

LUCÉLIA DONATTI



MORFOLOGIA DA RETINA DO PEIXE *METYNNIS ROOSEVELTI* EIGENMANN, 1915 E AS ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS CAUSADAS PELA EXPOSIÇÃO À LUZ MONOCROMÁTICA VERMELHA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Morfologia do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas — área de concentração em Biologia Celular

CURITIBA
1995

LUCÉLIA DONATTI

MORFOLOGIA DA RETINA DO PEIXE *METYNNIS ROOSEVELTI* EIGENMANN, 1915 E AS ALTERAÇÕES CITOLOGICAS CAUSADAS PELA EXPOSIÇÃO À LUZ MONOCROMÁTICA VERMELHA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Morfologia do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas — área de concentração em Biologia Celular

ORIENTADORA

Doutora Edith Susana Elisabeth Fanta
Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

CURITIBA
1995

" A preocupação com o Homem e com seu destino
deve constituir a motivação principal
de todos os esforços tecnológicos;
Jamais esqueçam isto, em meio a seus diagramas e equações.
A mais bela e mais profunda emoção
que podemos experimentar
é o sentido do mistério.
É aí que se encontra a semente
de toda arte e de toda verdadeira ciência. "

Albert Einstein

Agradecimentos

Como agradecer a todos e a cada um, quando tantos contribuíram para que velejasse segura, até aportar a nau neste momento culminante de uma etapa decisiva, mas que pretendo seja apenas mais um degrau, na escada que me conduz a um conhecimento sempre mais amplo?

Só posso concluir que tive a honra e o prazer de conviver com verdadeiros cientistas, norteados pela bússola indicada por Albert Einstein: a preocupação com o homem e seu destino é que deve constituir a motivação principal da ciência. Certamente por isso sempre pude admirar o desprendimento de meus mestres, dispostos a partilhar o que com tanto esforço acumularam ao longo de suas vidas, na convicção de que a ciência se constrói com o acréscimo de cada pequeno avanço sobre o acervo já consolidado.

Fazer ciência, sem a preocupação com o homem e seu destino, é algo impensável para quem teve o privilégio de compartilhar dos ensinamentos daqueles que não sabemos se devemos qualificá-los mais como mestres do que amigos, ou como amigos do que mestres. Como amigos, guardaremos seus nomes debaixo de sete chaves, dentro do coração, como afirma na canção, Milton Nascimento; porque, de fato, foram verdadeiros amigos. Dos meus mestres posso dizer, como Antoine de Saint-Exupéry:

" Amigo é aquele que abre
a porta ao peregrino,
às suas muletas, ao seu bastão
colocado em um canto
e não lhe pede para dançar,
a fim de poder avaliar sua dança.
E se o peregrino fala da primavera que chega,
o amigo é aquele que acolhe em si essa primavera.
E se lhe fala do horror da carestia
no vilarejo do qual provém,
o amigo sofre com ele a fome.
Porque o amigo é a parte destinada a você,

é quem abre para você uma porta que, talvez,
jamais abriria para um outro. "

Por isso,

Obrigada à Prof^ª. Dra. Edith Susana Elisabeth Fanta, orientadora de meu trabalho, cuja extraordinária competência nunca lhe diminuiu a compreensão para com as dificuldades da mestranda. Sempre aliou à severidade necessária para o trato científico a dedicação de uma idealista, que consegue ver no principiante a capacidade para encontrar seus próprios caminhos, sua maneira de pensar, seu estilo de escrever. Essa liberdade consentida ajuda a edificar a autoconfiança porque permite que se aprenda, que se experimente, que se faça a partir da própria capacidade, mas sempre como vigia amiga de quem não sai de perto, sempre dando sugestões, conselhos e, de forma sutil, induzindo o mestrando a que formule suas próprias conclusões. É, enfim, quem não dá o peixe... mas ensina a pescar.

Obrigada à Prof^ª Dra. Maria Célia Jamur, que através de suas aulas foi abrindo sendas de forma a me permitir aprofundamento na seara da pesquisa. Como o sal da terra, quero lhe garantir que o grão de mostarda se converterá na árvore que poderá dar bons frutos.

Obrigada, aos Profs. Áurea Negri e Ivo João Kummer, por me ensinarem os primeiros passos em Biologia. Vocês serviram como primeiro degrau em minha escada, ao qual se acrescentaram os demais, na graduação e mestrado, possibilitando minha formação pessoal e profissional.

Agradeço à Prof^ª. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas e ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Smith, da Faculdade Paulista de Medicina pelo material fornecido, pela atenção dedicada, pelo intercâmbio de informações, evidenciando, enfim, quão enriquecedora é a troca de informações e cooperação entre diferentes instituições para a evolução da ciência e o desenvolvimento científico-tecnológico do nosso País.

Obrigada à Prof^a. Odete Serraglio, uma amiga que caminha pela vida lutando por aquilo em que acredita, semeando novas idéias, colocando a sua semente na Terra através das suas aulas e não se preocupando com a colheita, pois sabe que nada será em vão.

Obrigada aos muitos amigos, que serviram de interlocutores nesta caminhada em busca do saber. Por isso,

Quero agradecer a Ana Aparecida Meyer pelas horas do cafezinho, pelos almoços comunitários, pelas discussões biológicas, pelas conversas alegres na cantina, pelos conselhos nessa tese; enfim, pela companhia em todas as horas.

Obrigada a Ana Cristina Vianna e a Silvia Zanetti da Cruz pela assistência técnica e, mais do que isso, pela amizade e carinho que tornaram amenos os momentos difíceis da aprendizagem experimental.

A Sonia Regina Grötzner posso dizer, como Antoine de Saint-Exupéry: " Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas. " Obrigada pela dedicação e companheirismo nos momentos difíceis e pela amizade e carinho nos momentos alegres e descontraídos. De alguma maneira você sabe que esta tese também é sua.

Obrigada a Sandra Freiberger, Flávia Sant'Anna, Ana Tereza Guimarães e Nilce Mary Turcatti pela alegria, conforto, conselhos, fraternidade, paz. Valeu !

Obrigada a Isabel Nascimento pelo bom humor em todas as horas e estímulo à minha carreira profissional.

Especificamente em relação ao meu trabalho, outros agradecimentos devo manifestar.

Obrigada à Universidade Federal do Paraná que, apesar das dificuldades de ordem financeira pelas quais transita, consequência da falta de apoio governamental para a educação, viabilizou a assistência técnica, os professores, enfim, demonstrou o que é possível concretizar quando há um clima de cooperação entre as pessoas.

Agradeço à Universidade Estadual do Centro - Oeste e a Carlos Eduardo Stange,

pelo incentivo e condições práticas para que eu pudesse realizar o mestrado.

Obrigada a Telma Stresser de Assis e Izabella Elias Fernandes, bibliotecárias da Universidade Federal do Paraná, pela revisão bibliográfica segundo a Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT).

Obrigada a Lucia Helena Woiski Franco pela revisão ortográfica e gramatical deste trabalho.

Agradeço à CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - pela concessão de bolsa de estudo para a realização deste trabalho.

" Obrigada ", é dizer pouco para meus familiares. Mas que outra palavra posso empregar? Como traduzir aquele sentimento de solidariedade que impera em minha família? O meu refúgio nas horas difíceis, a minha alegria nas conquistas, o meu orgulho por serem como são? Junto a eles restauro as forças da minha alma e encontro solidariedade e estímulo para prosseguir o meu caminho tendo a certeza de que nunca estarei sozinha. O meu amor e gratidão para cada um dos meus irmãos e meus pais.

Um último agradecimento a todos que colaboraram para que este trabalho fosse concretizado. Que Deus os bendiga.

Sumário

Lista de Ilustrações	x
Resumo	xiii
Abstract	xv
1. Introdução	1
2. Objetivos	11
3. Material e Métodos	
3.1 Material Biológico	12
3.2 Arranjo experimental	13
3.3 Processamento	15
3.3.1 Coleta de material para estudos morfológicos	15
3.3.2 Fixação	16
3.3.2 a - Microscopia óptica	16
3.3.2 b - Microscopia eletrônica	16
3.3.3 Processamento para microscopia óptica	16
3.3.4 Colorações utilizadas para microscopia óptica	17
3.3.5 Processamento para microscopia eletrônica de transmissão	18
3.3.6 Processamento para microscopia eletrônica de varredura	20
4. Resultados	
4.1 Morfologia retiniana	23
4.1.1 Descrição anatômica e posição relativa dos olhos	23
4.1.2 Camadas ou túnicas concêntricas do olho	23
4.1.3 Retina	24
4.1.3 a Fotorreceptores retinianos	25

4.1.3 b Conexões neuronais	28
4.1.3 c Epitélio Pigmentar	29
4.2 Ação da luz vermelha na retina de <i>M. roosevelti</i>	31
5. Discussão	68
6. Conclusões	79
Anexo: Soluções fixadoras e corantes	81
Referências bibliográficas	90

Lista de Ilustrações

Figura 01 <i>Metynnis roosevelti</i> Eigenmann, 1915	21
Figura 02 Aquário experimental submetido à luz vermelha	21
Figura 03 Visão geral do experimento	22
Figura 04 Aquário controle submetido à luz branca	22
Figura 05 Localização dos olhos em <i>Metynnis roosevelti</i>	34
Figura 06 Desenho esquemático do olho	35
Figura 07 Desenho esquemático dos músculos oculares extrínsecos	35
Figura 08 Nervo óptico do olho esquerdo em corte longitudinal	36
Figura 09 Camadas ou túnicas concêntricas do olho	37
Figura 10 Microscopia eletrônica de varredura da esclera	38
Figura 11 Vasos sanguíneos da coróide	38
Figura 12 Camadas da retina	39
Figura 13 Região lateral da retina	40
Figura 14 Região de fundo da retina	40
Figura 15 a, b, c Cones duplos	41
Figura 16 Núcleos dos cones e dos bastonetes	42
Figura 17 Cones simples curtos e longos	42
Figura 18 Fibra interna dos cones	43
Figura 19 Segmento interno e segmento externo de um cone simples	44
Figura 20 Segmento interno e segmento externo de um cone duplo	44
Figura 21 a,b,c Arranjo dos cones na forma de mosaico em quadra	45 e 46
Figura 22 Segmento interno e segmento externo de um bastonete	47
Figura 23 Segmentos externos dos bastonetes	47

Figura 24 a,b Ultraestrutura dos segmentos externos de bastonetes	48
Figura 25 Camada nuclear externa	49
Figura 26 Camada plexiforme externa versus camada plexiforme interna	49
Figura 27 Célula horizontal e pedículo dos cones	50
Figura 28 a,b Vesícula sináptica presente na camada plexiforme externa	51
Figura 29 Camada plexiforme interna	52
Figura 30 Célula ganglionar	52
Figura 31 Células de sustentação de Müller	53
Figura 32 Epitélio pigmentar da retina	54
Figura 33 a, b Membrana de Bruch	55
Figura 34 a,b Núcleos das células epiteliais	56
Figura 35 Mitocôndrias presentes nas células epiteliais.....	57
Figura 36 Desmosomas presentes nas células epiteliais	57
Figura 37 Região apical de uma célula epitelial	58
Figura 38 Pigmentos de melanina	58
Figura 39 Retina submetida a um regime de escuro	59
Figura 40 Retina submetida a um regime de luz	59
Figura 41 a,b Experimental e controle no início do fotoperíodo claro	60
Figura 42 a,b Experimental e controle após 30 minutos de exposição à luz vermelha e à luz branca respectivamente	61
Figura 43 a,b Experimental e controle após 4 horas de exposição à luz vermelha e à luz branca respectivamente	62
Figura 44 a,b Experimental e controle após 8 horas de exposição à luz vermelha e à luz branca respectivamente	63
Figura 45 a,b Experimental e controle após 24 horas de exposição à luz vermelha e à luz branca respectivamente	64

Figura 46 a,b Experimental e controle após 48 horas de exposição à luz vermelha e à luz branca respectivamente	65
Figura 47 a,b Experimental e controle após uma semana de exposição à luz vermelha e à luz branca respectivamente	66
Figura 48 Membranas destacadas dispostas no citoplasma epitelial	67
Figura 49 Pacotes de membranas dispersas no citoplasma epitelial	67

Resumo

Os seres vivos, incluindo os peixes, sofrem a influência de fatores ambientais que levam a ajustes morfológicos, funcionais e adaptações evolutivas. Dentre eles, mesmo no ambiente aquático, a luz é um dos fatores mais importantes, porque é responsável direta ou indiretamente por uma grande variedade de processos vitais.

Partindo desse princípio buscamos descrever nesse trabalho as características morfológicas da retina do peixe *Metynnis roosevelti* Eigenmann, 1915 e suas alterações estruturais quando mantida em regime de luz monocromática vermelha.

A retina de *M. roosevelti* possui basicamente três tipos celulares: as células epiteliais pigmentadas, os neurônios - incluindo as células fotorreceptoras - e as células de sustentação desses neurônios.

Os cones apresentam uma variabilidade morfológica e podem ser classificados em cones duplos e simples do tipo longo e curto, arranjados na forma de um mosaico em quadra. Os bastonetes são células fotorreceptoras mais altas e finas que os cones e de difícil visualização, pois geralmente estão encobertos por pigmentos de melanina presentes nas células pigmentares.

Além das células fotorreceptoras, *M. roosevelti* possui como neurônios retinianos as células horizontais, as amácrinas, as bipolares e as ganglionares responsáveis pela formação de conexões entre as células fotorreceptoras e os neurônios aferentes.

O epitélio pigmentar é formado por uma única camada de células, cujo citoplasma é rico em pigmentos de melanina capazes de migração dependendo das mudanças de iluminação no meio.

A retina de *M. roosevelti*, quando exposta à luz vermelha, apresenta uma maior migração de pigmentos de melanina na região apical das células epiteliais se comparada com o controle. A análise ultraestrutural leva à conclusão de que a renovação de membranas

fotorreceptoras é maior, já que partes dos discos de membrana são encontrados no citoplasma das células pigmentares.

Abstract

As for all living beings, including fish, there are many environmental factors which lead to morphological and functional adjustments and evolutionary adaptations. Among them, even in the aquatic environment, light is one of the most important factors, as it is directly or indirectly responsible for a great number of vital processes.

Thus, the aim of this study was to describe the morphology of the retina of a freshwater fish, *Metynnis roosevelti* Eigenmann, 1915 and to evaluate its structural changes when under the influence of monochromatic red light.

In the retina of *M. roosevelti* basically three types of cells are seen: the pigmentary epithelial cells, nervous cells, including the photoreceptors, and supporting cells of these neurons.

Among the photoreceptors, cones are morphologically identified as double, long simple and short simple, being arranged as a mosaic in squares. Rods are thinner and more elongated than cones, generally surrounded by the pigments in the extensions of the pigmentary epithelial cells.

Besides photoreceptor cells, *M. roosevelti* has different neurons in its retina: horizontal and amacrine cells, bipolar and ganglionar neurons. All of the them are responsible for connections and integration between photoreceptor cells and afferent neurons.

The pigmentary epithelium has one single cell layer. The cytoplasm of these cells is rich in melain grains that can migrate along the cell extensions, depending on the levels of light intensity that reaches the retina.

When under red light influence, the retina of *M. roosevelti* shows a greater migration of melanin pigments, when compared with the control under day light influence.

The ultrastructural analysis leads to the conclusion that the renewal of photoreceptor membranes is higher, as parts of the membrane discs are seen in the cytoplasm of pigmentary epithelium cells.

1. Introdução

A Terra caracteriza-se por possuir aproximadamente 70% da sua superfície recoberta por água. Nesse ambiente aquático temos uma relação de fatores bióticos e abióticos que determinam a complexidade desse ecossistema. Normalmente os seres vivos que nele habitam vivem em equilíbrio com o meio e adaptados a ele. Assim, o organismo e o seu ambiente abiótico normalmente interagem de forma harmônica.

Entre os fatores abióticos, que determinam as condições físico-químicas do ambiente aquático, a luz é responsável, direta ou indiretamente, por uma grande variedade de processos vitais. Sua influência sobre o desenvolvimento do sistema reprodutivo, as migrações verticais, atividades motoras, reações de defesa e ataque, a capacidade de obtenção de comida, natureza dos nutrientes e intensidade de sua presença, o comportamento intraespecífico e interespecífico são alguns exemplos (NICOL, 1963; LEVINE e MACNICHOL JR., 1982; ALI e RAYMOND, 1972; TEYKE e SCHAEERER, 1994; WHEELER, 1982 e 1979 ; COLLIN, 1993; HORRIDGE, 1987; FANTA et al., 1991 e 1994; ALI et al., 1968; WOEHL, 1990; LOUKASHKIN e GRANT, 1959).

Durante o processo evolutivo, a biosfera teve que solucionar o problema da luminosidade com o objetivo fundamental de fazer com que os seres vivos aproveitassem a radiação solar existente no ecossistema de tal forma que os comprimentos de onda úteis pudessem ser explorados e aproveitados, sendo os perigosos, barrados (ODUM, 1988).

A radiação solar que atinge a superfície da água é formada por fótons de comprimento de onda variável, do violeta ao vermelho profundo, junto com outros de infravermelho e ultravioleta. A água atua como um monocromador e seletivamente absorve luz com grande e pequeno comprimento de onda (BOWMAKER et al., 1994). No entanto, as diferentes espécies de peixes, em seu ambiente natural, são influenciadas de

maneira diferenciada pelos vários comprimentos de onda, correspondendo principalmente ao azul, ao verde ou próximo ao infravermelho (LEVINE e MACNICHOL JR., 1982 ; CLARKE, 1936; THORNTON e PUGH JR., 1983).

