamento em diferentes intervalos de tempo. (A) Ângulo de drenagem três dias pós-injeção, evidenciando o corante infiltrando-se pela malha trabecular e estroma irídico. O asterisco indica o ligamento anular, não infiltrado pelo corante. Durante o processo de fixação e inclusão do tecido, a íris (ponta de seta) teve sua estrutura comprometida, voltando-se para a região posterior. Aumento de 10x. (B) Malha trabecular preenchida de corante quatro dias pós-injeção. Aumento de 20x. (C) Ângulo de drenagem ventral sete dias pós-injeção. A ponta de seta indica o estroma irídico preenchido com uma quantidade pequena de corante e, mais uma vez, o ligamento anular encontra-se livre de corante (asterisco). Aumento de 10x. (D) Fatia retiniana quatro dias pós-injeção. Nota-se a presença de corante (pontas de seta) aglomerando-se bem próximo à camada de células ganglionares da retina delgada do *demekin*. Aumento de 20 x. PE: epitélio pigmentado; ONL: camada nuclear externa; INL: camada nuclear interna; GCL: camada de células ganglionares. e C coradas com azul de toluidina e B e D com hematoxilina-eosina. Espessura dos cortes = 1 μ m (Joselevitch & Smith, 1997).

5.4. Retina

Histologicamente, a retina do *demekin* apresenta densidade celular reduzida quando comparada à do peixe dourado padrão (**Figura 32**, painéis inferiores). Embora na emergência da parte visual da retina, correspondente à *ora serrata*, a estruturação e densidade celular das camadas de ambas as variedades de *Carassius auratus* não pareçam tão distintas (**Figura 32**, painéis superiores), nas áreas centrais há clara diminuição da celularidade de todas as camadas retínicas do *demekin* em comparação ao animal padrão. Esta queda na densidade celular apresenta-se de maneira mais marcante na camada nuclear interna, que no *demekin* parece quase inexistir. Possivelmente, há um decréscimo generalizado nas densidades celulares da retina do *demekin*, o que precisaria ser confirmado através de contagens celulares.

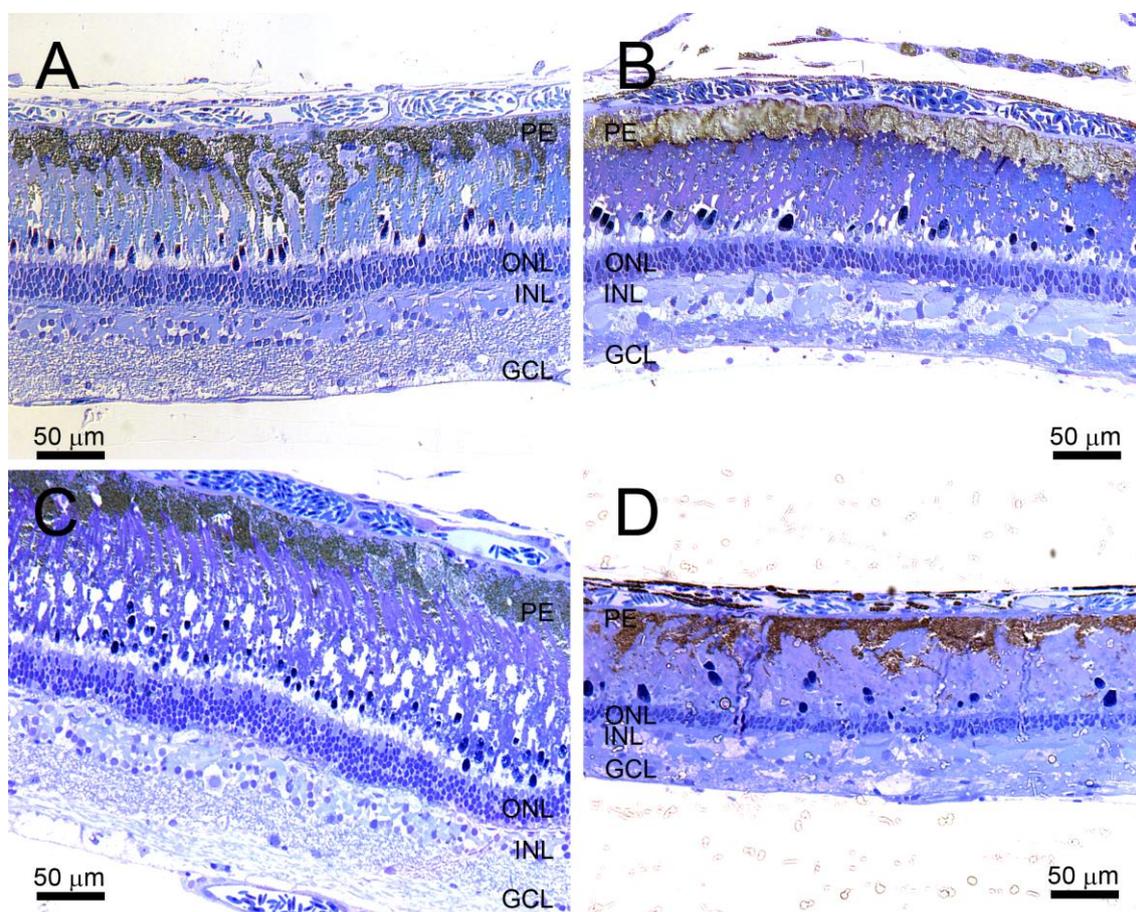


Figura 32. A retina no peixe dourado padrão e demekin. (A) Variedade padrão, *ora serrata*.. (B) Variedade *demekin*, *ora serrata*. (C) Variedade padrão, retina central. (D) Variedade *demekin*, retina central. PE: epitélio pigmentado; ONL: camada nuclear externa; INL: camada nuclear interna; GCL: camada de células ganglionares. Em todos os painéis, espessura de corte = 0.5 μm.

Mesmo na região da *ora serrata* pode-se perceber o adelgaçamento de ambas as camadas nucleares, bem como um número menor de segmentos internos e externos de fotorreceptores no *demekin*, principalmente cones, o que naturalmente implica em uma camada nuclear externa mais delgada. O *Carassius auratus* padrão apresenta cones duplos, simples curtos e simples longos, intercalados por diversos bastonetes (Stell & Harosi, 1976). Com a técnica utilizada, entretanto, não foi possível distinguir entre os diferentes tipos. Os segmentos externos de todos os fotorreceptores mesclam-se nas proximidades do epitélio pigmentar, sendo impossível sua distinção. Este arranjo está aparentemente preservado no *demekin*, embora a quantidade de fotorreceptores esteja sensivelmente diminuída.

Na camada nuclear externa visualizamos principalmente os núcleos de bastonetes e cones fortemente corados (**Figura 33, ONL**). Os processos destas células, bem como suas terminações sinápticas, não se coram com a coloração empregada para este estudo. Mais uma vez a densidade celular desta camada apresenta-se diminuída no caso do *demekin*, que apresenta aproximadamente de 1 a 3 fileiras de núcleos, enquanto o *Carassius auratus* padrão possui uma camada nuclear externa com cerca de 5 a 7 fileiras na região central da retina (**Figura 32 e Figura 33**).