A intensidade e as propriedades espectrais da luz ao atravessar uma coluna de água dependem de diversos fatores como a turbidez, o vento, a profundidade, as propriedades reflexivas dos objetos, as modificações sazonais de incidência luminosa e o conteúdo mineral e biológico das águas (WHEELER, 1982; ALI, 1981 ; NIXON, 1988).

Os peixes, vivendo em ambiente sob estas condições, tiveram que se adaptar. Certas células nervosas e epiteliais especializaram-se com a função de reagir à luz de uma maneira específica. Desenvolveram-se órgãos capazes de distinguir a forma, o tamanho e as mudanças mínimas de posição de objetos externos, além de reagir a diferentes intensidades e qualidades de luz.

Os mais importantes órgãos para a fotorrecepção dos peixes são os olhos, embora os outros sítios fotossensíveis como a pele, a coluna vertebral, o cérebro e o complexo pineal sejam também conhecidos (NICOL, 1963 e 1989 ; TEYKE e SCHAEERER, 1994; OMURA e OGURI, 1991; SAMEJIMA et al., 1991).

Os olhos possuem um significado especial porque são capazes de formar a imagem (NICOL, 1963). São considerados os principais receptores da luz: as células fotossensíveis da retina - cones e bastonetes - captam os fótons da luz visível, desencadeando uma série complexa de eventos químicos e neurais que podem resultar em uma sensação visual (LEVINE e MACNICHOL JR., 1982; SCHNAPF e BAYLOR, 1987).

Resumidamente podemos dizer que o olho forma uma imagem do ambiente na sua camada fotorreceptora, a retina, e transmite as informações desta imagem ao cérebro através do nervo óptico (WEISS e GREEP, 1981; PADGHAM e SAUNDERS, 1975; LIVINGSTONE, 1990; FENDER, 1964).

A estrutura histológica do olho satisfaz as exigências ópticas, fotorreceptoras e motoras. Como qualquer outra estrutura biológica, os olhos exibem uma variação funcional

e estrutural determinada por fatores ambientais, evolutivos e genéticos.

Vários estudos referentes a essa diversidade têm mostrado que a morfologia ocular em peixes teleósteos pode variar, entre outros fatores, de acordo com a estratégia alimentar, os padrões de atividade e com o habitat (ZAUNREITER et al., 1991; EASTMAN, 1988; PANKHURST e MONTGOMERY, 1989; MENEZES et al. 1981; FANTA et al. 1994; WILLIAMSON e KEAST, 1988; HAIRSTON JR. et al., 1982; POGGIO e KOCH, 1987).

ALI (1981) estudou as adaptações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas da retina de acordo com o habitat. Usou como modelo biológico os peixes e concluiu que os vertebrados, durante o processo evolutivo, adaptaram-se de acordo com os diferentes meios fóticos. WAGNER et al. (1976) classificaram a estrutura da retina de várias espécies de peixes teleósteos brasileiros em três categorias: espécies visualmente dependentes, espécies especializadas para ambientes escuros, e espécies que possuem pobre habilidade visual. SHAND (1994) analisou as trocas na estrutura da retina que ocorrem durante a vida larval e a juvenil em *Upeneus tragula* ("goatfish") e verificou que os peixes adultos mostram diversidade em relação às células fotorreceptoras e à topografia celular neural, que muitas vezes refletem adaptações a diferentes meios fóticos.

A retina dos peixes, como em muitos vertebrados, caracteriza-se por possuir uma camada externa, que é a camada do epitélio pigmentar da retina, e uma camada interna que contém os fotorreceptores e é chamada camada nervosa ou retina propriamente dita.

Os neurônios da retina se dispõem em arranjo mais ou menos regular, sendo os contactos sinápticos confinados preferencialmente às duas camadas plexiformes (WITKOVSKY e STELL, 1973). A organização funcional da retina do *Ictalurus punctatus* ("catfish") foi estudada por NAKA (1977), evidenciando o caminho neural através do qual a mensagem dos receptores, iniciada pela estimulação fótica, chega à célula ganglionar.

A morfologia e a fisiologia das células horizontais, amácrinas e ganglionares têm sido assunto de investigação científica de vários autores (NAKA, 1977; DOWLING e

WERBLIN,1969; WERBLIN e DOWLING, 1969; DOWLING, 1992; KANEKO, 1970; SPRINGER e MEDNICK,1986; HIDAHA et al., 1986; CHINO e HASHIMOTO, 1986; BECKER e COOK, 1988; NORDQUIST e MCLOON, 1991; HITCHCOCK e EASTER JR., 1986). SHERRY e YAZULLA (1993) fizeram uma análise da morfologia e do arranjo terminal axônico das células bipolares pelo método de Golgi, identificando quinze tipos morfológicos de células bipolares na retina do *Carassius auratus* ("goldfish").

STELL (1967) e RAYNAULD et al. (1979) se concentraram no estudo da estrutura e das relações das células horizontais bem como dos complexos sinápticos entre fotorreceptores e células bipolares enquanto que MANGEL e DOWLING (1987) avaliaram os efeitos da dopamina e do estímulo luminoso no sistema de células horizontais.

Já em 1866, SCHULTZE, citado por YOUNG (1971), formulou o conceito de que existem duas classes fundamentais de fotorreceptores em animais vertebrados: os cones e os bastonetes. Essas células fotorreceptoras estão concentradas na retina neural e formam na maioria dos peixes teleósteos um mosaico variado, no qual os cones são os elementos predominantes (KUNZ, 1980; DUNN, 1966a; EIGENMANN e SHAFER, 1900; LYALL, 1957 ; ENGSTRÖM, 1963a e 1960; AHLBERT, 1969; WAHL, 1994; ROSSETO et al., 1992 ; FANTA et al., 1994; MEER, 1992).

Existem variações quanto às proporções e densidades de cones e bastonetes na organização geral da retina, que dependem da filogenia do peixe e modificam-se, dentro de certos limites, de acordo com a ecologia de cada animal (AHLBERT, 1976; ENGSTRÖM, 1963a; KOHBARA et al., 1987 ; MUNK, 1989; GRÖTZNER, 1994; ALI et al. 1968; MEER, 1992).

Embora a maioria dos peixes teleósteos apresente cones e bastonetes, existem exceções, como em muitos peixes teleósteos marinhos de profundidade, os quais possuem a retina formada somente por bastonetes (MUNK, 1989 e 1981). Alguns peixes teleósteos marinhos de profundidade, no entanto, possuem uma retina dupla, isto é, uma retina formada por cones e bastonetes que mostram uma variação na estrutura da camada visual

(MUNK, 1982 e 1981).

As células em bastonetes são especialmente adaptadas para iluminação de baixa intensidade (visão escotópica). Funcionam para visão periférica e noturna e usualmente contêm somente um tipo de pigmento visual (LEVINE e MACNICHOL JR., 1982). As células em cones, por sua vez, estão adaptadas para iluminação diurna (visão fotópica) e estão relacionadas com a percepção de detalhes e da visão cromática. Os cones apresentam pigmentos visuais diversos (LEVINE e MACNICHOL JR., 1982; NICOL, 1963; PAULUS et al., 1986).

A visão colorida requer fotorreceptores que contenham pigmentos visuais com diferentes espectros de absorção. A maioria dos peixes de água doce possui visão dicromática ou tricromática, com cones absorvendo ao redor de 544 nanômetros (azul), 530 nanômetros (verde) e 625 nanômetros (vermelho) (BOUJARD et al., 1992; WITKOVSKY et al., 1973; FERNALD, 1981; NEUMEYER, 1986; PAULUS et al., 1986; MARC e SPERLING, 1976; BOWMAKER et al., 1994; MECKE, 1983 ; ALLEN e FERNALD, 1985; KONG et al., 1980; DOWNING et al., 1986; FANTA, 1995; LEVINE e MACNICHOL JR., 1982).

Estudos recentes revelam que alguns peixes de água doce estendem sua visão para comprimentos de onda correspondentes ao ultravioleta, tendo portanto, visão tetracromática (BOWMAKER e KUNZ, 1987 ; BOWMAKER et al., 1991; HAWRYSHYN e MCFARLAND, 1987; HAWRYSHYN, 1992; CAMERON e PUGH JR, 1991).

A ultraestrutura e a morfologia dos fotorreceptores de diferentes espécies de peixes teleósteos têm sido assunto de inúmeros trabalhos em microscopia óptica e microscopia eletrônica (BRAEKEVELT, 1992a; DUNN, 1966b; SILLMAN et al., 1993; DICKSON e HOLLENBERG, 1971; DICKSON e GRAVES, 1979; ECKELBARGER et al., 1980; WITKOVSKY et al., 1974; ZYZNAR e ALI, 1975; WOLKEN, 1963; COHEN, 1963; VILLEGAS, 1960; DARTNALL e TANSLEY, 1963; DOWNING et al., 1986; WOEHL,

1990; ENGSTRÖM, 1960, 1963a e 1963b; GRÖTZNER, 1994; LIEPE e BURNSIDE, 1993; PHAN, 1986; KRAFT e BURKHARDT, 1986; OMURA e OGURI, 1991; MAKSIMOV e PODUGOL' NIKOVA, 1978; JANUSCHKA et al., 1987; BOWMAKER et al., 1991; BOEHLERT, 1978; MARCHIAFAVA, 1985; NAG e SUR, 1992; SPRINGER e MEDNICK, 1986; EASTMAN, 1993 ; SILLMAN et al., 1990).

As diferenças existentes entre cones e bastonetes foram estudadas por BORWEIN e HOLLENBERG (1973) que concluíram existir uma constância fundamental na ultraestrutura básica de cada tipo de fotorreceptor e, ao mesmo tempo, uma acentuada diversidade ao longo deles. YOSHIDA e TONOSAKI (1994) utilizaram anticorpos retinianos anti-lampréia (*Lampetra japonica*) para a diferenciação das células fotorreceptoras longas e curtas. ISHIKAWA et al. (1987) demonstraram a presença de cones e bastonetes nesta mesma espécie através de técnicas de imunofluorescência e criofratura. YACOB et al. (1977) analisaram o segmento externo acessório de cones e bastonetes e COHEN (1970) estudou as diferenças existentes nas membranas dispostas em forma de moedas ou discos, que preenchem os segmentos externos de cones e bastonetes.

Morfologicamente, existem vários tipos de cones, que podem ser classificados de uma maneira geral em: cones simples do tipo longo ou curto, e cones gêmeos ou duplos (MAKSIMOV e PODUGOL' NIKOVA, 1978; MARCHIAFAVA, 1985; AHLBERT, 1969 e 1976; ENGSTRÖM, 1960 e 1963a ; JANUSCHKA et al., 1987 ; BOWMAKER et al., 1991; GRÖTZNER, 1994; NAG e SUR, 1992; BOEHLERT, 1978).

A regulação da divisão celular e a diferenciação de bastonetes na retina de peixes foi estudada por MACK e FERNALD (1993), enquanto que o aumento no número de células fotorreceptoras na retina durante o desenvolvimento embriológico e larval foi estudado por JOHNS (1977) no *Carassius auratus* ("goldfish") e por BLAXTER e JONES (1967) na retina de *Clupea harengus* (arenque).

O epitélio pigmentar da retina corresponde à camada mais externa da retina visual, estando envolvido em muitos processos cruciais para o próprio funcionamento dos

fotorreceptores, bem como da função visual. O epitélio pigmentar da retina tem sido assunto de extensivas investigações, tanto morfológicas (BRAEKEVELT, 1992b ; NGUYEN-LEGROS, 1978; MIGUEL et al., 1992) quanto funcionais (MAWAS,1953; BERNSTEIN,1961; SPENCER, 1972; YORKE e DICKSON, 1984; ALI et al., 1988; HERMAN e STEINBERG, 1982).

O epitélio pigmentar da retina participa dos processos de renovação dos segmentos externos das células fotorreceptoras, principalmente dos bastonetes. Entretanto, até agora, a renovação de discos nos cones só foi evidenciada nos seres humanos e nos esquilos (O'DAY e YOUNG, 1978). YOUNG (1971) pode detectar em muitos vertebrados, através de estudos autoradiográficos, diferenças na renovação dos segmentos externos das duas classes de células visuais. BRAEKEVELT (1980) constatou a presença de fagocitoses na interface do epitélio pigmentar da retina e fotorreceptores em cinco espécies de peixes teleósteos, com o auxílio das técnicas de microscopia eletrônica.

O'DAY e YOUNG (1978) estudaram o ritmo diário de renovação das membranas dos segmentos externos de bastonetes em *Carassius auratus* (" goldfish "). Chegaram à conclusão de que os segmentos externos mantêm a sua integridade ao longo da vida através da renovação dos seus constituintes celulares. O equilíbrio entre a formação e a degradação de membranas mantêm o segmento externo dos bastonetes num comprimento relativamente constante.

A formação dos discos membranosos nos segmentos externos de bastonetes é um processo contínuo, no entanto, o destacamento e o isolamento dos grupos de discos ocorrem intermitentemente (YOUNG e BOK, 1969; LA VAIL, 1976).

Respondendo às modificações de iluminação no meio, bastonetes, cones e grânulos de melanina do epitélio pigmentar da retina de muitos vertebrados inferiores, entre eles os peixes teleósteos, sofrem trocas posicionais conhecidas por movimentos retinomotores ou fotomecânicos.

ALI (1975) citado por GUMA'A (1982) definiu o termo "resposta retinomotora"

como a dispersão ou concentração dos grânulos de melanina nas células epiteliais da retina e a expansão ou contração de cones e bastonetes como resposta às mudanças de iluminação no meio. WALLS (1942), citado por KIRSCH et al. (1989) e HARA et al. (1990), interpretaram essas respostas retinomotoras como um mecanismo alternativo para regular o alcance da luz nos segmentos externos.

BRUENNER e BURNSIDE (1986) estudaram a migração de grânulos de melanina em células isoladas do epitélio pigmentar da retina de peixes teleósteos e sugeriram, com base em estudos prévios, que as células do epitélio pigmentar da retina possuem um mecanismo móvel, necessário ao transporte dos grânulos de melanina, mesmo na ausência das células da retina.

LEVINSON e BURNSIDE (1981) ; ES-SOUNNI et al. (1987) ; MCMAHON e BARLOW JR. (1992) ; LIEPE e BURNSIDE (1993) estudaram o efeito do ritmo circadiano e das condições de iluminação no comprimento das células fotorreceptoras em várias espécies de peixes, enquanto que DOUGLAS (1982) analisou a função dos movimentos retinomotores na retina do *Salmo gairdneri* (truta arco-íris). O controle local da atividade retinomotora na retina de peixes teleósteos foi estudado por EASTER JR. e MACY (1978) e DOUGLAS e WAGNER (1982), e os fatores intrínsecos dessas migrações por VILTER (1946) e por ALI (1971).

Inúmeros transmissores retinianos estão envolvidos na regulação e modulação do movimento retinomotor. No entanto, a dopamina tem um papel central no movimento adaptativo à estimulação luminosa (BURNSIDE et al., 1993). No campo intracelular, o AMP cíclico e o cálcio atuam como segundo mensageiro porque regulam a contração e forçam a produção de microtúbulos e filamentos do tipo miosina e actina (BRECKLER e BURNSIDE, 1994; BURNSIDE et al., 1983; FERRERO et al., 1979; NAGLE et al., 1986; WARREN e BURNSIDE, 1978).

A influência da qualidade (comprimento de onda ou cor) e da intensidade (quantidade de energia medida em calorias - grama) da luz sobre o desenvolvimento, o

comportamento, a fisiologia e a morfologia em várias espécies de peixes têm sido assunto de inúmeras investigações (LEVINE e MACNICHOL JR., 1982; NICOL, 1963; WHEELER, 1979 e 1982; WOEHL, 1990; PAULUS et al., 1986; WITKOVSKY et al., 1973; MARC e SPERLING, 1976; FERNALD, 1981; ALLEN e FERNALD, 1985; NEUMEYER, 1986; MECKE, 1983; LOUKASHKIN e GRANT, 1959; FANTA, 1995; PANKHURST, 1992; THORNTON e PUGH JR., 1983; RAYNAULD, 1972; JAMESON e HURVICH, 1961; SHAND et al., 1988; CRESCITELLI, 1991).

Dentre os diversos comprimentos de onda aos quais os peixes são submetidos em seu habitat natural, temos o comprimento de onda longo correspondente à cor vermelha. Ele tem um pico de absorção em torno de 625 nanômetros. Estudos referentes à ação da luz vermelha em peixes teleósteos têm revelado que esse comprimento de onda longo, que aproxima-se de uma situação de escuro, está relacionado com o comportamento de fuga e o acasalamento animal (WHEELER, 1982), com a sensibilidade para adaptação ao escuro (WHEELER, 1979), com a dispersão de peixes com hábito de cardumes (LOUKASHKIN e GRANT, 1959), com a diminuição das atividades locomotoras e o aumento da agressividade (WOEHL, 1990; FANTA, 1995) e com a perda da acuidade visual (WOEHL, 1990; WHEELER, 1979; LEVINE e MACNICHOL JR., 1982; NICOL, 1963).

A discriminação dos diferentes comprimentos de onda em peixes teleósteos varia de acordo com a sensibilidade máxima de absorção dos pigmentos visuais e dos diferentes tipos de células fotorreceptoras (LEVINE e MACNICHOL, 1982). Quando a radiação solar atravessa uma coluna de água a intensidade luminosa diminui e alguns comprimentos de onda são absorvidos enquanto que outros refletidos (WHEELER, 1979 e 1982; NICOL, 1963; LOUKASHKIN e GRANT, 1959). A luz vermelha, formada por comprimentos de onda longos, possui uma capacidade de penetração em uma coluna de água até uma profundidade de aproximadamente 25 metros.

Essa capacidade de penetração da luz vermelha no ambiente aquático depende das características químicas, biológicas e físicas da água. Assim, em águas salgadas, a uma

profundidade intermediária, a luz vermelha é absorvida por muitas espécies de peixes teleósteos enquanto que as espécies de maior profundidade não possuem pigmentos visuais absorventes da luz vermelha (LEVINE e MACNICHOL JR., 1982). Em águas doces rasas, a maioria dos peixes teleósteos possui uma sensibilidade à radiação de comprimentos de onda longo, pois a luz transmitida da superfície é vermelha. Isto é nada mais que uma resposta aparentemente evolutiva para uma rápida baixa de luz com pequenos comprimentos de onda nas águas em que habitam (LEVINE e MACNICHOL, 1982).

Em resumo, podemos dizer que a luz solar é filtrada. Os pequenos comprimentos de luz são absorvidos e espalhados pelos microorganismos enquanto que os longos são progressivamente perdidos com a profundidade, resultante da absorção. A estável cor de fundo transmitida para as células fotorreceptoras dos peixes de águas rasas consiste basicamente em comprimentos de luz correspondentes a cor vermelha (WITKOVSKY et al., 1973). Deve-se salientar que temos em águas rasas outros comprimentos de luz, dentre eles o azul e o verde. Estes possuem um poder de penetração até uma profundidade de aproximadamente 75 metros (JANUSCHKA, 1987; DOWNING et al., 1986; WITKOVSKY et al., 1973).

Partindo do princípio de que, em ambientes naturais, comprimentos de onda longos correspondentes à cor vermelha influenciam o desenvolvimento e a ecologia dos organismos submetidos a eles, buscou-se verificar nesse trabalho, possíveis alterações morfofuncionais na retina de *Metynnix roosevelti* submetida a luz monocromática vermelha. Espécimes de *Metynnix roosevelti* foram mantidos em laboratório sob estimulação fótica incomum, como o regime de luz monocromática correspondendo a um comprimento de onda longo (cor de fundo e iluminação correspondendo ao vermelho). Deve-se levar também em consideração que o conhecimento histológico, morfológico e funcional dos olhos é de vital importância para se entender o comportamento intra e interespecífico dos peixes, assim como o papel do organismo no meio em que vivem.

2. Objetivos

2.1 - Descrever as características morfológicas da retina, especialmente das células fotorreceptoras e do epitélio pigmentar, no peixe *Metynnis roosevelti* Eigenmann, 1915 através de técnicas de microscopia óptica e microscopia eletrônica.

2.2 - Avaliar, sob o ponto de vista morfofuncional, o efeito da luz monocromática vermelha na retina do peixe *Metynnis roosevelti* Eigenmann, 1915.

3. Material e Métodos

3.1 - Material Biológico

A espécie *Metynnis roosevelti* Eigenmann, 1915, da família Characidae, subfamília Serrasalminae, é conhecida popularmente como pacu (Fig. 01).

Apesar desta espécie ser denominada pacu, o termo é também utilizado em outras regiões do Brasil para espécies dos gêneros *Mylossoma*, *Myleus*, *Piaractus*, *Colossoma*, *Mylesinus*, entre outros (SEVERI, 1991), indicando com isso que a subfamília Serrasalminae inclui uma grande variedade de espécies que ocupam uma vasta gama de ambientes e mostram numerosas adaptações, principalmente as relacionadas com os hábitos alimentares (MACHADO - ALLISON, 1983).

Espécies do gênero *Metynnis* apresentam o corpo geralmente discóide ou ovalado, sendo muitas vezes mais profundo que largo e tendo uma coloração variada, do cinza esverdeado ao prateado. Possuem linha lateral completa e boca não muito ampla. Em relação ao sistema natatório, a nadadeira dorsal é relativamente alta, as nadadeiras peitorais são pequenas e a nadadeira anal é bem desenvolvida. São peixes nativos do Brasil que possuem o hábito de formar cardume. São omnívoros e comumente empregados em piscicultura nas regiões sul e sudeste do Brasil (GIESSMANN, 1994; GÉRY e FRANCE, 1979; MACHADO - ALLISON, 1983). Atualmente estão sendo utilizados também como peixes ornamentais.

Metynnis roosevelti Eigenmann, 1915 foi identificado e classificado sistematicamente de acordo com SEVERI, 1991; GÉRY e FRANCE, 1979; GÉRY, 1977; MACHADO - ALLISON, 1983; STERBA, 1959 e confirmado por GIESSMANN (comunicação pessoal):

Classe: Osteichthyes
Sub-classe: Actinopterygii
Ordem: Cypriniformes
Sub-ordem: Cyprinoidea
Família: Characidae
Subfamília: Serrasalminae
Gênero: *Metynnis*
Espécie: *M. roosevelti*

Os exemplares de *Metynnis roosevelti* empregados no experimento foram obtidos no comércio, sendo originários de criadores paulistas.

3.2 - Arranjo Experimental

Dois aquários de 128 litros, com dimensões de 80x40x40 cm foram utilizados: o controle foi iluminado com luz branca e o experimental com luz vermelha.

O aquário experimental teve suas faces laterais e posterior revestidas com papel Contact^(R) vermelho (Fig. 02), do mesmo modo que a face interna do anteparo colocado na frente do aquário, deixando-se apenas uma fenda para observação (FANTA, 1995) (Fig. 03). No aquário controle seguiu-se o mesmo procedimento, variando apenas a cor do revestimento, que foi cinza, considerado neutro (Fig. 04).

Foram utilizadas tampas de madeira com tela de "nylon" e tampa de vidro, fechando a parte superior dos aquários, o que evitou a evaporação excessiva da água e sua contaminação por partículas em suspensão no meio aéreo. As tampas possibilitavam a passagem dos tubos para aeração e o funil para alimentação, bem como a luz necessária para a execução do experimento. Acima das tampas foram colocadas lâmpadas "luz do dia", de 20 Watts, controladas automaticamente por um "Timer" programado para um

fotoperíodo de 8 horas luz / 16 horas escuro.

O aquário controle (Fig. 04), submetido à luz branca, teve uma lâmpada colocada a 30 cm de altura acima da tampa de vidro, sem a presença de filtros para que a intensidade luminosa se mantivesse entre 75 e 100 lux. O aquário experimental (Fig. 02), influenciado pela luz vermelha, teve duas lâmpadas colocadas sobre a tampa de vidro recoberta por celofane vermelho, com pico de absorbância entre 450 a 600 nanômetros, para que a intensidade luminosa também se mantivesse entre 75 e 100 lux. Foram realizados vários testes para se igualar a intensidade luminosa nos dois aquários, o experimental e o controle: um luxímetro Extech^(R) foi colocado no interior de uma proveta de 1.000 ml, mantida no interior do aquário, em posição vertical, encostada ao fundo do mesmo na região mediana, e a posição das lâmpadas foi alterada até que a intensidade luminosa no fundo do aquário fosse a mesma.

A água utilizada nos aquários foi devidamente filtrada e desclorinizada através de dois filtros de celulose e posteriormente dois filtros de carvão ativado. Compressores de ar com duas saídas foram os responsáveis pela aeração; filtros biológicos com duas torres, pela limpeza da água; e aquecedores de 150 Watts com termostatos, pela manutenção da temperatura.

Os animais permaneceram em condições abióticas constantes, controladas duas vezes ao dia em horário pré-estabelecido, sendo a temperatura ajustada para 25,5°C (\pm 0,5°C) e o pH de 7,2 (\pm 0,5). Como alimento foi fornecida a ração comercial balanceada Wardley^(R) uma vez ao dia, antes do início do fotoperíodo claro e depois da primeira medida de pH.

A aclimação dos animais às condições do experimento (pH, temperatura e fotoperíodo) mostrou-se essencial, visando eliminar os estímulos estressantes, capazes de causar disfunções bioquímicas e levar a alterações fisiológicas, evitando assim o risco da obtenção de falsos resultados durante a fase experimental.

3.3 - Processamento

3.3.1 - Coleta de material para estudos morfológicos

Após o período de aclimação em aquário neutro, de cor cinza, vinte espécimes com tamanho padrão de 4,5 cm ($\pm 1,0$ cm) e peso de 3,0 g ($\pm 1,0$ g) foram transferidos para o aquário vermelho, já descrito no item 2.2, duas horas e meia antes do início do experimento (T_0). Este momento corresponde ao início do fotoperíodo claro. Assim os efeitos estressantes da transferência para o novo ambiente foram amenizados.

Nos tempos determinados: inicial, 30 minutos, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 24 horas, 48 horas e uma semana após o T_0 , dois animais do controle (aquário cinza) e dois animais do experimental (aquário vermelho) foram sacrificados após secção da medula espinhal e descerebração. Na seqüência foram feitos cortes em direção aos olhos, seguido do levantamento da calota craniana e da exposição da região do cérebro e dos olhos. A remoção cirúrgica das peças foi a mais rápida possível para que as estruturas retiradas não sofressem alterações como a autólise, ataque bacteriano e degeneração protéica.

A dissecação dos animais do aquário experimental ocorreu sob uma proteção construída com isopor e revestida com papel celofane vermelho, a fim de ser evitado o contato dos olhos dos peixes com a luz branca. A dissecação dos animais do aquário controle ocorreu em luz branca.

A coleta de material foi efetuada em duas etapas, nas quais os parâmetros abióticos foram mantidos constantes e idênticos e as condições de execução do experimento foram as mesmas. O experimento foi realizado em duas fases devido ao destino do material coletado: na 1ª fase os olhos coletados foram destinados à análise através de microscopia óptica enquanto que na 2ª fase os olhos foram destinados à análise através de microscopia eletrônica.

O experimento, a coleta e o processamento do material foram realizados no

Laboratório de Estudos de Impacto Ambiental do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná.

As soluções utilizadas na coleta e no processamento do material em microscopia óptica e microscopia eletrônica estão descritas no ANEXO.

3.3.2 - Fixação

3.3.2 a - Microscopia óptica - Após a remoção, os olhos foram lavados em solução Salina de Cortland (WOELF, 1963), com a finalidade de manter as células vivas por mais tempo e retirar o sangue das peças. Em seguida, os olhos direitos foram fixados em Fluido de Bouin (BÜCHERL, 1962) por 6 horas e os olhos esquerdos foram fixados em Fluido de Gendre (CULLING et al., 1985), durante o mesmo período.

3.3.2 b - Microscopia eletrônica - Concluída a dissecação, os olhos foram inicialmente lavados em Solução Salina de Cortland. Em seguida, os olhos direitos foram cortados em pedaços com o auxílio de uma lâmina cortante e fixados em glutaraldeído a 2,5% em solução tampão fosfato Sorensen a 0,4 M e pH de 7,2 a 4°C durante 2 horas, para posterior processamento em Microscopia Eletrônica de Transmissão (CULLING et al., 1985; GLAUERT, 1986). Os olhos esquerdos, após serem cortados, foram fixados em glutaraldeído a 3% em solução tampão de cacodilato a 0,2 M e pH de 7,2 a 4°C por 24 horas (CULLING et al., 1985; GLAUERT, 1986), para análise em Microscopia Eletrônica de Varredura

3.3.3 - Processamento para Microscopia Óptica

Depois de terminada a fixação em Fluido de Bouin e Fluido de Gendre por 6 horas, as peças foram transferidas para álcool a 70%, substituído várias vezes antes da

desidratação, para retirada, ainda que parcial, do excesso de ácido pícrico. Após um período de aproximadamente 35 dias em álcool a 70%, as peças foram desidratadas em série alcoólica crescente, o que ocasionou uma retirada lenta e suave da água, para evitar uma alteração dos tecidos e células.

Na seqüência, as peças sofreram diafanização em xileno, impregnação e inclusão em "Paraplast Plus"^(R) (Sigma). A emblocagem ocorreu em moldes cúbicos de papel, de forma direcionada (GRÖTZNER, 1994) onde um fio de " nylon " dobrado ao meio foi preso a um dos músculos oculares, possibilitando diferenciar assim as regiões da retina.

Os blocos obtidos foram trimados (STEEDMAN, 1960), conseguindo-se cortes de 2 a 4 micrômetros de espessura com um micrótomo para parafina marca Leitz Wetzlar.

Os cortes feitos foram colocados em lâminas recobertas com uma fina camada de Albumina de Mayer (CULLING et al., 1985) e água, sendo que a distensão dos cortes foi realizada em placa aquecedora.

3.3.4 - Colorações utilizadas para Microscopia Óptica

Várias técnicas de coloração foram utilizadas tendo como objetivo a descrição morfológica e funcional das estruturas celulares existentes nos olhos, fornecendo uma visão geral dos tecidos que os compõem, bem como a localização de cada tipo celular no contexto geral. Procuraram-se também técnicas de coloração que dessem ênfase ao epitélio pigmentar da retina e às células nervosas.

A coloração com Hematoxilina - Eosina (CULLING at al., 1985) permitiu a identificação e a localização dos tipos celulares existentes na retina; os elementos basófilos nucleares e citoplasmáticos foram corados com a hematoxilina, enquanto que as estruturas acidófilas citoplasmáticas foram coradas pela eosina.

A coloração com a Hematoxilina Férrica de Heidenhain, feita de acordo com

CULLING et al. (1985), destacou as porções dendríticas e axônicas dos tipos celulares da retina, assim como maiores detalhes das porções citoplasmáticas.

A evidenciação dos diferentes tecidos que compõem o olho foi obtida através do Tricrômico de Mallory (CLARK, 1981), que sofreu algumas modificações para um melhor resultado, como a eliminação da passagem das lâminas em álcool a 95%, evitando com isso o descolorimento das mesmas. Algumas lâminas foram coradas em Tricrômico de Mallory e Floxina (CLARK, 1981) para uma melhor diferenciação dos tecidos e camadas dos olhos.

A técnica de Novelli ou Método da Fucsina Ácida - Verde Luz (BEÇAK e VANRELL, 1970) foi empregada para evidenciação das mitocôndrias nas células fotorreceptoras, isto é, cones e bastonetes.

A técnica da Reação do Ácido periódico - Reativo de Schiff ou PAS (CLARK, 1981) teve como objetivo, além da visualização das estruturas celulares da retina, a evidenciação das células de Müller que possuem uma reação positiva para glicogênio.

A técnica geral de coloração consistiu na desparafinização pelo xileno, hidratação em série decrescente de álcoois, passagem pela água corrente filtrada e água destilada. Em seguida os cortes foram corados, desidratados em série crescente de álcoois e diafanizados em xileno. O meio de montagem utilizado para preparação das lâminas permanentes foi a resina Polymount^(R).

As lâminas permanentes foram previamente selecionadas em microscópio óptico Micromaster e posteriormente foram analisadas e fotografadas no Fotomicroscópio Olympus PM 10AD, utilizando-se filmes Kodakcolor (35 mm e Asa 100).

3.3.5 - Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão

Depois de terminada a fixação em glutaraldeído a 2,5% em solução tampão fosfato Sorensen a 0,4M e de pH 7,2 por duas horas a 4°C, as peças foram lavadas rapidamente

na mesma solução tampão utilizada no fixador e estocadas em glutaraldeído a 0,5% em solução tampão fosfato Sorensen a 0,4M e de pH 7,2 a 4°C durante uma semana. Após este período, o material foi lavado durante 3 horas em solução tampão fosfato Sorensen a 0,4M e de pH 7,2 com 0,5% de sacarose e traços de cálcio (aproximadamente 5 gotas). Em seguida foi efetuada a pós-fixação com tetróxido de ósmio a 2% em solução tampão fosfato Sorensen a 0,4M e de pH 7,2 com 0,5% de sacarose e traços de cálcio durante uma hora. O material foi lavado rapidamente em água destilada e contrastado em bloco com acetato de uranila a 2% ou ácido tânico a 2%

A desidratação foi realizada em uma seqüência de soluções com concentrações crescentes de etanol. Encontrando-se os espécimes desidratados, procedeu-se à substituição do etanol P.A. pela acetona P.A. O material em estudo foi a seguir embebido em mistura de acetona e Epon-812 1:1 durante uma noite, em frasco aberto, à temperatura ambiente. O material fixado e assim preparado foi então incluído em Epon-812 em mistura balanceada descrita por LUFT (1961), para a obtenção da máxima dureza final dos blocos. A polimerização foi efetuada em estufa a 60°C.

Cortes semifinos (0,2 micra) e ultra-finos (30-50 nanômetros) foram obtidos em ultramicrotomo Sorvall ^(R) Porter Blum MT-2 com utilização de navalhas de vidro e diamante. Os cortes ultra-finos foram colhidos em telas de cobre de malha 200.

Os cortes semifinos foram corados com Bórax / Azul de toluidina a 1% para análise em microscopia óptica, enquanto que os cortes ultra-finos foram contrastados em solução aquosa de acetato de uranila a 2% (WATSON, 1958) por 10 minutos, à temperatura ambiente. Depois de rápida lavagem e secagem os cortes foram colocados na superfície de uma gota de solução de nitrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) por 10 minutos. Após nova lavagem em água bidestilada as telas foram secas ao ar.

A observação e as micrografias eletrônicas do material em estudo foram feitas em microscópio eletrônico JEOL-JEM 1200 EX II da Universidade Federal do Paraná e JEM-100 CX II da Universidade de São Paulo.