A camada plexiforme externa apresenta-se relativamente estreita e sem grandes diferenças entre ambas as variedades de *Carassius auratus* (**Figura 32**). Como as colorações utilizadas não são adequadas para evidenciar as relações sinápticas contidas nesta camada, não tentamos diferenciá-las.

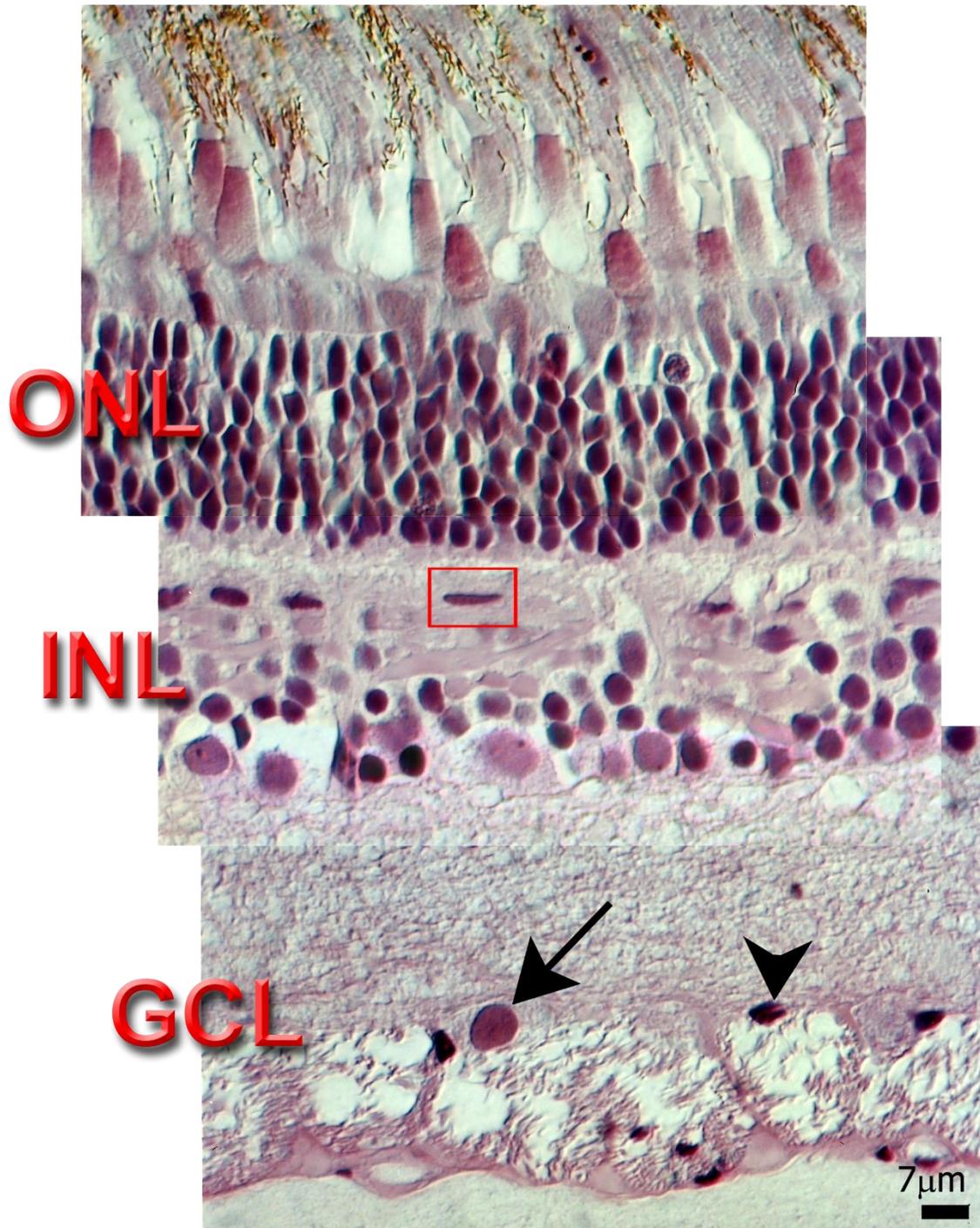


Figura 33. Fotomicrografia da retina de um peixe dourado padrão. Observam-se três camadas nucleares: *ONL*, camada nuclear externa; *INL*, camada nuclear interna; *GCL*, camada de células ganglionares. Na *INL* foi possível identificar um tipo de célula horizontal (no interior do retângulo) que se localiza na margem externa da *INL*, com núcleo alongado e fortemente corado. Na *GCL* destacam-se dois tipos de núcleos (indicadas pelas setas), um deles é grande e tem formato arredondado e o outro possui corpo celular pequeno e pouco citoplasma, com núcleo fortemente corado, possivelmente pertencentes a células ganglionares.

Os diferentes tipos morfológicos de células bipolares descritos na literatura para o *Carassius auratus* padrão não são observáveis com azul de toluidina (**Figura 32**). Distingue-se entretanto pelo menos dois tipos diferentes de corpos celulares nas regiões intermediária e interna da camada nuclear interna que podem possivelmente corresponder a células bipolares.

A camada plexiforme interna constitui a lâmina de contatos sinápticos mais espessa de ambas as retinas estudadas, e com exceção de alguns processos transversais de células amácrinas piriformes corados com azul de toluidina no peixe dourado padrão, e da diminuição marcante de espessura no *demekin*, nenhuma outra característica relevante foi observada.

Há dois tipos diferenciáveis na camada de células ganglionares (**Figura 33 GCL, setas**). Um deles, previamente descrito, encontra correspondentes na camada nuclear interna. O outro constitui-se de corpos celulares pequenos e arredondados, com pouco citoplasma e núcleo fortemente corado. Ambos estão presentes no *demekin*, mas há alterações não só a nível de densidade, mas também quanto à forma e padrão de coloração.

Embora histologicamente a retina das duas variedades de peixe dourado sejam significativamente diferentes (**Figura 32**), a ultraestrutura retiniana do *demekin* não apresenta alterações expressivas em relação ao *Carassius auratus* padrão. A **Figura 34 A** mostra os segmentos externos dos fotorreceptores do peixe dourado padrão, cones e bastonetes, orientados paralelamente e em aposição às células do epitélio pigmentar, que contêm grânulos de melanina. A **Figura 34 B** mostra a mesma região no *demekin*. Os segmentos externos estão em menor número e apresentam-se mais desorganizados. Entretanto, quando observamos a organização dos discos membranosos dos bastonetes do *demekin* em maior aumento (**Figura 34 C**), constatamos que estes apresentam-se aparelhados em camadas organizadas e com ultraestrutura normal.