O procedimento descrito acima foi em parte realizado no Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

3.3.6 - Processamento para Microscopia Eletrônica de Varredura

Depois de terminada a fixação em glutaraldeído a 3% em solução tampão cacodilato a 0,2M e de pH 7,2 por 24 horas a 4°C, as peças foram lavadas com água destilada, transferidas para álcool a 50% durante 5 minutos e conservadas em álcool a 70% a 4°C durante 2 meses. Em seguida as peças foram desidratadas em série alcoólica, sendo o ponto crítico obtido em um Balzers CPD - 010 com gás carbônico. Em seguida ocorreu a colagem das peças em suporte específico para metalização em ouro, que foi obtida em um Balzers SCD - 030 (CULLING et al., 1985 e GLAUERT, 1986).

O material foi analisado no microscópio Phillips 505, do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

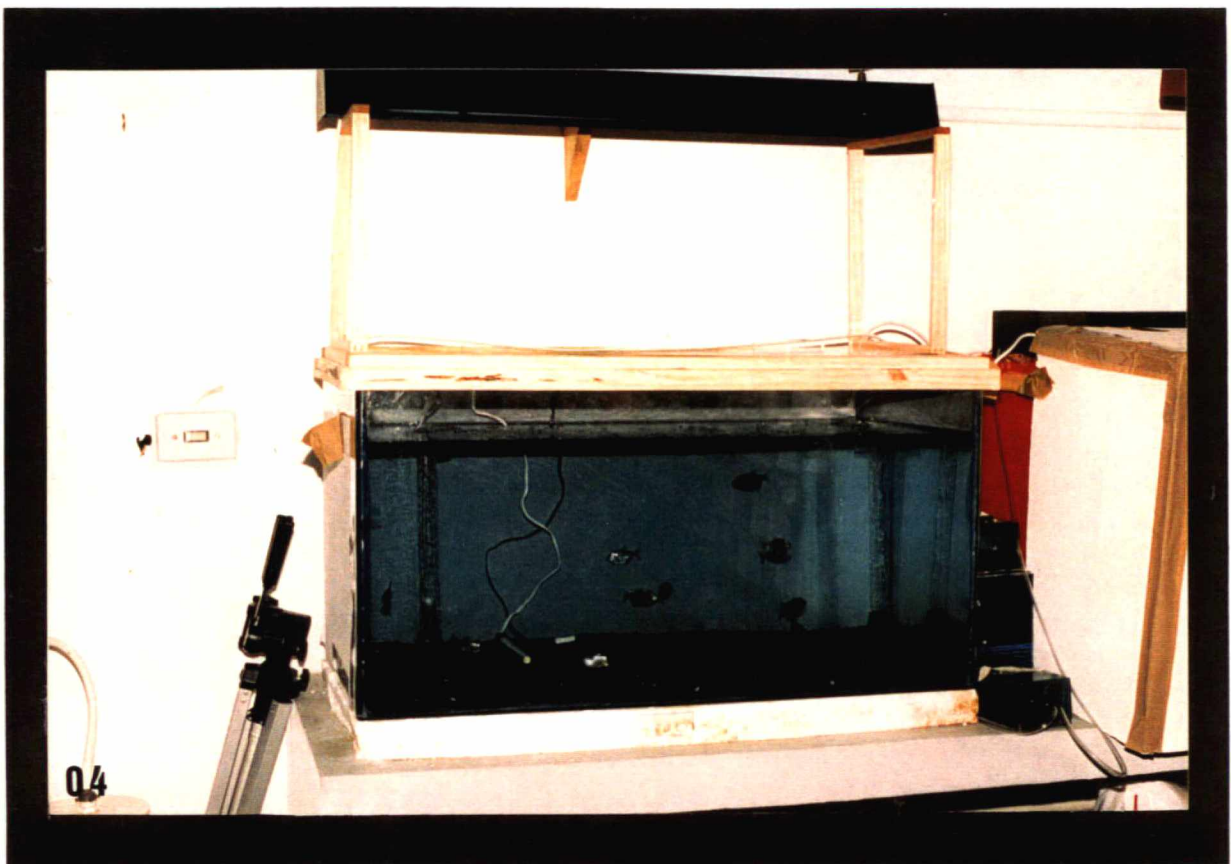
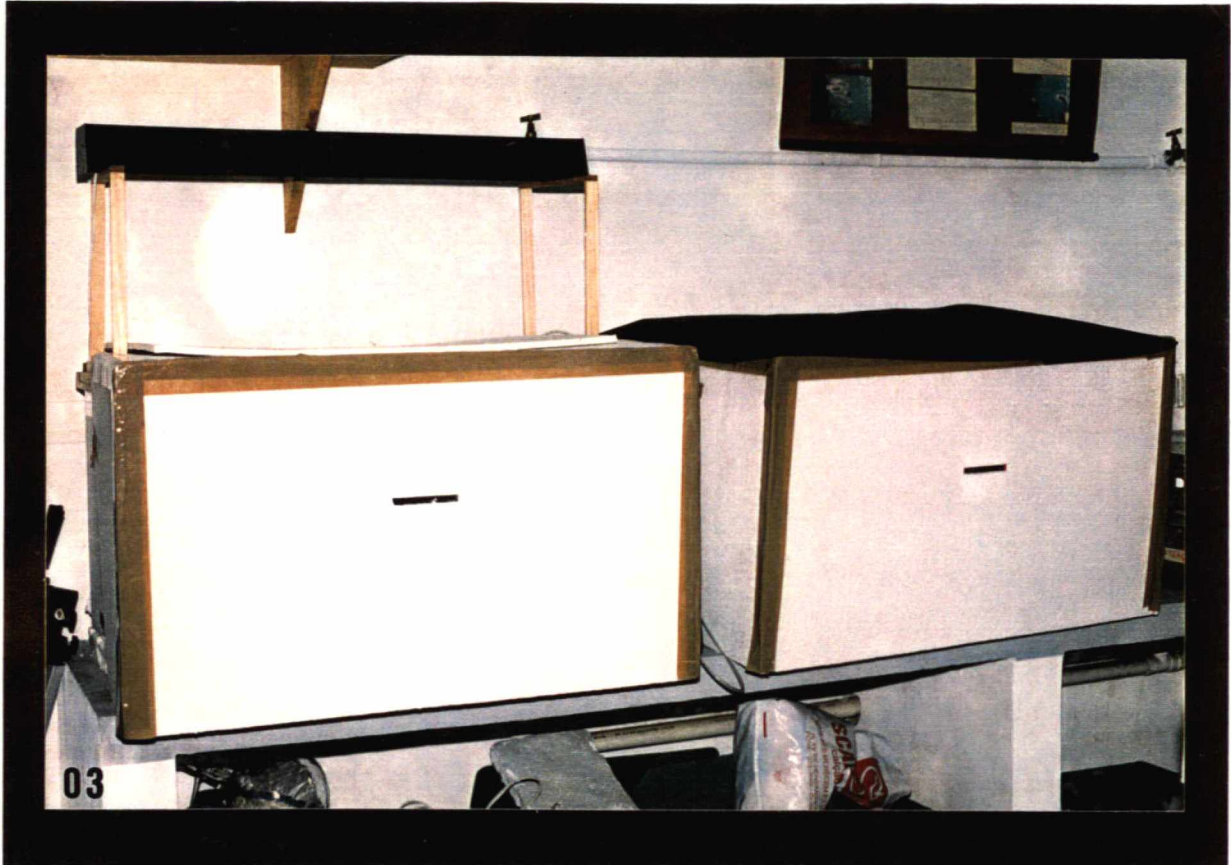
Fig. 01: *Metynnis roosevelti* Eigenmann, 1915 conhecido popularmente como pacu. Observar: a coloração característica em tons que vão do cinza esverdeado ao prateado, o formato oval do corpo e o globo ocular arredondado com pupila circular e íris apresentando uma coloração dourada - prateada brilhante .

Fig. 02: Aquário experimental submetido à luz vermelha e fundo vermelho. As faces laterais e posterior do aquário foram revestidas com papel Contact^(R) vermelho. A luz vermelha foi obtida através de um filtro (celofane vermelho) sob luminária " luz do dia " .



Fig. 03: Visão geral do experimento em andamento. Notar os anteparos com fenda de observação e a posição das lâmpadas em diferentes alturas para que a intensidade luminosa no fundo dos aquários seja a mesma.

Fig. 04: Aquário controle submetido à luz branca e fundo neutro. As faces laterais e posterior do aquário foram revestidas com papel cinza, considerado neutro.



4. RESULTADOS

4.1 - Morfologia retiniana

4.1.1 - Descrição anatômica e posição relativa dos olhos

Metynnis roosevelti possui a cabeça achatada lateralmente. Os olhos estão localizados centralmente na face lateral da cabeça do peixe com uma distância interocular de $0,6 \pm 0,2$ cm, o que corresponde a 30 - 35 % do comprimento da cabeça (Fig. 05).

O globo ocular possui o formato arredondado, sendo constituído pelas túnicas concêntricas que irão formar a parede do olho, além de estruturas como a córnea e o epitélio ciliar que fazem parte dos meios de refração (Fig. 06). A pupila em *M. roosevelti* é circular e a íris apresenta uma coloração dourada-prateada brilhante.

Os olhos estão situados na órbita, espaço piramidal de quadro lados, rodeado pelos ossos do crânio. De diâmetro, medem aproximadamente 0,5 cm e estão suspensos através de seis músculos oculares extrínsecos, o que permite o movimento livre do olho em volta do seu centro de rotação (Fig. 07).

Em *M. roosevelti* os músculos oculares são assimétricos e não se dispõem de maneira regular nos indivíduos da espécie, dificultando a identificação das regiões retinianas e a orientação durante o processo de inclusão.

O nervo óptico, formado pelas fibras aferentes da retina, tem a sua saída na região posterior do olho, no quadrante inferior direito (olho direito) ou inferior esquerdo (olho esquerdo) (Fig. 08).

4.1.2 - Camadas ou túnicas concêntricas do olho

M. roosevelti possui os olhos constituídos por três camadas ou túnicas concêntricas que irão formar basicamente a parede do olho (Fig. 09).

A camada externa, túnica fibrosa ou corneoescleral, é formada principalmente pela esclera que possui o aspecto esbranquiçado ou opaco. A esclera é constituída por uma grande quantidade de tecido conjuntivo denso, pouco vascularizado (Fig. 10). Apresenta internamente uma porção de cartilagem hialina com os condrócitos situados em lacunas (Fig. 09).

Já a camada média, túnica vascular ou úvea, é formada principalmente pela coróide (Fig. 09). A coróide é uma camada altamente vascularizada. Os vasos sanguíneos apresentam luz ampla e irregular e o seu diâmetro diminui à medida que se aproximam da retina (Fig. 11). Os espaços entre os vasos são preenchidos por tecido conjuntivo frouxo rico em melanócitos, o que dá à coróide uma coloração marrom (Fig. 11). A coróide está firmemente presa à retina, podendo desprender-se facilmente da esclera.

A camada mais interna ou camada da retina é formada pela retina neural e pelo epitélio pigmentar da retina. Essa camada reveste internamente a maior parte do globo ocular (Fig. 09).

4.1.3 - Retina

A retina de *Metynnis roosevelti* caracteriza-se por possuir basicamente três tipos celulares: as células epiteliais pigmentadas, os neurônios - entre eles as células fotorreceptoras - e as células de sustentação desses neurônios. Esses tipos celulares, organizam-se histologicamente em dez camadas. A nomenclatura utilizada foi segundo ROSS et al.(1993) e BURKITT et al. (1994): (1) epitélio pigmentar da retina, (2) camada de cones e bastonetes, (3) membrana limitante externa, (4) camada nuclear externa, (5) camada plexiforme externa, (6) camada nuclear interna, (7) camada plexiforme interna, (8) camada de células ganglionares, (9) camada de fibras do nervo

óptico e (10) membrana limitante interna (Figs. 12). Essas dez camadas formam uma estrutura biológica complexa com uma região nervosa bem desenvolvida e um epitélio pigmentar saliente.

A espessura da retina em *M. roosevelti* varia. É maior nas regiões laterais e menor no fundo do olho próximo à saída do nervo óptico (Figs. 13 e 14). A retina lateral apresenta a região da camada de fibras do nervo óptico (Fig. 13) em menor espessura que a retina de fundo (Fig. 14). Já a camada plexiforme interna é maior na retina lateral (Fig. 13) do que na retina de fundo (Fig. 14). Observa-se também uma pequena variação na espessura da camada de células pigmentares e da camada nuclear interna quando comparamos as duas regiões retinianas, sendo que, essas duas camadas são maiores na retina lateral (Figs. 13 e 14).

4.1.3 a - Fotorreceptores retinianos

A estrutura e o arranjo das células fotorreceptoras na retina de *M. roosevelti* foram estudados através de técnicas de microscopia óptica e de microscopia eletrônica. A retina caracteriza-se por ser dupla, isto é, possui como células fotorreceptoras os cones e os bastonetes.

Os cones apresentam uma variabilidade morfológica e podem ser classificados em cones simples e cones duplos. Todos os tipos caracterizam-se por possuírem forma alongada e dois segmentos distintos: um segmento interno e o outro externo, que variam em altura e morfologia.

Os cones duplos em *M. roosevelti* podem ser chamados de cones gêmeos ou cones duplos simétricos, pois consistem de duas metades do mesmo tipo e tamanho fusionadas ao longo dos seus segmentos internos (Fig. 15a). Esses segmentos se coram de maneira idêntica com hematoxilina - eosina (Fig. 15b) e novelli (Fig. 15c). Os segmentos externos nos cones duplos são em número de dois, tendo cada um a sua saída na parte apical de cada

metade do segmento interno e se caracterizam por serem estruturas finas e delicadas (Figs. 15b e 15c).

Os núcleos dos cones duplos localizam-se na camada nuclear externa, próximos aos segmentos internos, não se observando uma separação citoplasmática entre o segmento interno e os núcleos (Fig. 16). Cada cone duplo possui dois núcleos, cada um correspondendo a uma metade do segmento interno. Os núcleos estão dispostos em uma fileira logo abaixo da membrana limitante externa (Fig. 16). Quando comparados com os núcleos dos bastonetes, verificamos que os dos cones duplos coram-se mais levemente, são maiores e mais ovais que os dos bastonetes (Fig. 16).

Os cones simples são classificados de acordo com o seu tamanho em simples curtos (Fig. 17) e simples longos (Fig. 17). São menores e mais afilados que os cones duplos. Os cones simples longos e curtos apresentam os segmentos internos menores e mais delicados que os segmentos internos dos cones duplos (Figs. 17).

Analisando a posição da região basal do segmento interno dos cones simples e dos duplos em relação à membrana limitante externa, notamos que a região basal do segmento interno dos cones simples curtos localiza-se em posição inferior à região basal do segmento interno dos cones duplos (Fig. 17). Por sua vez, a região basal dos segmentos internos dos cones simples longos possuem a mesma altura que a dos cones duplos (Fig. 17).

Em ambos os tipos de cones simples - longos e curtos - os segmentos externos não passam de estruturas delicadas e finas que possuem a sua saída na região apical do segmento interno de cada cone simples, sendo, portanto, semelhante aos segmentos externos dos cones duplos.

Os cones simples longos e os cones simples curtos possuem um núcleo oval, localizado na camada nuclear externa logo abaixo da membrana limitante externa (Fig. 16).

Os segmentos externos dos cones duplos e dos cones simples são de difícil visualização pois muitas vezes podem ser confundidos com os segmentos externos dos bastonetes, ou estar encobertos por pigmentos de melanina na camada pigmentar da retina.

Em ambos os tipos de cones, os duplos e os simples, observa-se um delgado prolongamento ou fibra externa que se estende da região do núcleo de cada cone até a camada plexiforme externa, onde acaba no pedículo, terminação sináptica espessa com ramificações laterais (Fig. 18).

Sob o ponto de vista ultraestrutural, ambos os tipos de cones são fundamentalmente similares. O segmento externo consiste de uma pilha de discos bимembranosos ou sáculos de membranas duplas na forma de discos ou lamelas. Essas lamelas são paralelas e estão orientadas transversalmente ao eixo dos cones (Fig. 19). O interior desses discos membranosos em algumas regiões continuam com o espaço extracelular (Fig. 19). Processos caliciais estendem-se da extremidade distal do segmento interno e circundam a base do segmento externo (Fig. 20).

Os diferentes tipos de cones presentes na retina de *M. roosevelti* estão arranjados na forma de mosaico em quadra. Cada unidade padrão consiste de quatro cones duplos rodeando um cone simples. Pode-se dizer que cada cone simples está separado do seu vizinho pelos cones duplos e se localiza no centro e nos cantos da quadra (Figs. 21a , 21b, 21c).

Os bastonetes em *M. roosevelti* são células fotorreceptoras mais altas que os cones e são estruturas regularmente uniformes em aparência mas podem variar muito de acordo com a região retiniana analisada, sendo maiores nas regiões laterais. Cada bastonete é constituído de um segmento externo e de outro interno (Fig. 22).

Os segmentos externos são estruturas longas, frágeis e cilíndricas com a sua porção externa vertical voltada para as camadas retinianas (Fig. 23). São de difícil visualização pois estão recobertos por pigmentos de melanina presentes na camada pigmentar, além de estarem misturados com os segmentos externos dos cones.

Em ultraestrutura, os segmentos externos dos bastonetes tem semelhança com os cones, ou seja, consistem de sáculos de membrana dupla na forma de discos que possuem

um diâmetro uniforme (Figs. 24a, 24b). Essas membranas duplas na forma de discos não possuem continuidade com o espaço extracelular (Fig. 24b).

Os núcleos dos bastonetes estão localizados em diferentes posições na região mediana da camada nuclear externa. São menores, em maior número e se coram mais fortemente quando comparados com os núcleos dos cones (Fig. 25).