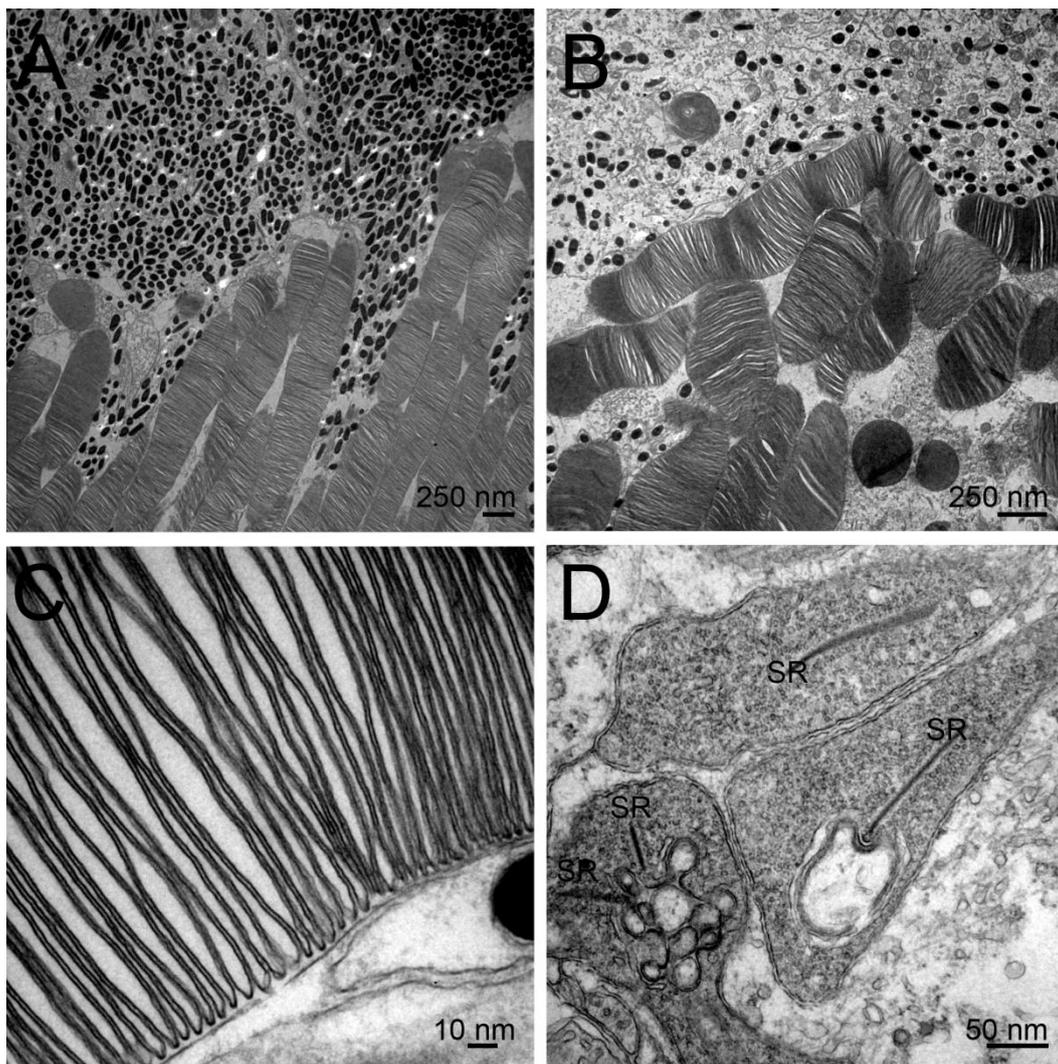


Figura 34. Ultraestrutura da retina externa do peixe dourado padrão e *demekin*. (A). Os segmentos externos dos fotorreceptores do peixe dourado padrão estão orientados paralelamente e em posição às células do epitélio pigmentar, que contém grânulos de melanina. (B) Os segmentos externos do *demekin* estão em menor número e apresentam-se mais desorganizados. O epitélio pigmentar apresenta menor número de grânulos de melanina. (C) Os discos membranosos dos segmentos externos dos bastonetes do *demekin* aparelham-se em camadas organizadas e com ultraestrutura normal. (D) As sinapses de cones (esquerda) e bastonetes (direita) do *demekin* apresentam aspecto semelhante às do peixe dourado padrão: os pedículos apresentam-se repletos de vesículas contendo glutamato, múltiplas fitas sinápticas (SR) e processos pós-sinápticos; as esférulas também estão repletas de vesículas sinápticas, e –apresentam fita sináptica única (SR) e menor número de processos pós-sinápticos.

Semelhantemente, as sinapses de cones (**Figura 34 D**, esquerda) e bastonetes (**Figura 34 D**, direita) do *demekin* na camada plexiforme externa apresentam aspecto semelhante às do peixe dourado padrão: os pedículos de cones apresentam-se repletos de vesículas contendo glutamato, múltiplas fitas sinápticas (SR) e processos pós-sinápticos, enquanto os pedículos de bastonetes, também repletos de vesículas

sinápticas, apresentam fita sináptica única (SR) e menor número de processos pós-sinápticos.

5.5. Bioquímica do humor vítreo

O resultado de uma das eletroforeses realizadas pode ser observado na **Figura 35**. Destaca-se no gel a diferença no padrão de bandas do humor vítreo da variedade *demekin* em relação ao da variedade padrão e do rato. Observam-se na variedade *demekin* bandas de maior peso molecular (bandas entre 50-75 e 150 KDa) não observadas nas demais amostras de vítreo analisadas. Em contrapartida, as bandas de menor peso molecular (10 a 37 KDa) apresentaram-se pouco marcadas no *demekin*, quando comparadas às do padrão e do rato. Os perfis proteicos observados para o vítreo do rato e do peixe padrão apresentaram maior semelhança, com a maioria de suas moléculas com baixo peso molecular; nota-se, entretanto que no perfil do rato as bandas de 20 kDa estão mais definidas que no peixe padrão.

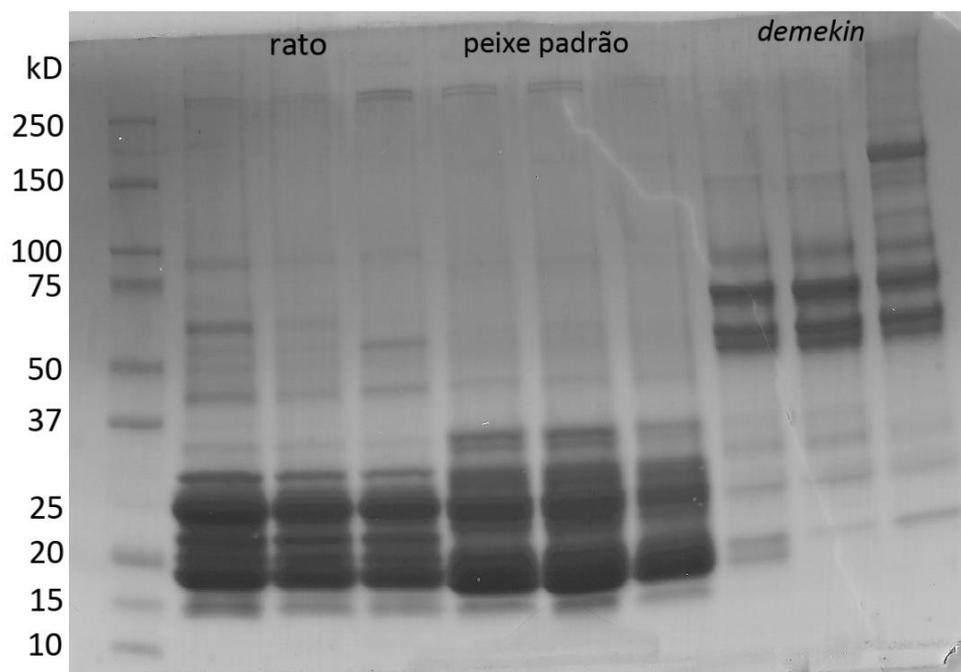


Figura 35. Eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando amostras de humor vítreo em triplicatas. Nota-se que há no humor vítreo do *demekin* moléculas de peso molecular maiores – entre 50 e 75 kDa; 150 kDa – que não estão presentes nas amostras de vítreo do peixe padrão e do rato.