4.1.3 b - Conexões neuronais

A retina de *M. roosevelti* é uma matriz complexa de neurônios. Os mesmos formam interconexões entre as células fotorreceptoras e os neurônios aferentes reunidos para constituir o nervo óptico. Como neurônios retinianos além das células fotorreceptoras, temos as células bipolares, as amácrinas, as horizontais e as células ganglionares. Estas constituem um conjunto de células nervosas com muitas conexões laterais.

A maioria dos neurônios da retina estão arranjados em maior ou menor regularidade na camada nuclear interna e os contactos sinápticos estão confinados às duas camadas plexiformes, sendo que na externa temos os primeiros contactos sinápticos do sistema visual. Essa camada é, em espessura, menor que a interna (Fig. 26).

A camada plexiforme externa é a região de contactos sinápticos entre as células fotorreceptoras e as células horizontais e bipolares. As células horizontais possuem na sua porção do pericário, que está voltada para as células fotorreceptoras, numerosos dendritos curtos (Fig. 27). Cada tufo dendrítico está unido a um único pedículo do cone (Fig. 27). As células bipolares fazem sinapses com as células fotorreceptoras, havendo a formação de uma vesícula sináptica volumosa (Figs. 28a, 28 b).

A camada plexiforme interna é constituída pela interação sináptica entre as células bipolares, as amácrinas e as ganglionares (Fig. 29). Nessa região observa-se numerosas vesículas sinápticas, além dos prolongamentos das células nervosas citadas (Fig. 29).

Os axônios que contém o corpo celular das células bipolares, horizontais e amácrinas estão localizados na camada nuclear interna e aparentemente há uma certa organização na disposição dessas corpos celulares. Essa organização se inicia pelas células horizontais que ficam próximas a camada plexiforme externa vindo em seguida os corpos celulares das células bipolares e amácrinas.

As células ganglionares (Fig. 30) estão localizadas logo abaixo da camada plexiforme interna constituindo a camada de células ganglionares. As células ganglionares possuem os seus dendritos ligados às terminações das células bipolares e amácrinas na camada plexiforme interna. O seu pericário está localizado na camada de células ganglionares.

Entre os elementos de sustentação de origem neuroglial existentes na retina de *M. roosevelti* temos as células de Müller (Fig. 31) que possuem os seus núcleos localizados na camada nuclear interna. Os processos citoplasmáticos das células de Müller estendem-se por toda a membrana limitante interna (Fig. 31) e as suas extremidades apicais fazem contato com as células fotorreceptoras, isto é, os cones e os bastonetes.

4.1.3 c - Epitélio Pigmentar

Em *M. roosevelti* o epitélio pigmentar representa a camada mais externa da retina visual. Está localizado entre a coróide e a retina neural e apresenta uma coloração escura devido a presença de pigmentos de melanina nas suas células (Fig. 32).

A face basal ou esclérica do epitélio pigmentar repousa na lâmina basal, que representa a camada mais interna da membrana de Bruch (Fig. 33a). A membrana de Bruch é rica em fibras colágenas (Fig. 33b) e une o epitélio pigmentar na coróide.

O epitélio pigmentar da retina de *M. roosevelti* consiste de uma camada única de células colunares.

O núcleo das células epiteliais possui localização basal, levemente alongado e envolvido por uma membrana típica dupla (Figs. 34a e 34b). A cromatina nuclear é clara com alguns fragmentos densos (Fig. 34b). Mitocôndrias estão localizadas principalmente na porção basal das células pigmentares, acima do núcleo. Caracterizam-se morfologicamente por serem estruturas longas, tipo bastonetes e algumas vezes mais arredondadas (Fig. 35). Próximo à região nuclear observamos um complexo juncional formado por desmosomas com a função de unir uma célula à outra (Fig. 36).

A região apical das células pigmentares apresenta numerosos processos digitiformes que se estendem do ápice da célula em direção às células fotorreceptoras (Fig. 37). Os segmentos externos das células fotorreceptoras estendem-se para o interior desses processos mas não entram em contato direto com eles (Fig. 37). Não foram encontradas junções especializadas unindo as células epiteliais e as células fotorreceptoras.

O citoplasma das células pigmentares é preenchido por inúmeros grânulos ou pigmentos de melanina, de forma variada, entre elas a elíptica e a arredondada (Fig. 38). Os melanossomos possuem a forma de bastão e estão alinhado com o eixo dos processos digitiformes e às células fotorreceptoras (Fig. 38).

O epitélio pigmentar em *M. roosevelti* sofre trocas posicionais de seus pigmentos de melanina. Verifica-se que no escuro os pigmentos de melanina agregam-se na base coroidal das células epiteliais pigmentares, expondo assim os segmentos externos dos bastonetes (Fig. 39). Na luz, os movimentos ocorrem ao inverso e os pigmentos de melanina se dispõem ao longo das projeções apicais das células epiteliais pigmentares protegendo os segmentos externos das células fotorreceptoras (Fig. 40). Esse fenômeno ocorre de maneira gradual, havendo estágios intermediários entre a adaptação à luminosidade e à escuridão.

A pigmentação do epitélio pigmentar é mais densa nas regiões retinianas laterais. Entretanto os pigmentos de todas as regiões são capazes de migrar como resposta à iluminação ou obscuridade.

4.2 - Ação da luz vermelha na retina de *M. roosevelti*

Tanto utilizando técnicas de microscopia óptica como de microscopia eletrônica não se observou variações morfológicas significativas nas células fotorreceptoras nem nas células nervosas dos indivíduos mantidos na luz vermelha se comparados com indivíduos mantidos em luz branca. Isso se refere à espessura das diferentes camadas retinianas, à afinidade pelos corantes citológicos, ao tamanho das células nervosas, ao arranjo e à estrutura das células fotorreceptoras.

Sob o ponto de vista funcional, a retina de *M. roosevelti* exposta à luz vermelha apresenta, uma maior migração de pigmentos de melanina na região apical das células presentes na camada do epitélio pigmentar da retina.

Comparando os tempos experimentais em luz vermelha e fundo vermelho com os de controles em luz branca e fundo neutro notamos que essa migração de pigmentos ocorre de uma maneira mais rápida nos experimentais.

No controle, submetido à luz branca, essa migração gradual estende-se de T_0 até 8 horas após a exposição à luz branca (Figs. 41b, 42b, 43b, 44b), sendo que em T_0 os pigmentos de melanina estão distribuídos praticamente em toda a camada pigmentar da retina (Fig. 41b). Após 8 horas de exposição da retina à luz branca, os pigmentos de melanina ficam dispersos ao longo das projeções apicais das células pigmentares (Fig. 44b).

Quando submetida ao ambiente vermelho a retina apresenta uma migração de pigmentos de melanina gradual que se estende de T_0 até 4 horas após a exposição à luz vermelha (Figs. 41a, 42a, 43a). Em T_0 (Fig. 41a), como o observado no controle (Fig. 41b), os pigmentos de melanina se distribuem em toda a camada do epitélio pigmentar da retina. Após 4 horas de exposição à luz vermelha (Fig. 43a), temos uma grande agregação de pigmentos de melanina na região apical do epitélio pigmentar da retina, sendo que a região esclérica não possui pigmentos de melanina.

Comparando 4 horas de exposição à luz vermelha (Fig. 43a) com 4 horas de exposição à luz branca (Fig. 43b), notamos uma diferença significativa na distribuição dos pigmentos de melanina, sendo mais intensa na retina exposta à luz vermelha.

Em 8 horas de exposição à luz vermelha (Fig. 44a), observamos, quando comparamos com 4 horas de exposição (Fig. 43a), que os grânulos de melanina não estão mais concentrados na região apical das células epiteliais. Eles estão dispersos em toda a camada do epitélio pigmentar da retina, como os encontrados em T_0 tanto no experimental (Fig. 41a) como no de controle (Fig. 41b), porém com uma menor intensidade.

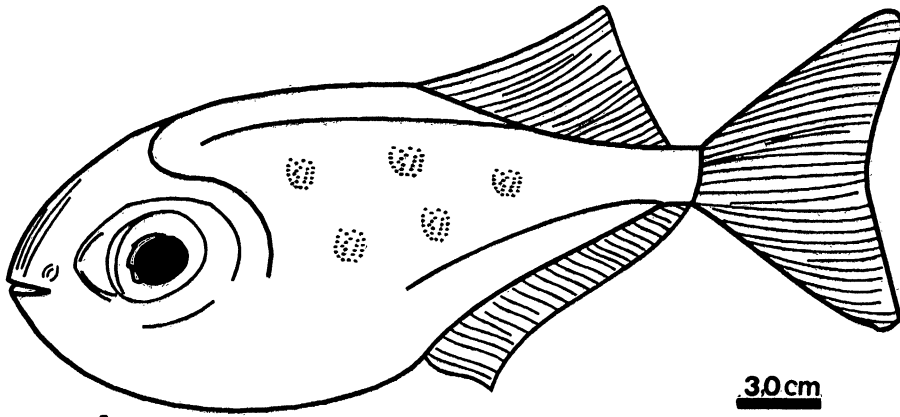
Comparando 8 horas de exposição à luz vermelha (Fig. 44a) com 8 horas de exposição à luz branca (Fig. 44b), verificamos uma diferença na dispersão dos pigmentos de melanina. No primeiro caso, a retina apresenta características de uma retina adaptada ao escuro, isto é, os pigmentos de melanina estão dispersos na camada epitelial, iniciando uma maior concentração de pigmentos na região esclérica do epitélio pigmentar. No segundo caso, após 8 horas de exposição à luz branca, temos uma retina adaptada à luz, sendo que os pigmentos de melanina estão concentrados na região apical das células epiteliais.

A exposição da retina tanto à luz vermelha como à luz branca após 24 horas (Figs. 45a, 45b), 48 horas (Figs. 46a, 46b) e uma semana (Figs. 47a, 47b) apresentam o mesmo aspecto quando comparadas com a retina experimental e com a de controle em T_0 (Figs. 41a, 41b). Nesses tempos citados, temos uma retina que se caracteriza por possuir uma agregação de pigmentos de melanina na região esclérica, iniciando uma agregação de pigmentos na região apical das células epiteliais.

A análise em microscopia eletrônica de transmissão revela que na retina de animais mantidos no regime de luz vermelha, observa-se, no epitélio pigmentar, pacotes de membranas destacadas (Figs. 48, 49). Essas membranas são as extremidades dos segmentos externos das células fotorreceptoras que foram eliminados.

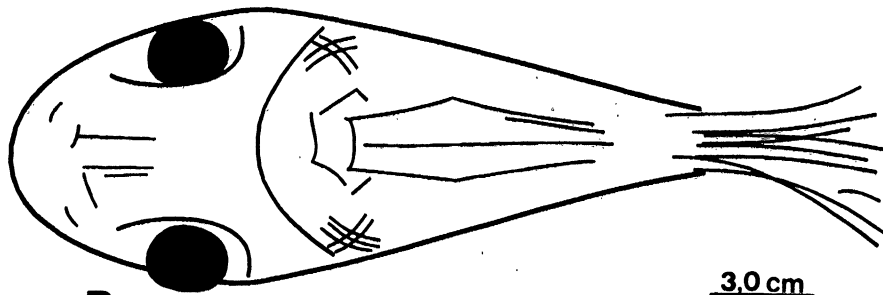
Membranas destacadas foram encontradas em qualquer região da retina, mas são mais freqüentes na borda apical ou vitreal das células epiteliais, na interface do epitélio retiniano e célula fotorreceptora.

A presença de membranas destacadas na retina de *M. roosevelti* só foi observada em animais mantidos sob a luz vermelha após uma semana de exposição. Não foram observadas membranas destacadas após 4 horas e 8 horas de exposição à luz vermelha bem como os de controles de uma semana e T₀.



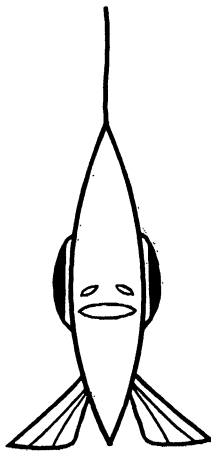
A

3.0cm



B

3.0 cm



C



C1



C2

15cm

05

Fig. 06: Desenho esquemático do olho cortado longitudinalmente que ilustra as suas estruturas internas (Modificado a partir de um desenho de CORMACK, 1991).

- | | | |
|------------|-----------------|-----------------|
| 1. Retina | 4. Corpo ciliar | 7. Córnea |
| 2. Coróide | 5. Cristalino | 8. Pupila |
| 3. Esclera | 6. Íris | 9. Nervo óptico |

Fig. 07: Desenho esquemático dos músculos oculares extrínsecos presentes na retina de *Metynnis roosevelti*. Os músculos extrínsecos são em número de seis, dentre os quais músculos superiores (**ms**); músculos inferiores (**mi**); músculo mediano (**mm**); e músculo lateral (**ml**). Como referencial de sua posição considera-se o nervo óptico (**NO**) e o cristalino (**C**).

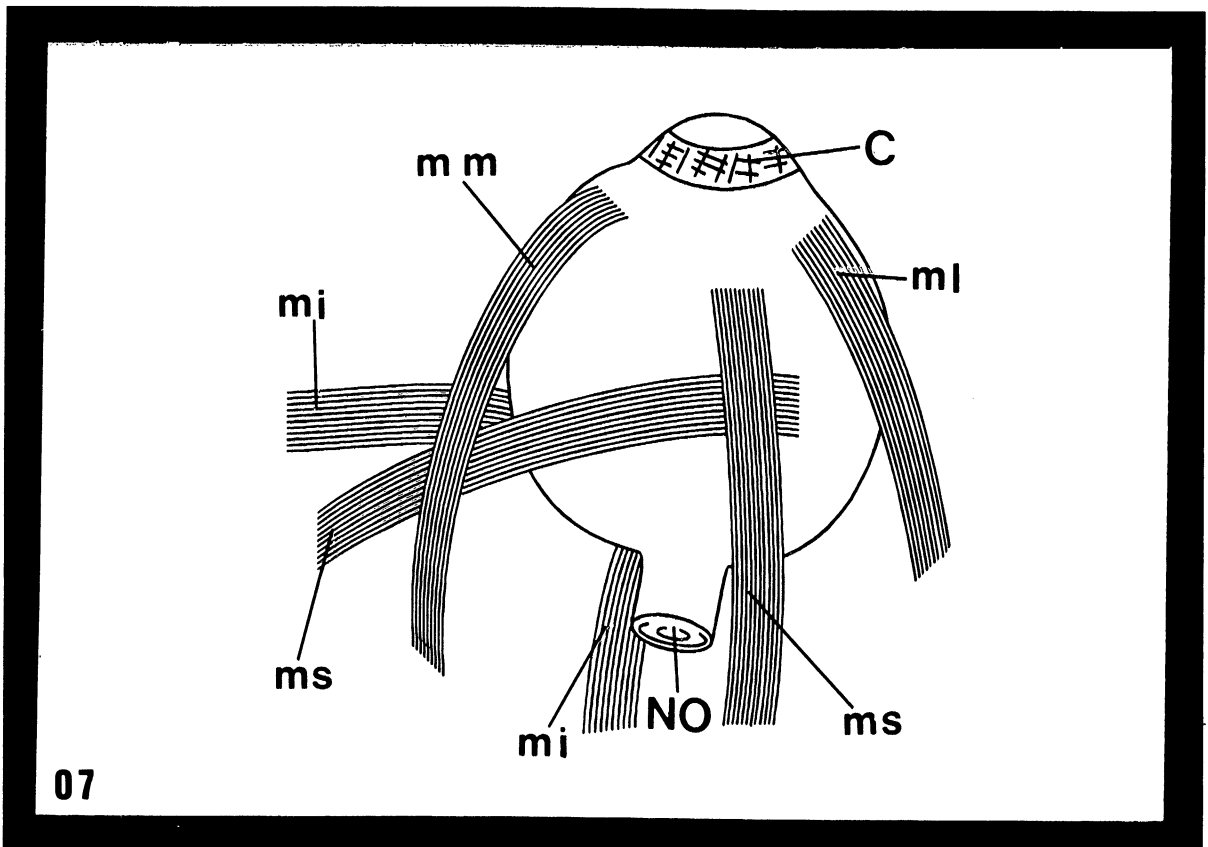
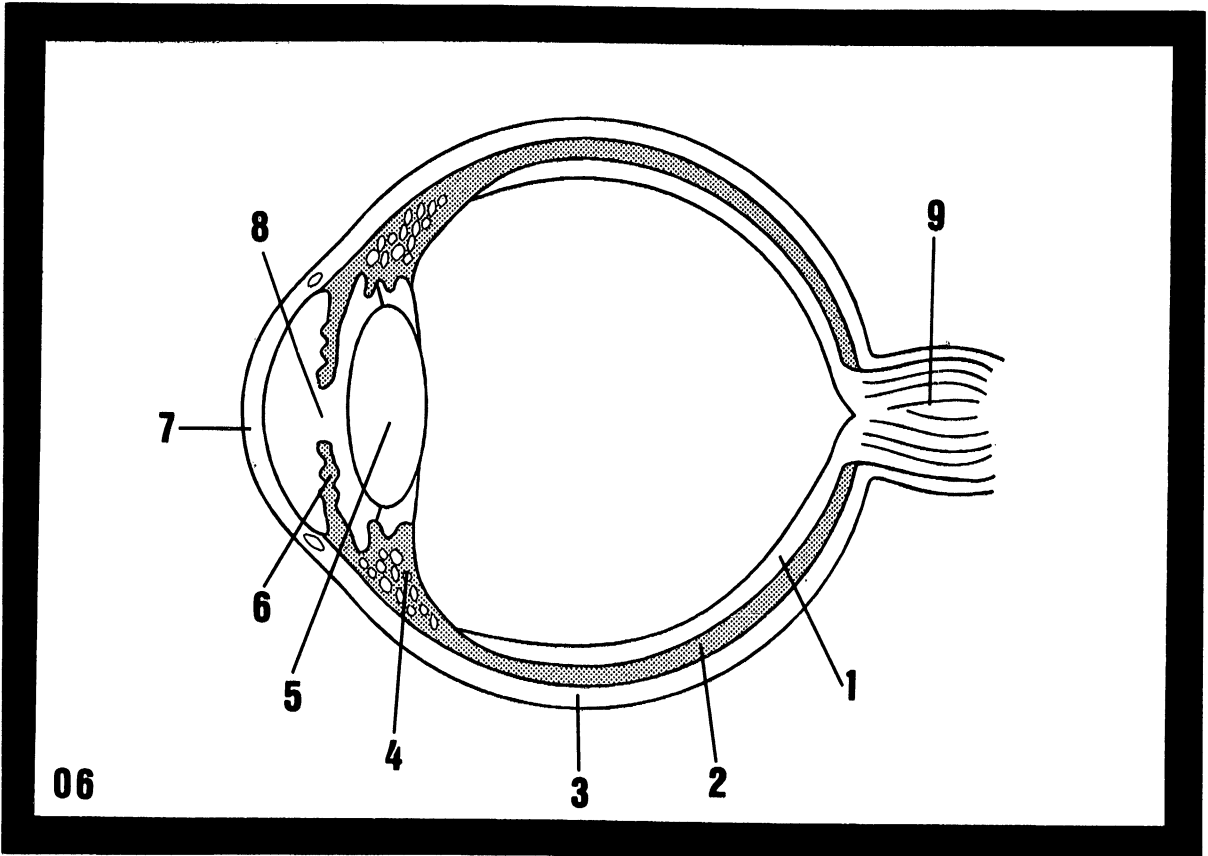


Fig. 08: Nervo óptico do olho esquerdo em corte longitudinal. O nervo óptico (**NO**) é formado pelas fibras aferentes da retina. Observar na retina a diferença de espessura na camada de fibras do nervo óptico (**FNO**). Coloração: Hematoxilina Férrica de Heidenhain. Aumento: 276 x

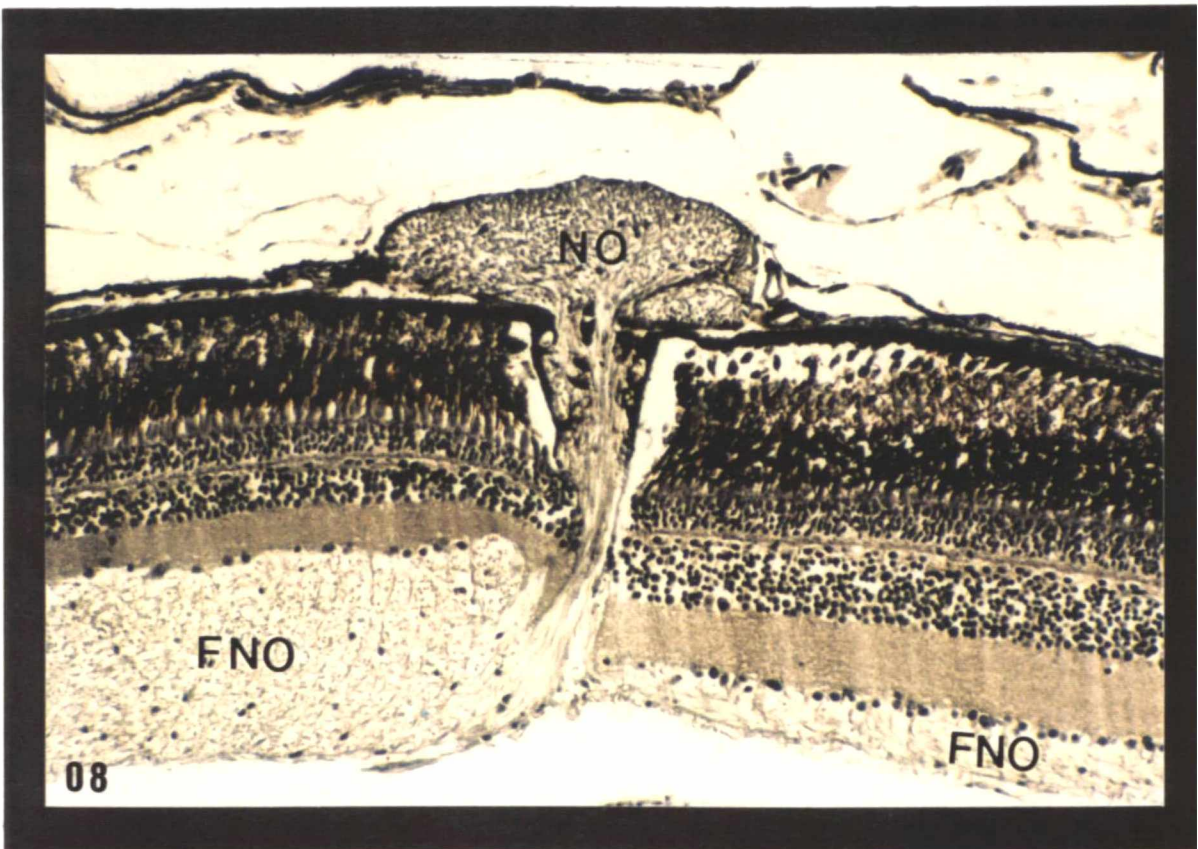


Fig. 09: Corte longitudinal das camadas ou túnicas concêntricas do olho. A camada externa é denominada de túnica fibrosa ou corneoescleral (**1**), formada internamente por cartilagem hialina (✱) com condrócitos situados em lacunas (⇕). A camada média é denominada de túnica vascular ou úvea formada principalmente pela coróide (**2**) rica em vasos sanguíneos (*) e a interna de camada da retina (**3**) formada pela retina neural (✱) e pelo epitélio pigmentar da retina (★). Coloração: PAS . Aumento: 552 x

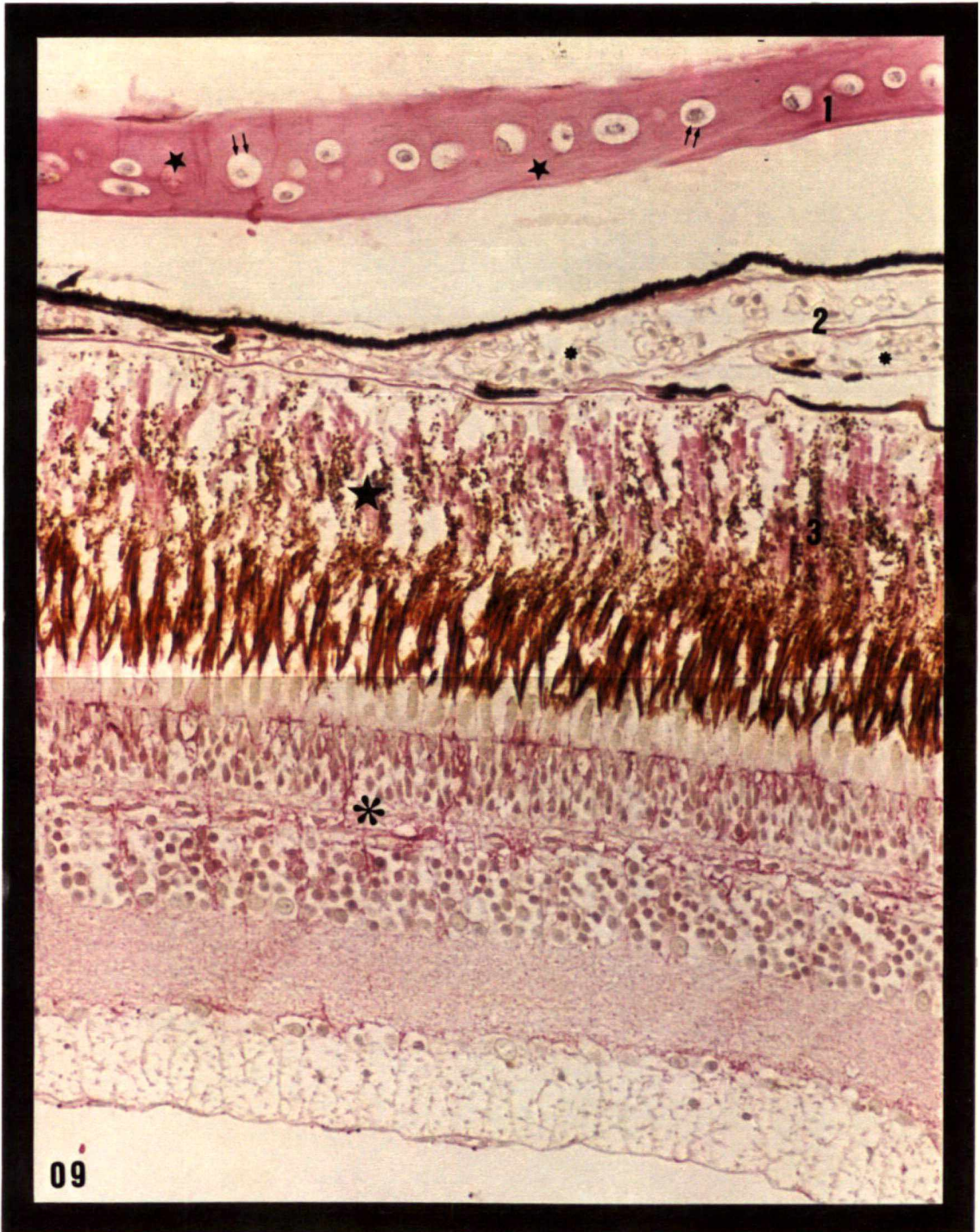


Fig. 10: Microscopia eletrônica de varredura da esclera. A esclera que possui o aspecto esbranquiçado é constituída por uma grande quantidade de tecido conjuntivo denso (▲). Observar a presença de vasos sanguíneos (➡). Aumento: 487 x

Fig. 11: Vasos sanguíneos (★) presentes na coróide. Observar o tecido conjuntivo frouxo rico em melanócitos (➡) existente entre os vasos sanguíneos. Coloração: Tricrômico de Mallory. Aumento: 552 x

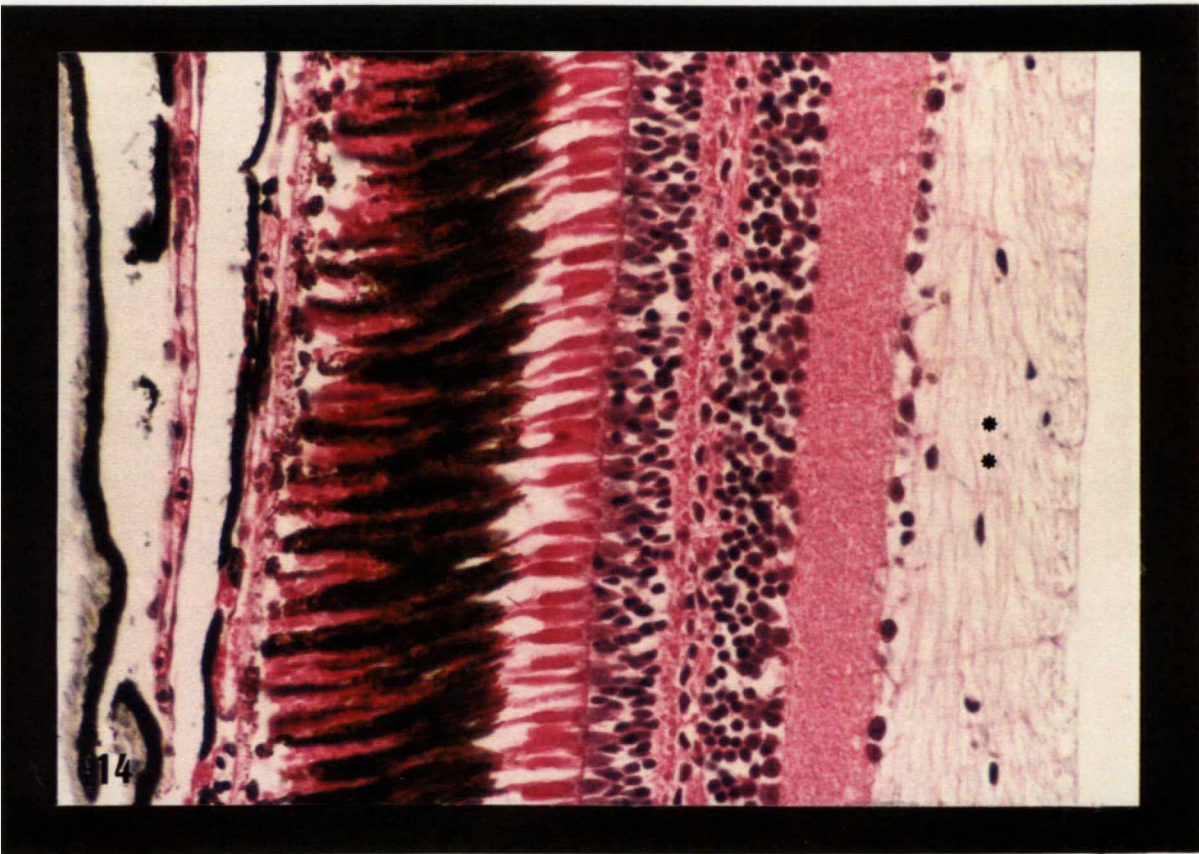
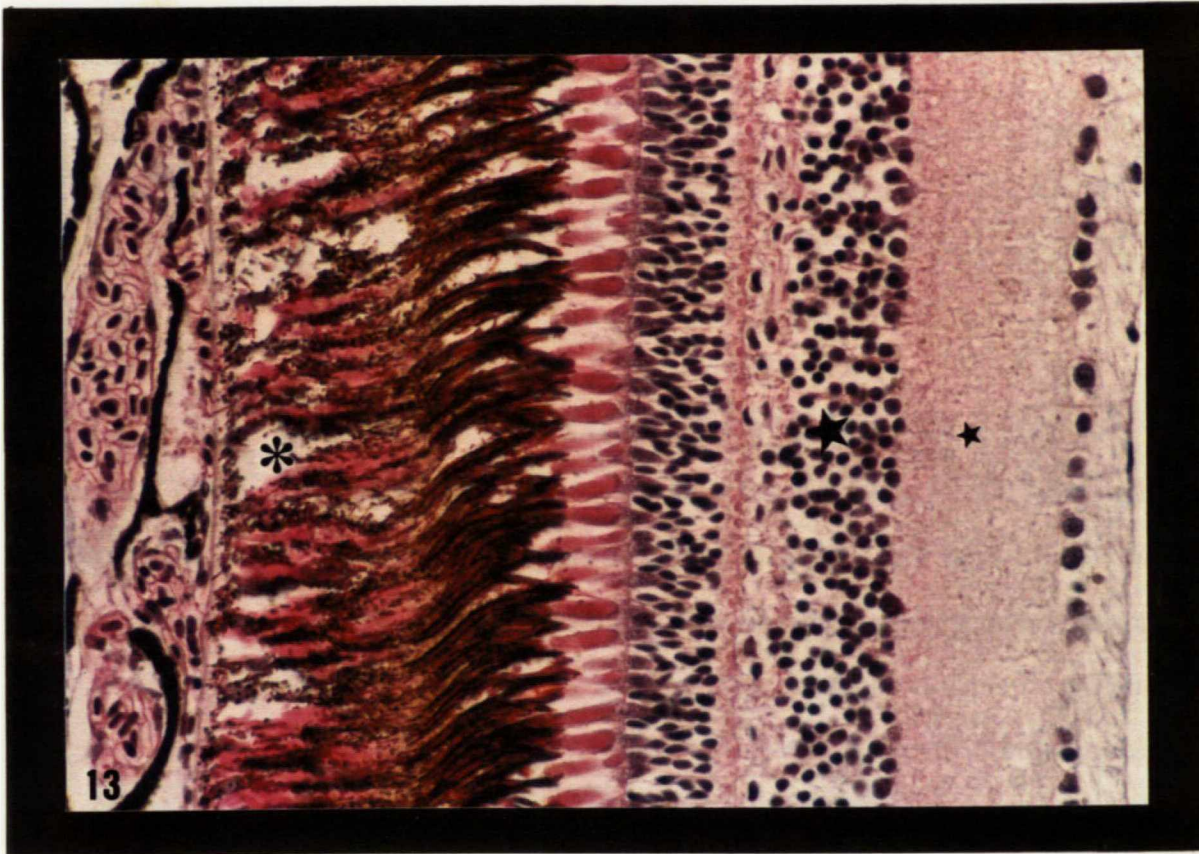


Fig. 15a: Microscopia eletrônica de varredura de um cone duplo (**CD**). Observar o segmento interno (**Si**), formado por dois isômeros fusionados e o segmento externo (**SE**) que têm a sua saída na parte apical de cada isômero. Ao fundo, notar a presença de um cone simples ou um cone duplo em vista lateral (★) e bastonetes (✱). Observar a presença de artefatos de técnica (▼). Aumento: 6.500 x

Fig. 15b: Fotomicrografia dos cones duplos (**cd**). Observar o segmento interno (**si**) e o segmento externo (**se**). Notar que o segmento interno (**si**) possui os seus isômeros corados de forma homogênea. Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 1.379 x

Fig. 15c: Fotomicrografia dos cones duplos (**cd**). Observar a reação positiva para mitocôndrias nos segmentos internos (**si**) dos elipsóides dos cones. Notar que o segmento interno (**si**), como em 15b possui os seus isômeros corados de forma homogênea. Coloração: Técnica de Novelli. Aumento: 1.379 x