6. Discussão

Este estudo se propôs a estudar comparativamente duas variedades de peixe dourado, a padrão e a *demekin*. Mais especificamente, foram investigadas a morfologia de suas estruturas oculares, a histologia da retina, a composição proteica do humor vítreo e a drenagem do humor aquoso. Foram encontradas algumas diferenças entre as duas variedades que constituem pontos de partida interessantes para diversos estudos subsequentes.

6.1. Alterações na pressão intraocular (PIO)

Apesar de não haver dispositivo voltado para aferir a pressão intraocular (PIO) em peixes, a tonometria invasiva que utilizamos neste estudo apresentou-se sensível para nossa finalidade: foi registrada PIO levemente, mas significativamente, mais elevada na variedade *demekin* em relação ao peixe padrão. Todavia, não podemos considerá-lo um método definitivo, visto que o equipamento não é calibrado para conversão em mmHg (unidade padrão nas medidas de PIO).

Há poucos estudos a respeito da PIO fisiológica em peixes. Yew et al. (1991) mensuraram a pressão intraocular através de tonometria de indentação (tonômetro de Schiotz) em duas variedades de peixe dourado - padrão e *demekin* - encontrando valores mais elevados no *demekin* (aproximadamente 29 mmHg) em olhos com 1 e 2 mL de volume. Já o animal padrão apresentou PIO mais elevada em olhos de 1 mL de volume (25 mmHg) e valores mais baixos para olhos de 2 mL de volume (aproximadamente 13 mmHg).

Link, Gray, Smith e John (2004) utilizaram um sistema de eletrofisiologia para medir a PIO em peixes paulistinha adultos, descrevendo um método sensível e confiável que apontou pressão mais elevada em uma linhagem mutante (*brass*) que apresentava fenótipo com pouca melanina. Interessantemente, os autores mostraram que a pressão intraocular no peixe paulistinha está dentro da faixa encontrada em mamíferos: 10,8 a 20,5 mmHg (média 16,5 mmHg), considerando as 6 linhagens estudadas. A PIO que registramos em mmH₂O é um dado qualitativo importante, mas seria pertinente testar outros meios para aferir a PIO em *Carassius auratus* para podermos compará-la com valores registrados em mamíferos, em mmHg.

6.2. Vias de drenagem do humor aquoso

A morfologia do ângulo de drenagem das duas variedades revelou diferenças, principalmente relacionadas ao crescimento ocular anormal do *demekin*; neste, há um adelgaçamento da córnea, esclera, corioide e retina quando comparado à variedade padrão. A íris também se mostrou mais fina e alongada, com intensa vascularização. Apesar disso, a drenagem do humor aquoso aparentemente ocorre de maneira normal em ambas as variedades de peixe dourado. Não foi encontrada malformação que limitasse ou impedisse o escoamento de fluidos, como acontece em casos de glaucoma congênito, por exemplo. Tanto no *demekin* quanto no peixe padrão, foram observadas duas vias principais de drenagem do humor aquoso: a via trabecular e a via irídica, com participação de vias secundárias, através de vasos epi-retinianos e canalículos na córnea. Com os experimentos realizados neste estudo, foi possível verificar que a drenagem nesta espécie é muito mais lenta e ligeiramente diferente do que em outros ciprinídeos, como o paulistinha, cuja drenagem se completa em dez minutos e primariamente pela malha trabecular ventral (Gray, Smith, Soules, John, & Link, 2009). De encontro com o que foi descoberto no paulistinha por Gray et al. (2009), a drenagem do humor aquoso no peixe dourado também ocorreu quase que exclusivamente através do polo ventral do olho, diferente do que encontramos em mamíferos, que apresentam drenagem ao longo de toda a circunferência limbal. Não foi observada a presença de corante no ligamento anular em todos os intervalos de tempo avaliados, indicando que este de fato não participa da drenagem dos fluidos intra-oculares, como observado no paulistinha por outros autores (Gray et al., 2009). A função desta estrutura permanece desconhecida.

Assim como Zadunaisky (1972), encontramos diferentes camadas celulares compondo o epitélio ciliar: há uma camada de células não pigmentadas voltadas para a câmara posterior, e uma camada celular pigmentada, voltada para a íris. Também se observam diferenças na aparência do epitélio dependendo de sua localização (ventral ou dorsal).

Nas duas variedades não detectamos a presença de estrutura semelhante ao corpo ciliar ou ao Canal de Schlemm de mamíferos.

Para dar continuidade a esse estudo é essencial aumentar o número de animais por experimento, pois nosso n foi muito baixo para poder generalizar os resultados para toda a população de peixes dourados.

6.3. Retina

A histologia retiniana nas duas variedades mostrou um resultado semelhante ao encontrado por Matsumura, Ohkuma & Honda (1981), Raymond et al. (1988) e Yew et al. (1991). Nestes três estudos foi observado a ocorrência de adelgaçamento da retina como um todo, com diminuição na densidade de fotorreceptores e de células da camada nuclear interna. Raymond et al. (1988) acrescenta que o epitélio pigmentado no *demekin* aparentava ser mais denso na variedade mutante quando observado em histologia convencional – o que foi observado também no presente trabalho - e o espaço subretiniano (entre as células do epitélio pigmentado e a camada nuclear externa) apresentava-se bem mais fino no *demekin*. No estudo de Yew et al. (1991) observou-se aglomerados de pigmento invadindo a camada de fotorreceptores e grandes espaços entre eles, com alguns detritos não identificados na retina do *demekin*. Em microscopia eletrônica, foram encontrados alguns macrófagos espalhados por todo o tecido retiniano, em especial nas camadas nucleares mais internas.

Há quatro tipos distintos de células horizontais na camada nuclear interna do peixe dourado comum (Stell, 1975; Stell, Lightfoot, Wheeler, & Leeper, 1975). Encontramos o primeiro na margem externa da camada nuclear interna (**Figura 33, seta na INL**), com seus núcleos alongados fortemente corados em relação ao citoplasma, e outro mais internamente, possuindo dimensões menores. Os processos dessas células estendem-se horizontalmente numa região mais central desta camada.

Ultraestruturalmente, nota-se que o epitélio pigmentar do *demekin* apresenta menor número de grânulos de melanina (**Figura 34 B**) do que o do peixe dourado padrão (**Figura 34 A**), o que não se percebe em histologia convencional (**Figura 32**). Como a retina do *demekin* sofre estiramento exagerado, esta menor densidade de pigmento pode ser consequência do aumento de volume das células do epitélio pigmentado, podendo ter consequências importantes para o sistema visual do animal, uma vez que a melanina contida nos grânulos pigmentares tem função fotoprotetora.

Na década de 80, Matsumura et al. (1981) estudaram uma outra variedade mutante de peixe dourado, o *celestial eye*. Este apresenta como características marcantes a ausência de nadadeira dorsal e os olhos buftálmicos que se expandem e rotacionam anterodorsalmente. Diferente do *demekin*, o *celestial eye* apresenta uma degeneração retiniana bastante agressiva e severa, variando bastante em gravidade de

animal para animal, independente de sua idade. A retina apresenta-se delgada, com fagócitos espalhados por todas as camadas retinianas, incluindo ao redor de vasos.

Continuando os estudos sobre esta variedade de peixe dourado, Matsumura et al. (1982) realizaram um estudo acompanhando o desenvolvimento do *celestial goldfish* e relataram que até os 90 dias de idade, quando os olhos começam a se tornar buftálmicos, a retina desta variedade é bastante semelhante ao que encontramos no *demekin*. Somente aos 120 dias, quando a rotação anterodorsal dos olhos está completa, ocorrem os piores danos ao tecido retiniano. Neste estado, o epitélio pigmentado perdeu grânulos de melanina em diversos pontos, sendo substituído por fagócitos, que são encontrados na camada nuclear interna e na corioide. Os fotorreceptores também mostram sinais de degeneração. Quando o animal atingiu 1 ano e meio de vida, observou-se uma queda no número de fagócitos na retina, entretanto, esta já destruída e passa a ser constituída por centenas de células da glia. Com estes achados, os autores sugerem que o *celestial goldfish* representa uma nova forma de degeneração retiniana hereditária em vertebrados.

6.4. Bioquímica do vítreo e crescimento ocular

Iniciamos os estudos bioquímicos para verificar possíveis diferenças no conteúdo proteico dos meios oculares das duas variedades estudadas que pudesse nos dar pistas a despeito do crescimento ocular exagerado no *demekin*.

A eletroforese que realizamos com amostras de humor vítreo revelou diferenças interessantes nos perfis proteicos exibidos no gel e nos permite afirmar que o humor vítreo do rato e do peixe padrão possui a maior parte de suas proteínas com peso molecular abaixo de 37 kDa; o *demekin*, por sua vez, apresentou a maioria de suas proteínas com peso acima de 50 kDa. Por ora, não é possível inferir com segurança quais proteínas foram separadas pela corrida eletroforética, uma vez que a massa molecular de uma proteína é uma característica extremamente variável. Modificações pós-traducionais (como glicosilação, acetilação, fosforilação ou clivagem) podem diminuir ou aumentar o peso de uma proteína (Domon & Aebersold, 2010). Faz-se necessário, portanto, a investigação da diferença evidenciada pela eletroforese através de outras técnicas bioquímicas, como o *western blotting* e a análise proteômica, que possibilitam a identificação de cada proteína em cada amostra avaliada.

A consistência e concentração proteica do humor vítreo de três variedades de peixe dourado foi estudada em 1989 por Seltner e colaboradores: nas variedades *Black Moor (demekin)* e *Celestial* a concentração proteica apresentou-se mais baixa quando comparada à variedade padrão, o que os autores interpretaram como uma diluição do vítreo devido ao crescimento ocular anormal da câmara vítrea que acontece nestes mutantes (Seltner et al., 1989).

Este estudo contribui para a literatura disponível sobre o *demekin* e mantém acesa a curiosidade a respeito deste peixe que representa um potencial modelo para estudar o processo de crescimento ocular anormal e possivelmente, a degeneração retiniana. Não há um modelo experimental ideal, mas o estudo do *demekin* pode ser uma adição importante aos modelos utilizados até o momento.

7. Conclusões

- Neste trabalho foram estudadas duas variedades de peixe dourado: a variedade padrão e a *demekin*, que apresenta crescimento ocular anormal, dotada de olhos buftálmicos. Apesar de serem animais da mesma espécie, foram encontradas algumas diferenças marcantes na histologia da retina, composição bioquímica do humor vítreo e pressão intraocular (PIO) da variedade mutante.
- Conforme observado na histologia da retina das duas variedades e conforme literatura disponível, o crescimento ocular exagerado resulta em estiramento retiniano no *demekin*, visto que sua retina se apresentou mais delgada e com menor densidade de células (não quantificada). Também foi verificada diferença no epitélio pigmentado do *demekin*, que observado ao microscópio eletrônico, mostrou-se com menos grânulos de melanina e também desorganização dos fotorreceptores. Faz-se necessário investigar se está ocorrendo morte celular concomitante ao estiramento do tecido ou uma insuficiência na geração de novas células conforme o olho cresce.
- O valor médio de PIO do *demekin* apresentou-se quase duas vezes mais elevado que no peixe padrão ($1,9 \pm 0,6$ mmH₂O, $n = 14$ olhos e para o *demekin*, $3,6 \pm 0,9$ mmH₂O, $n = 14$ olhos), variação significativa, conforme teste Teste T de Student bicaudal ($P = 7,43 \cdot 10^{-6}$). Não se sabe, porém se esse aumento de pressão exerce alguma influência no crescimento ocular e se há danos às demais estruturas do olho do *demekin*.
- Mesmo apresentando estruturas oculares de modo geral mais alongadas e delgadas, não foi detectada diferença na drenagem do humor aquoso no olho do *demekin* em comparação a variedade padrão:
 - O escoamento do humor aquoso ocorreu através do ângulo de drenagem ventral.
 - As principais rotas de drenagem identificadas foram as vias trabecular (principal) e vias irídica e vasos epirretinianos (secundárias).
- A análise do humor vítreo do *demekin* revelou proteínas de maior massa molecular do que no peixe padrão. Faz-se necessário investigar quais são estas proteínas e posteriormente, verificar se há alguma relação com o crescimento ocular

Referências

- Allen, W. S., Otterbein, E. C., & Wardi, A. H. (1977). Isolation and characterization of the sulfated glycosaminoglycans of the vitreous body. *Biochim.Biophys.Acta*, 498, 167-175.
- Asli, M., Mansoori, F., & Sattari, A. (2012). Histological study of the annular ligament in the rabbitfish eye (*Siganus sp.*). *Vet.Res.Forum*, 3, 287-289.
- Balazs, E. A., Laurent, T. C., Laurent, U. B., Deroche, M. H., & Bunney, D. M. (1959). Studies on the structure of the vitreous body. VIII. Comparative biochemistry. *Arch.Biochem.Biophys.*, 81, 464-479.
- Bankes, J. L., Perkins, E. S., Tsolakakis, S., & Wright, J. E. (1968). Bedford glaucoma survey. *Br.Med.J.*, 1, 791-796.
- Berman, E. R. & Michaelson, I. C. (1964). The Chemical Composition of the Human Vitreous Body as Related to Age and Myopia. *Exp.Eye Res.*, 3, 9-15.
- Bishop, P. N. (2000). Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel. *Progress in Retinal and Eye Research*, 19, 323-344.
- Bishop, P. N., Crossman, M. V., McLeod, D., & Ayad, S. (1994). Extraction and characterization of the tissue forms of collagen types II and IX from bovine vitreous. *Biochem.J.*, 299 (Pt 2), 497-505.
- Bittencourt, F., Souza, B. E., Boscolo, W. R., Rorato, R. R., Feiden, A., & Neu, D. H. (2012). Benzocaína e eugenol como anestésicos para o quinguio (*Carassius auratus*). *Arq Bras Med Vet Zootec*, 64, 1597-1602.
- Bu, S. C., Kuijer, R., Van der Worp, R. J., Li, X. R., Hooymans, J. M., & Los, L. I. (2015). The Ultrastructural Localization of Type II, IV, and VI Collagens at the Vitreoretinal Interface. *PLoS ONE*, 10, e0134325.
- Burnside, B. & Nagle, B. (1983). Chapter 3 Retinomotor movements of photoreceptors and retinal pigment epithelium: Mechanisms and regulation. *Progress in Retinal Research*, 2, 67-109.
- Cole, D. F. (1973). Intraocular fluid composition in the coelacanth, *Latimeria chalumnae*. *Exp.Eye Res.*, 16, 389-395.
- Collin, H. B. & Collin, S. P. (1996). The fine structure of the cornea of the salamanderfish, *Lepidogalaxias salamandroides* (Lepidogalaxiidae, Teleostei). *Cornea*, 15, 414-426.
- Coulombre, A. J. (1956). The role of intraocular pressure in the development of the chick eye. II. Control of eye size. *The Journal of Experimental Zoology*, 133, 211-225.
- Domon, B. & Aebersold, R. (2010). Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. *Nat.Biotechnol.*, 28, 710-721.
- Easter, S. S. & Hitchcock, P. F. (1986). The myopic eye of the Black Moor goldfish. *Vision research*, 26, 1831-1833.
- Easter, S. S., Johns, P. R., & Braumann, L. R. (1977). Growth of the adult goldfish eye-I: Optics. *Vision Res*, 17, 469-477.