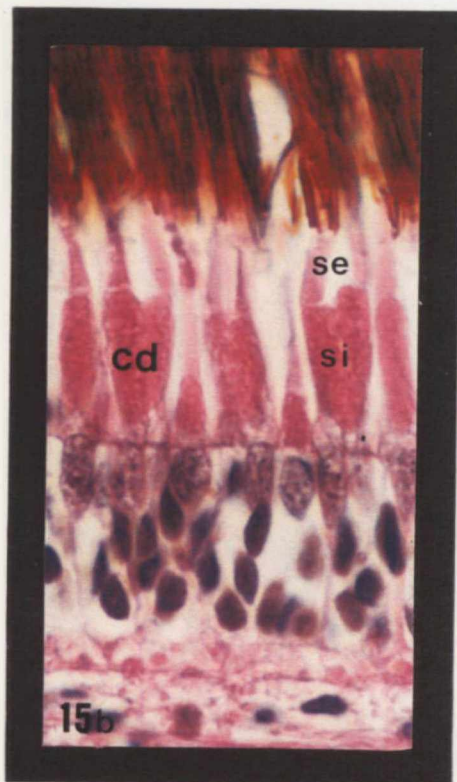


Fig. 16: Corte longitudinal aos segmentos internos (**si**) e segmentos externos (**se**) dos cones. Observar a camada nuclear externa, formada pelos núcleos dos cones duplos (******), dos cones simples (**★**) e dos bastonetes (**⇌**). Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 1.379 x

Fig. 17: Cones simples curtos (*****), cones simples longos (**★**) e cones duplos (**★**). Observar a região basal do segmento interno dos cones simples curtos (**→**) e cones simples longos (**→**) em relação à região basal dos cones duplos (**→**) e à membrana limitante externa. Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 1.379 x

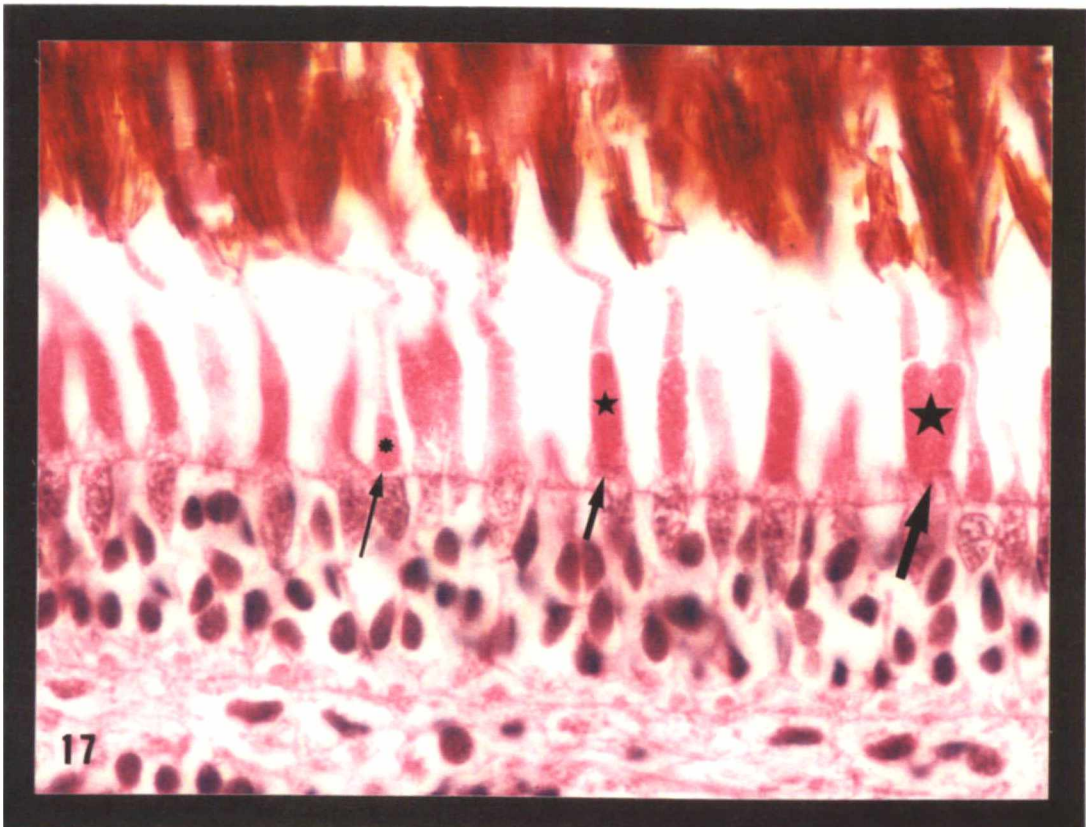
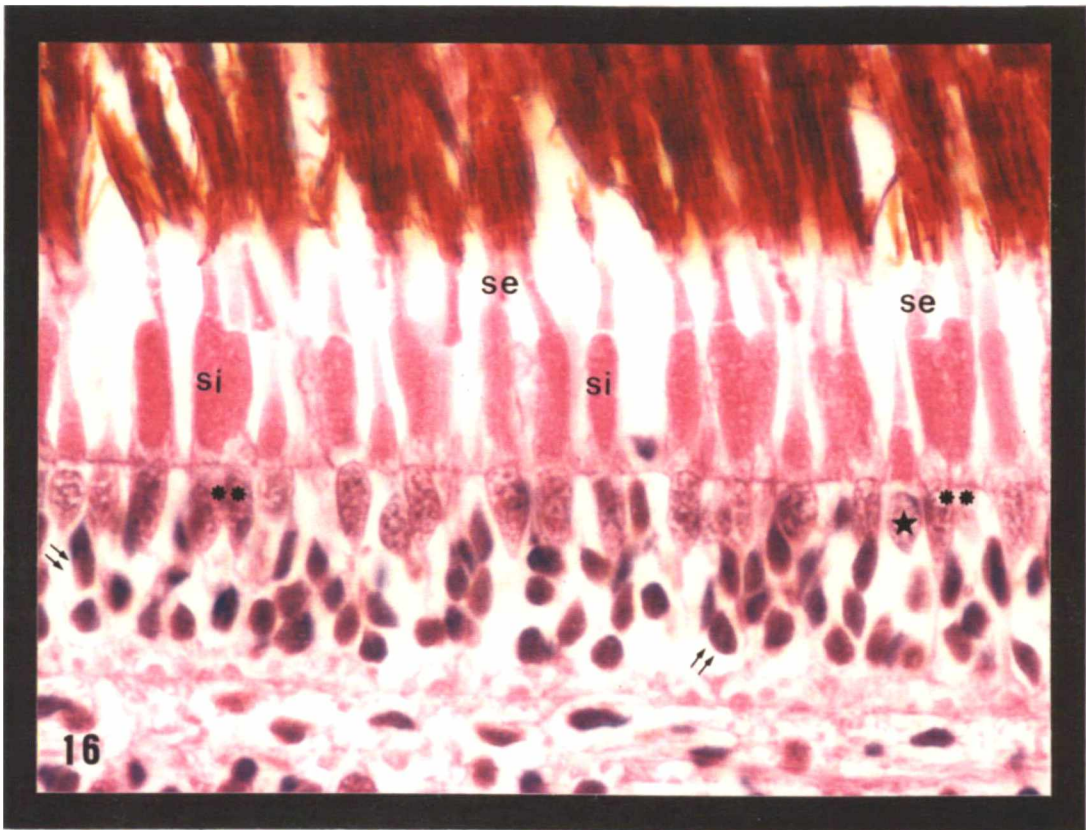


Fig. 18: Fotomicrografia da fibra interna (⇔), presente nos cones, que se estende da região do núcleo (★) de cada cone até a camada plexiforme externa (*). A fibra interna acaba em uma terminação sináptica denominada de pedículo (→*→). Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 1.993 x

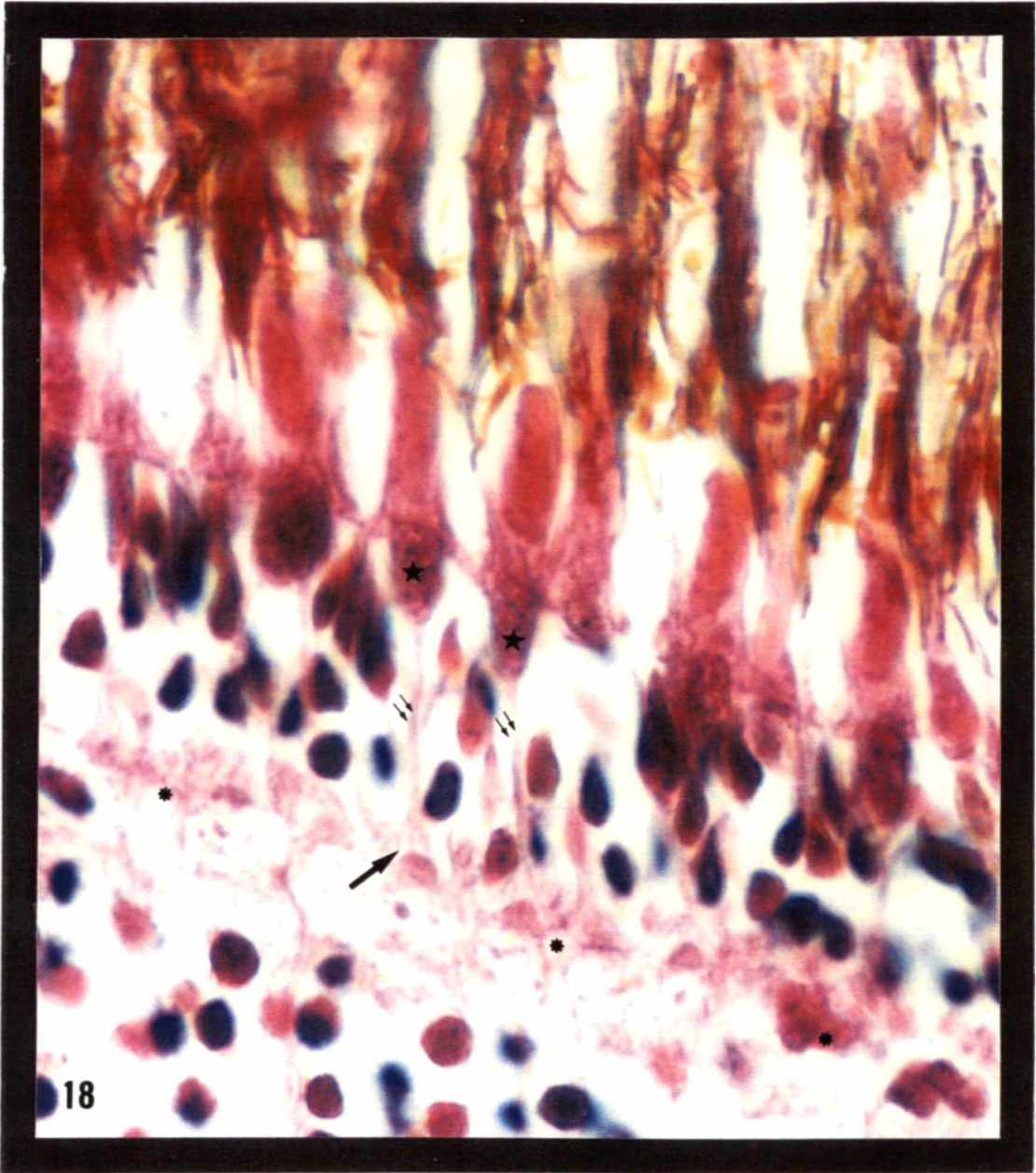



Fig. 19: Segmento interno (**si**) e segmento externo (**se**) de um cone simples. Observar as membranas em forma de discos que possuem continuidade com o espaço extracelular (). Aumento: 21.000 x

Fig. 20: Segmento interno (**si**) e segmento externo (**se**) de um cone duplo. Observar os processos caliciais (**pc**) circundando o segmento externo e os pigmentos de melanina (**pm**) presentes nas células epiteliais. Aumento: 6.000 x

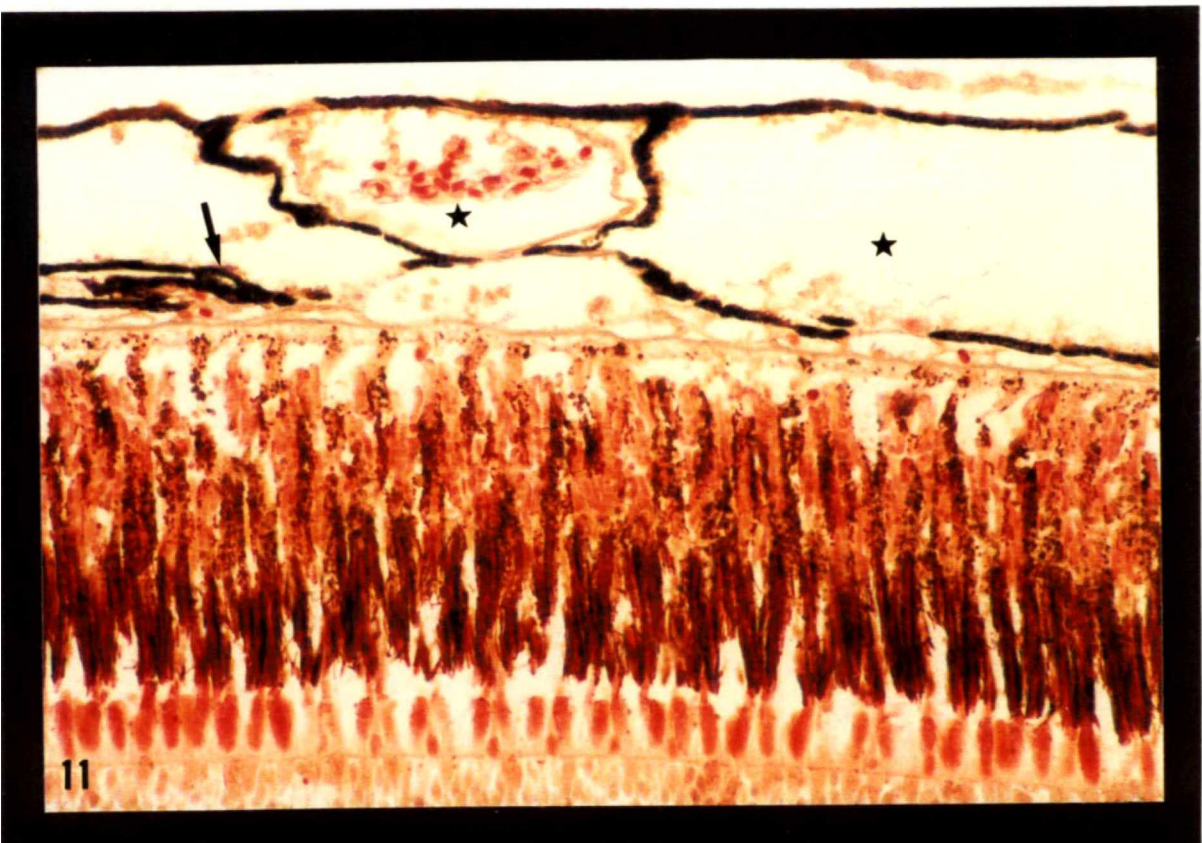
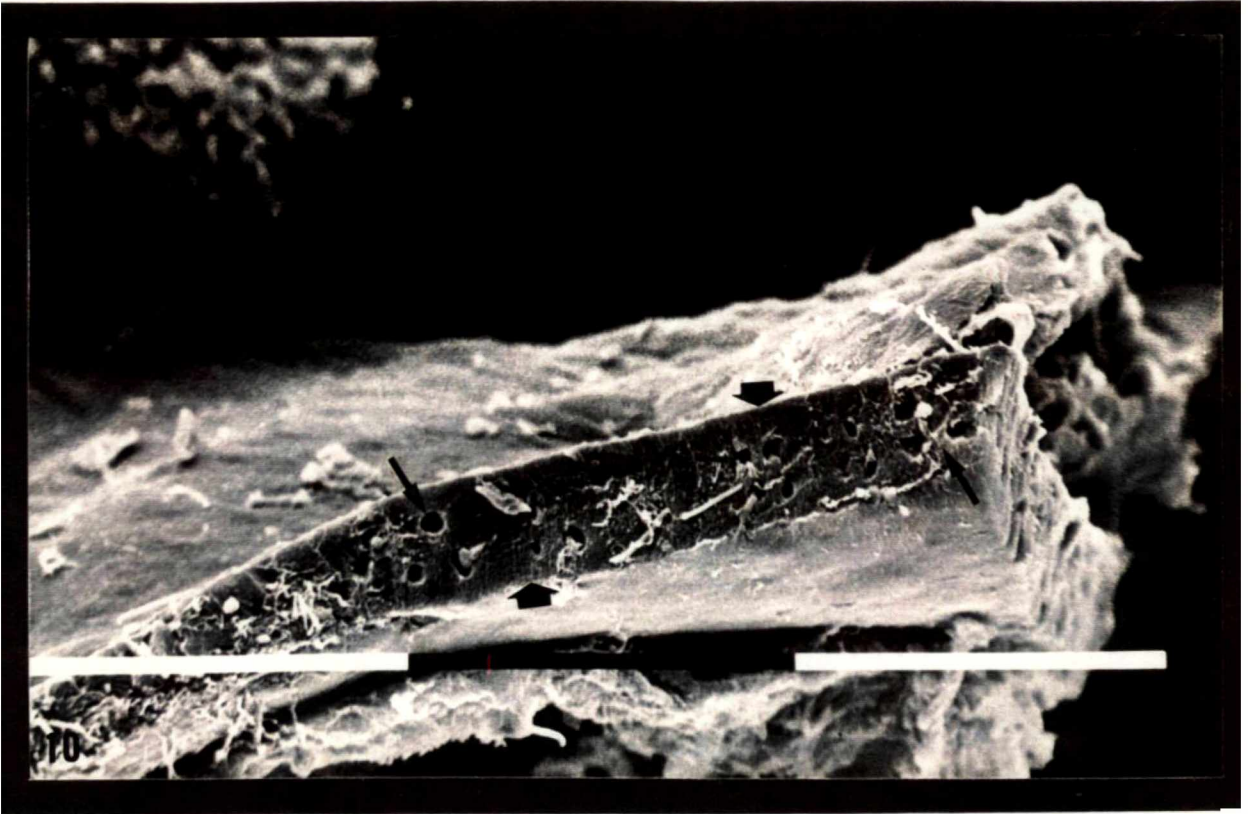