- Fatt, I. (1977). *Hydraulic flow conductivity of the vitreous gel* (Rep. No. 6). *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*: ARVO.
- Foulds, W. S. (1987). Is your vitreous really necessary? The role of the vitreous in the eye with particular reference to retinal attachment, detachment and the mode of action of vitreous substitutes. *Eye (Lond)*, 1 (Pt 6), 641-664.
- Francois, J., Rabaey, M., & Evens, L. (1958). Agar microelectrophoresis of the aqueous humor. *AMA.Arch.Ophthalmol.*, 59, 692-702.
- Fuerst, P. G., Rauch, S. M., & Burgess, R. W. (2007). Defects in eye development in transgenic mice overexpressing the heparan sulfate proteoglycan agrin. *Dev.Biol.*, 303, 165-180.
- Gelatt, K. N. (1991). *Veterinary Ophthalmology*. (2 ed.) Lea & Febiger.
- Glasser, A. & Campbell, M. C. (1998). Presbyopia and the optical changes in the human crystalline lens with age. *Vision Res.*, 38, 209-229.
- Goes, R. M., Nader, H. B., Porcionatto, M. A., Haddad, A., & Laicine, E. M. (2005). Chondroitin sulfate proteoglycans are structural renewable constituents of the rabbit vitreous body. *Curr.Eye Res.*, 30, 405-413.
- Grabner, G., Boltz, G., & Forster, O. (1980). Macrophage-like properties of human hyalocytes. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, 19, 333-340.
- Gray, M. P., Smith, R. S., Soules, K., John, S. W. M., & Link, B. (2009). The aqueous humor outflow pathway of zebrafish. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 50, 1515-1521.
- Hoffert, J. R. & Fromm, P. O. (1969). Glycosaminoglycans in the vitreous and aqueous humors of the teleost. *Comp Biochem.Physiol*, 30, 771-777.
- Jacobson, B., Dorfman, T., Basu, P. K., & Hasany, S. M. (1985). Inhibition of vascular endothelial cell growth and trypsin activity by vitreous. *Exp.Eye Res.*, 41, 581-595.
- Joselevitch, C. & Smith, R. (1997). Study of the aqueous humor outflow in standard and Black Moor goldfish (*Carassius auratus*). *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 38, 544.
- Ref Type: Abstract
- Kamei, A. & Totani, A. (1982). Isolation and characterization of minor glycosaminoglycans in the rabbit vitreous body. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 109, 881-887.
- Kroger, R. H. & Fernald, R. D. (1994). Regulation of eye growth in the African cichlid fish *Haplochromis burtoni*. *Vision Res.*, 34, 1807-1814.
- Larsen, J. S. (1971). The sagittal growth of the eye. IV. Ultrasonic measurement of the axial length of the eye from birth to puberty. *Acta Ophthalmol.(Copenh)*, 49, 873-886.
- Lazarus, H. S. & Hageman, G. S. (1994). In situ characterization of the human hyalocyte. *Arch.Ophthalmol.*, 112, 1356-1362.
- Le Goff, M. M. & Bishop, P. N. (2008). Adult vitreous structure and postnatal changes. *Eye (Lond)*, 22, 1214-1222.
- Levin, L., Nilsson, S., Ver Hoeve, J., Wu, S., Kaufman, P., & Alm, A. (2011). *Adler's Physiology of the Eye*. (11 ed.) Elsevier.

- Link, B., Gray, M. P., Smith, R. S., & John, S. W. M. (2004). Intraocular pressure in zebrafish: Comparison of inbred strains and identification of a reduced melanin mutant with raised IOP. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *45*, 4415-4422.
- Matsumura, M., Ohkuma, M., & Honda, Y. (1981). Electron microscopic studies on celestial goldfish retina-a possible new type of retinal degeneration in experimental animals. *Exp.Eye Res.*, *32*, 649-656.
- Matsumura, M., Ohkuma, M., & Honda, Y. (1982). Retinal degeneration in celestial goldfish. Developmental study. *Ophthalmic Res.*, *14*, 344-353.
- Murthy, K. R., Goel, R., Subbannayya, Y., Jacob, H. K., Murthy, P. R., Manda, S. S. et al. (2014). Proteomic analysis of human vitreous humor. *Clin.Proteomics.*, *11*, 29.
- Newsome, D. A., Linsenmayer, T. F., & Trelstad, R. L. (1976). Vitreous body collagen. Evidence for a dual origin from the neural retina and hyalocytes. *J.Cell Biol.*, *71*, 59-67.
- Panova, I. G., Sharova, N. P., Dmitrieva, S. B., Levin, P. P., & Tatikolov, A. S. (2008). Characterization of the composition of the aqueous humor and the vitreous body of the eye of the frog *Rana temporaria* L. *Comp Biochem.Physiol A Mol.Integr.Physiol*, *151*, 676-681.
- Raymond, P. A., Hitchcock, P. F., & Palopoli, M. F. (1988). Neuronal cell proliferation and ocular enlargement in Black Moor goldfish. *J.Comp Neurol.*, *276*, 231-238.
- Reddy, P. K. & Lam, J. (1992). Effect of thyroid hormones on morphogenesis and growth of larvae and fry of telescopic-eye black goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture*, *107*, 383-394.
- Richer, S. P. & Rose, R. C. (1998). Water soluble antioxidants in mammalian aqueous humor: interaction with UV B and hydrogen peroxide. *Vision Res.*, *38*, 2881-2888.
- Sebag, J. (2005). Molecular biology of pharmacologic vitreolysis. *Trans.Am.Ophthalmol.Soc.*, *103*, 473-494.
- Seltner, R. L., Weerheim, J. A., & Sivak, J. G. (1989). Role of the lens and vitreous humor in the refractive properties of the eyes of three strains of goldfish. *Vision Res.*, *29*, 681-685.
- Skeie, J. M., Roybal, C. N., & Mahajan, V. B. (2015). Proteomic insight into the molecular function of the vitreous. *PLoS ONE*, *10*, e0127567.
- Soules, K. A. & Link, B. A. (2005). Morphogenesis of the anterior segment in the zebrafish eye. *Bmc Developmental Biology*, *5*.
- Stell, W. K. (1975). Horizontal cell axons and axon terminals in goldfish retina. *J.Comp Neurol.*, *159*, 503-520.
- Stell, W. K. & Harosi, F. I. (1976). Cone structure and visual pigment content in the retina of the goldfish. *Vision Res.*, *16*, 647-657.
- Stell, W. K., Lightfoot, D. O., Wheeler, T. G., & Leeper, H. F. (1975). Goldfish retina: functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses. *Science*, *190*, 989-990.
- Stenkamp, D. L. (2007). Neurogenesis in the fish retina. *Int.Rev.Cytol.*, *259*, 173-224.

- Thierauf, A., Musshoff, F., & Madea, B. (2009). Post-mortem biochemical investigations of vitreous humor. *Forensic Sci.Int.*, 192, 78-82.
- Tsen, G., Halfter, W., Kroger, S., & Cole, G. J. (1995). Agrin is a heparan sulfate proteoglycan. *J.Biol.Chem.*, 270, 3392-3399.
- Von, S. L. & Moore, D. H. (1948). Electrophoretic patterns of concentrated aqueous humor of rabbit, cattle and horse. *Arch.Ophthalm.*, 40, 279-284.
- Wallman, J. & Winawer, J. (2004). Homeostasis of eye growth and the question of myopia. *Neuron*, 43, 447-468.
- Walls, G. L. (1942). *The vertebrate eye and its adaptive radiation*. New York: Hafner Publishing Company.
- Warrant, E. J. & Locket, N. A. (2004). Vision in the deep sea. *Biol.Rev.Camb.Philos.Soc.*, 79, 671-712.
- Weinreb, R. N., Leung, C. K., Crowston, J. G., Medeiros, F. A., Friedman, D. S., Wiggs, J. L. et al. (2016). Primary open-angle glaucoma. *Nat.Rev.Dis.Primers.*, 2, 16067.
- Winkler, M., Shoa, G., Tran, S. T., Xie, Y., Thomasy, S., Raghunathan, V. K. et al. (2015). A Comparative Study of Vertebrate Corneal Structure: The Evolution of a Refractive Lens. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, 56, 2764-2772.
- Wojciechowski, R. & Hysi, P. G. (2013). Focusing in on the complex genetics of myopia. *PLoS.Genet.*, 9, e1003442.
- Yew, D., Li, W. W. Y., Au, C., Choi, H. L., Yang, Q. D., & Chan, P. K. H. (1991). Retinal Changes in A Mutant Form of Goldfish with Megalophthalmia. *Scanning Microscopy*, 5, 585-594.
- Zadunaisky, J. A. (1972). The electrolyte content, osmolarity and site of secretion of the aqueous humor in two teleost fishes (*Carassius auratus* and *Diplodus sargus*). *Exp.Eye Res.*, 14, 99-110.

Trabalhos resultantes deste estudo

Goto, A. Y.; Joselevitch, C. Estudo do sistema de drenagem do humor aquoso do peixe dourado (*Carassius auratus*) variedades padrão e *demekin*. Painele, XXXI Reunião anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Foz do Iguaçu, 2016.

Goto, A. Y.; Joselevitch, C. Study of the aqueous humor drainage system in standard and Black Moor goldfish (*Carassius auratus*). Apresentação Oral, Simpósio BRAVO (Evento Pré-FeSBE), Foz do Iguaçu, 2016.

Goto, A. Y.; Joselevitch, C. Estudo da produção, composição e drenagem dos meios oculares de *Carassius auratus* (Cyprinidae) variedades padrão e *demekin*. Apresentação Oral, Simpósio BRAVO (Evento Pré-FeSBE), São Paulo, 2015.

Premiação

Goto, A. Y.; Joselevitch, C. Study of the aqueous humor drainage system in standard and Black Moor goldfish (*Carassius auratus*). Prêmio de Melhor Apresentação Oral do Simpósio BRAVO (Evento Pré-FeSBE), Foz do Iguaçu, 2016.

componente	humanos	outros primatas	caninos	felinos	equinos	bovinos	ovinos	lagomorfos	roedores	aves	anfíbios	peixes
colágeno tipo II	x					x						
colágeno tipo IV	x											
colágeno tipo IX	x					x						
colágeno tipo V	x											
colágeno tipo VI	x											
colágeno tipo XI	x											
condroitina-4-sulfato						x		x				
creatinina	x											
crystalinas	x											
dermcidina	x											
domínio da lectina tipo C/3B	x											
elafina	x											
enolase	x											
IGFBP7	x											
fibrilina 1	x											
fibrinogênio A	x											
fibrinogênio B	x											
fibrinogênio G	x											
filagrina	x											
fosfodiesterase 6	x											
frutose-bifosfato	x											
hexosamina	x					x	x	x	x	x	x	x
hidroxiprolina						x	x	x	x	x	x	

componente	humanos	outros primatas	caninos	felinos	equinos	bovinos	ovinos	lagomorfos	roedores	aves	anfíbios	peixes
ácido hialurônico-like	x											
rodopsina	x											
sparc	x											
sulfato de heparana	x					x		x		x		
TIMP inibidor de metalopeptidase 2	x											
tirosina											x	
transferrina	x											
transtiretina	x											
triptofano											x	
trombina (fator II)	x											
ureia	x			x	x	x		x				x
versicano	x											
vimentina	x											
vitrosina										x		

Quadro 1. Principais componentes do vítreo de diversos grupos vertebrados.

Fontes: (1) ser humano: (Berman & Michaelson, 1964; Bishop, Crossman, McLeod, & Ayad, 1994; Sebag, 2005; Le Goff & Bishop, 2008; Thierauf, Musshoff, & Madea, 2009; Murthy et al., 2014; Bu et al., 2015; Skeie, Roybal, & Mahajan, 2015); (2) primatas: (Gelatt, 1991); (3) caninos: (Gelatt, 1991); (4) felinos: (Gelatt, 1991); (5) equinos: (Gelatt, 1991); (6) bovinos: (Balazs, Laurent, Laurent, Deroche, & Bunney, 1959; Allen, Otterbein, & Wardi, 1977; Gelatt, 1991; Bishop et al., 1994); (7) ovinos: (Balazs et al., 1959); (8) lagomorfos: (Balazs et al., 1959; Kamei & Totani, 1982; Gelatt, 1991; Goes, Nader, Porcionatto, Haddad, & Laicine, 2005); (9) roedores: (Balazs et al., 1959; Fuerst, Rauch, & Burgess, 2007); (10) aves: (Balazs et al., 1959; Newsome, Linsenmayer, & Trelstad, 1976; Tsen, Halfter, Kroger, & Cole, 1995); (11) anfíbios: (Balazs et al., 1959; Panova, Sharova, Dmitrieva, Levin, & Tatikolov, 2008); (12) peixes: (Hoffert & Fromm, 1969; Cole, 1973).