Fig. 12: Camadas da retina em corte longitudinal às células fotorreceptoras. Observar a esclera (★) e a coróide (✱). Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

1. Epitélio pigmentar
2. Camada de cones e bastonetes
3. Membrana limitante externa
4. Camada nuclear externa
5. Camada plexiforme externa
6. Camada nuclear interna
7. Camada plexiforme interna
8. Camada de células ganglionares
9. Camadas de fibras do nervo óptico
10. Membrana limitante interna

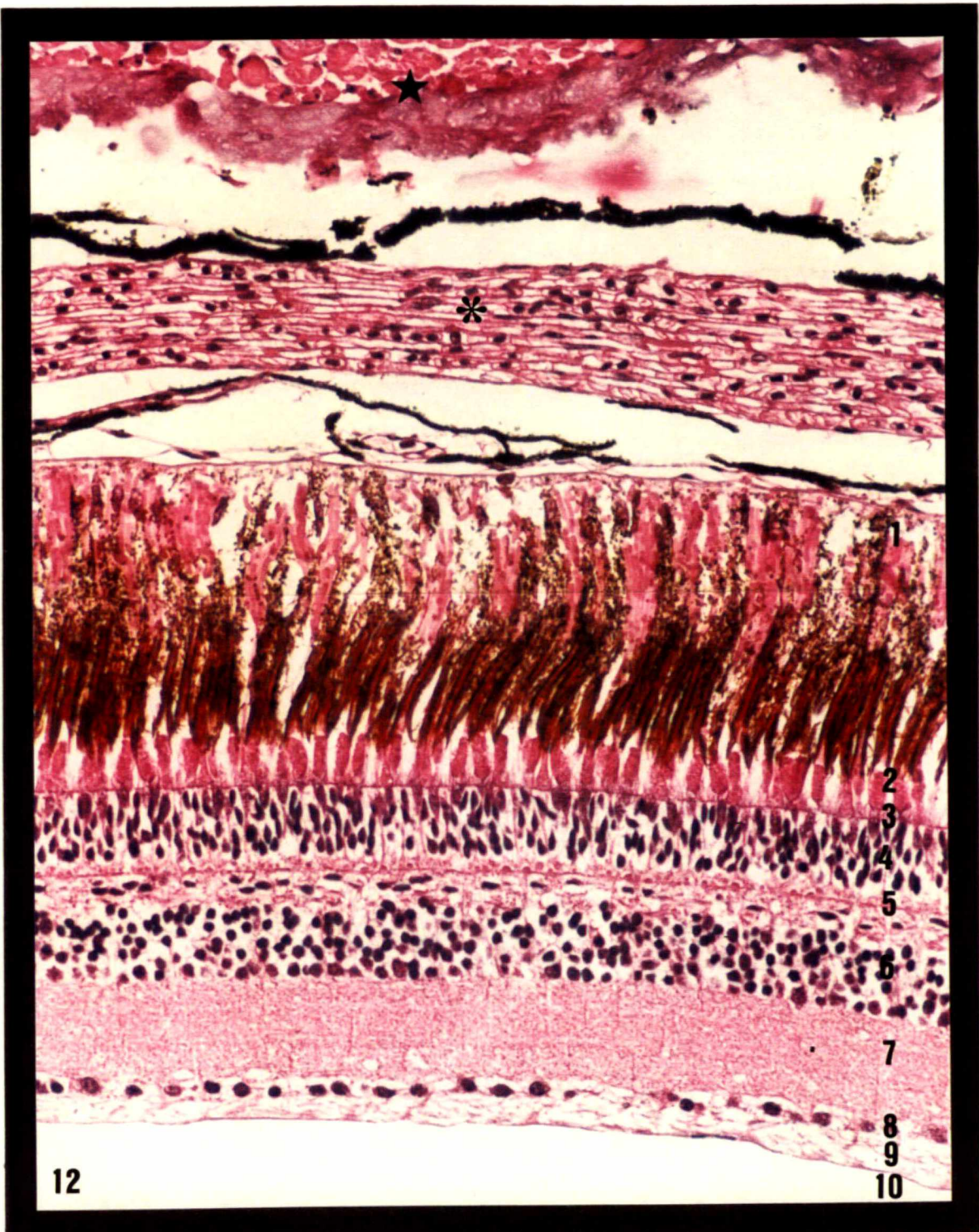


Fig. 13: Região lateral da retina de *M. roosevelti*. Comparar com a Fig. 14 e observar que a camada plexiforme interna (★); camada de células epiteliais (✱); e camada nuclear interna (★) são maiores que na região de fundo da retina. Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

Fig. 14: Região de fundo da retina de *M. roosevelti*. Comparar com a Fig. 13 e observar que a camada de fibras do nervo óptico (* *) é maior que na região lateral. Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

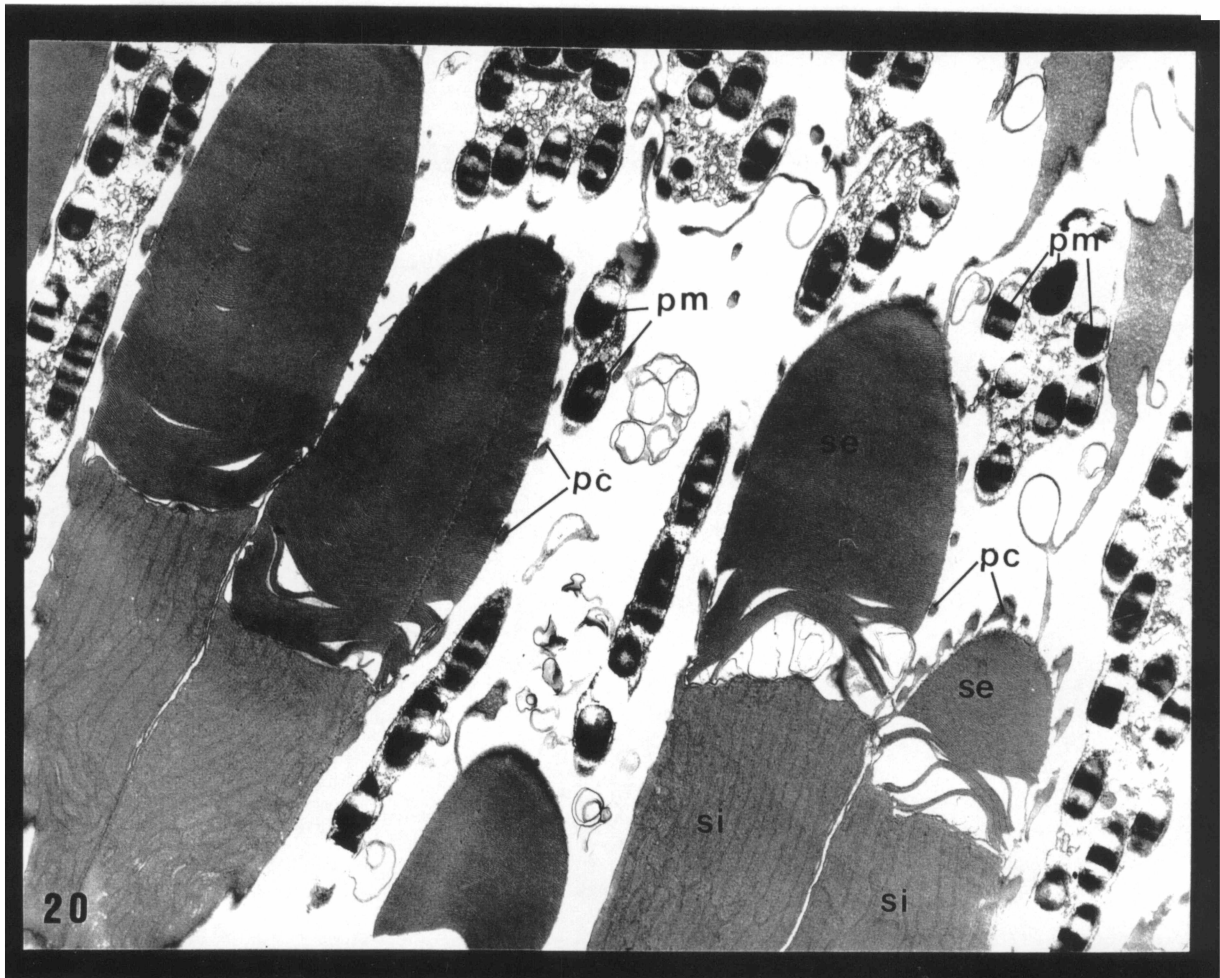
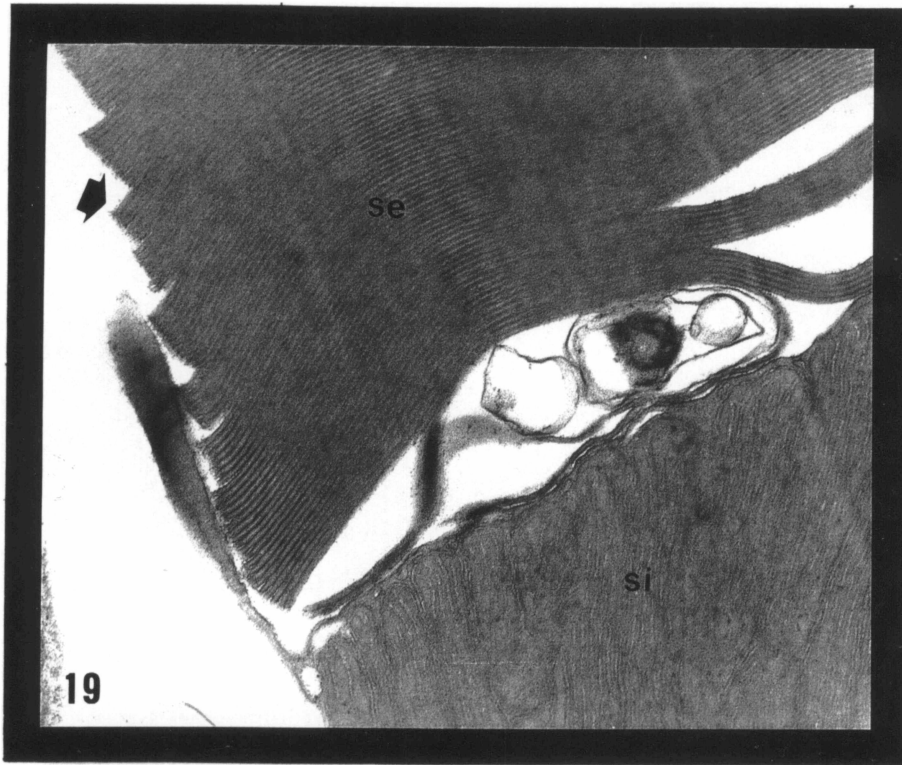


Fig. 21a: Corte transversal aos segmentos internos dos cones. Notar o arranjo dos cones simples (—) e dos cones duplos (⇔) na forma de um mosaico em quadra. Observar o epitélio pigmentar da retina (★) e a camada nuclear externa (✱). Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

Fig. 21b: Detalhe do arranjo dos cones simples (→) e dos cones duplos (**) na forma de mosaico em quadra. Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 1.379 x

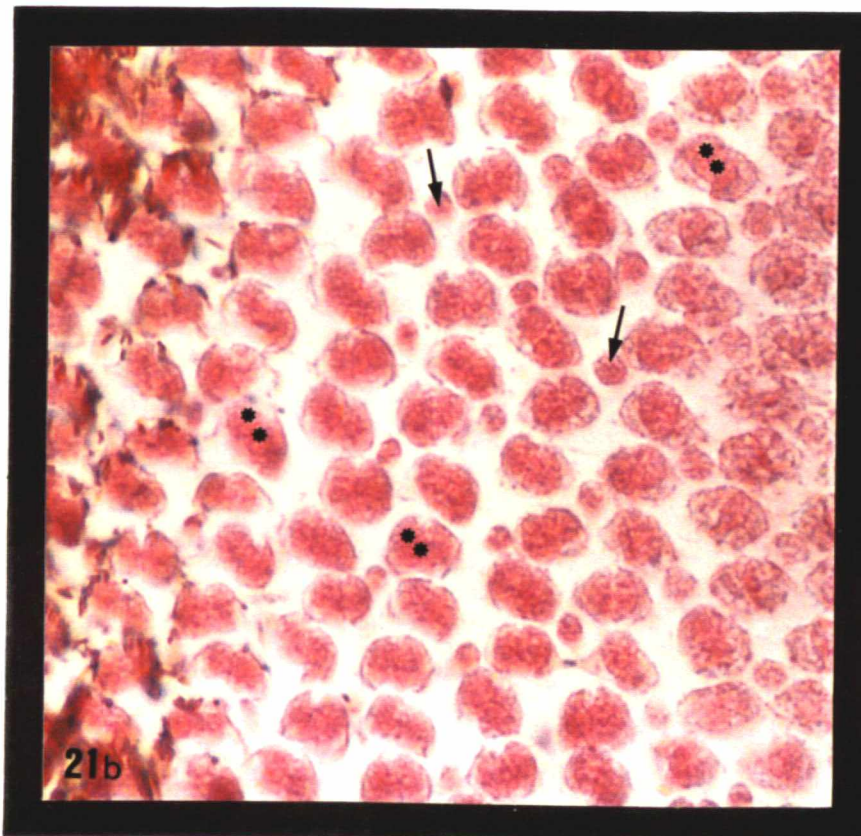
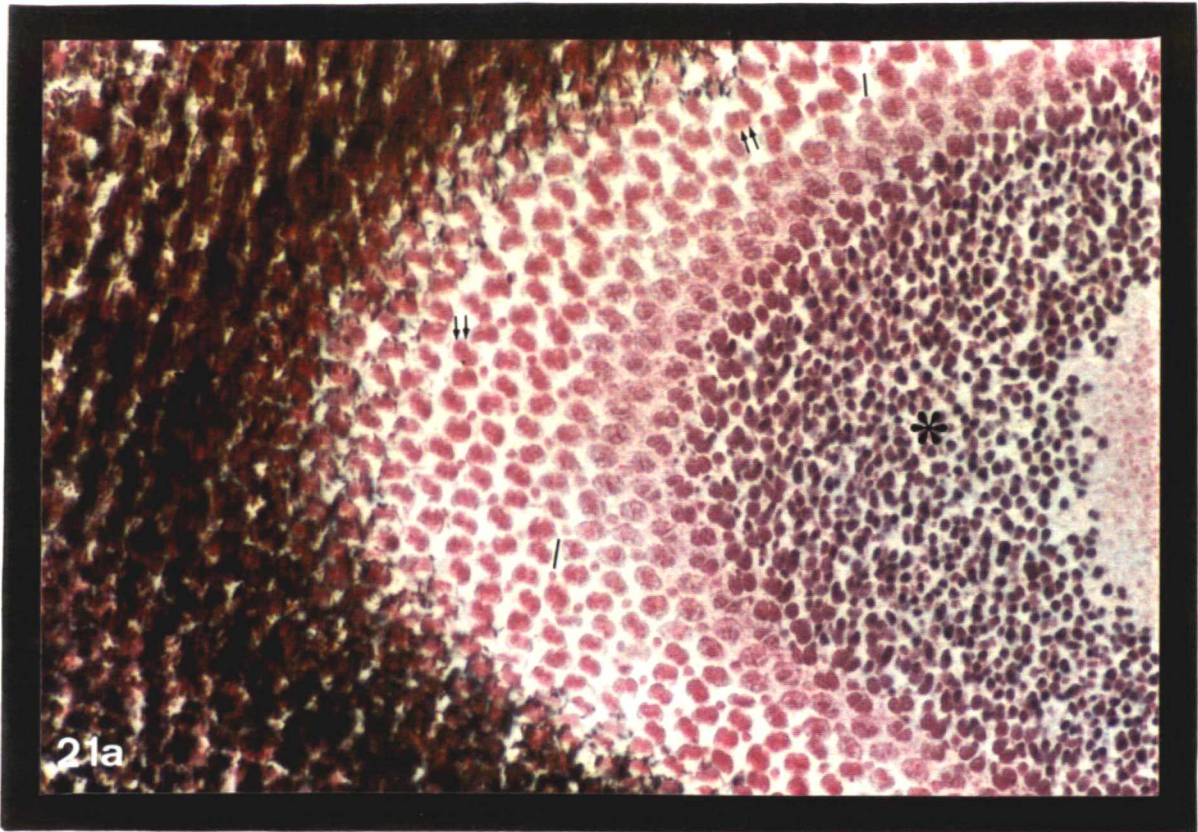


Fig. 21c: Microscopia eletrônica de varredura dos segmentos internos dos cones. Notar os segmentos internos dos cones duplos (**) e dos cones simples (★). Observar os