B – Quadro 2. Componentes do humor aquoso de diversos grupos vertebrados.

componente	humanos	outros primatas	caninos	felinos	equinos	bovinos	ovinos	roedores	lagomorfos	aves	anfíbios	peixes
ácido ascórbico	x	x	x	x		x		x	x		x	
ácido hexurônico						x	x		x	x		x
ácido hialurônico						x						x
ácido láctico		x							x			x
ácido siálico							x		x	x		
ácido úrico	x					x		x	x		x	
albumina											x	
bicarbonato		x	x	x	x	x			x			
Ca ²⁺		x	x	x	x				x			x
Cl ⁻		x	x		x				x			x
colágeno tipo I											x	
fosfato		x	x	x	x				x			
glicose		x	x	x	x	x						
glutathiona	x					x		x	x			
hexosamina						x	x		x	x		x
K ⁺		x	x	x	x	x			x			x
L-cisteína	x					x		x	x			
Mg ²⁺												x
Nitrogênio							x		x	x		
Na ⁺		x	x	x	x	x			x			x
tirosina	x					x		x	x		x	

triptofano												x	
ureia		x	x	x						x			x

Quadro 2 (página anterior). Principais componentes do humor aquoso de diversos grupos vertebrados.

Fontes: (1) ser humano: (Von & Moore, 1948; Francois, Rabaey, & Evens, 1958; Richer & Rose, 1998); (2) primatas: (Gelatt, 1991); (3) caninos: (Gelatt, 1991); (4) felinos: (Gelatt, 1991); (5) equinos: (Gelatt, 1991); (6) bovinos: (Balazs et al., 1959; Gelatt, 1991; Richer & Rose, 1998); (7) ovinos: (Balazs et al., 1959); (8) roedores: (Richer & Rose, 1998); (9) lagomorfos: (Balazs et al., 1959; Gelatt, 1991; Richer & Rose, 1998); (10) aves: (Balazs et al., 1959); (11) anfíbios: (Panova et al., 2008); (12) peixes: (Hoffert & Fromm, 1969; Zadunaisky, 1972; Cole, 1973).

ANEXOS

ANEXO A – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEPA IPUSP): “Visão e comunicação celular na retina: o papel das células bipolares de entrada mista”.



COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS

Instituto de Psicologia
USP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto registrado sob o número 011.2010, para uso de animais em experimentação, intitulado “Visão e Comunicação Celular na Retina: O papel das Células Bipolares de Entrada Mista” sob a Coordenação da Profa. Dra. Christina Joselevitch, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animal (CEPA) do Instituto de Psicologia, em reunião de 29 de novembro de 2010. Certificamos ainda que foi aprovada a inclusão dos pesquisadores Aline Yoshie Goto, Diego Vinícius Lopes Decleva e Luiz Claudio Portinoi Baran ao referido Projeto em reunião de 10 de novembro de 2014.

We hereby certify that the Project “Vision and Cellular Communication in the Retina: The Role os Mixed-Input Bipolar Cells”, number 011.2010, submitted by Prof. Christina Joselevitch, was approved by the Committee on Ethical Research on Animals (CEPA) of Institute of Psychology from Universidade de São Paulo. We also certify that the Aline Yoshie Goto, Diego Vinícius Lopes Decleva and Luiz Claudio Portinoi Baran were included to this Project.

São Paulo, 19 de junho de 2015.

Profa. Dra. Maria Helena Leite Hunziker
Presidente da CEPA

Arlete A. Mendes de Almeida
Secretária da CEPA

ANEXO B – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEPA IPUSP): Inclusão de Aline Yoshie Goto no projeto.



COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS

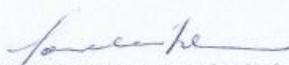
**Instituto de Psicologia
USP**

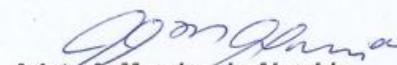
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto registrado sob o número 003.2014, para uso de animais em experimentação, intitulado “Estudo da produção, composição e drenagem dos meios oculares do peixe dourado (*Carassius auratus*)” sob a Coordenação da Profa. Dra. Christina Joselevitch, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animal (CEPA) do Instituto de Psicologia, em reunião de 14 de fevereiro de 2014. Certificamos ainda que foi aprovada a inclusão da pesquisadora Aline Yoshie Goto ao referido Projeto em 05 de novembro de 2015.

We hereby certify that the Project number 003.2014 called “Study of the production, composition and outflow of the ocular media of the goldfish (*Carassius auratus*)” and coordinated by Prof. Christina Joselevitch was approved by the Committee on Ethical Research with Animals (CEPA) of the Psychology Institute from Universidade de São Paulo. We also certify that researcher Aline Yoshie Goto was included in this Project as of November 05th, 2015.

São Paulo, 05 de novembro de 2015.


Profa. Dra. Christina Joselevitch
Presidente da CEPA


Arlete A. Mendes de Almeida
Secretária da CEPA

ANEXO C – Renovação do certificado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA): "Estudo da produção, composição e drenagem dos meios oculares de *Carassius auratus* (Cyprinidae) variedades padrão e *demekin*."



INSTITUTO DE PSICOLOGIA

www.ip.usp.br

Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da produção, composição e drenagem dos meios oculares de *Carassius auratus* (Cyprinidae) variedades padrão e "demekin", protocolada sob o CEUA nº 4926170916, sob a responsabilidade de **Christina Joselevitch e equipe; Aline Yoshie Goto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (CEUA/IPUSP) na reunião de 21/09/2016.

We certify that the proposal "Study of the production, composition and outflow of intraocular media in standard and Black Moor goldfish (*Carassius auratus*)", utilizing 43 Fishes (males and females), protocol number CEUA 4926170916, under the responsibility of **Christina Joselevitch and team; Aline Yoshie Goto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Psychology Institute - São Paulo University (CEUA/IPUSP) in the meeting of 09/21/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [09/2016](#) a [08/2017](#) Área: [Psicologia Experimental](#)

Origem: [Animais provenientes de estabelecimentos comerciais](#)

Espécie: [Peixes](#) sexo: [Machos e Fêmeas](#) idade: [1 a 6 meses](#) N: [43](#)

Linhagem: [Peixe dourado Comum e Demekin](#) Peso: [15 a 50 g](#)

Resumo: O peixe dourado é considerado um bom modelo experimental para pesquisas sobre a visão porque apresenta uma condição intermediária entre os peixes com sistema visual pouco desenvolvido e aqueles cuja visão constitui o sentido dominante. A produção, composição e escoamento dos meios oculares nesta espécie, fundamentais para a formação de imagem sobre a retina, são, entretanto pouco conhecidos. O presente projeto tem por finalidade estudar o sistema de drenagem do humor aquoso e a composição dos humores aquoso e vítreo no peixe dourado. Para tanto, técnicas histológicas, de bioquímica e biologia molecular serão empregadas. Inicialmente, a região de produção e drenagem do humor aquoso será avaliada através de microscopia óptica de luz e microscopia eletrônica. A pressão intraocular será avaliada através de tonometria. A drenagem dos fluidos intraoculares será estudada através da injeção intraocular de agentes corantes e posterior processamento histológico em intervalos fixos pós-injeção (15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 4 h, 12 h, 24 h e 36 h) e sua composição através de estudos envolvendo eletroforese e imunoblotting, para determinação dos seus componentes individuais e comparação com os encontrados no ser humano.

Local do experimento: Laboratório de Psicologia Sensorial do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

São Paulo, 21 de setembro de 2016

Profa. Dra. Christina Joselevitch
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Miriam Garcia Mijares
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo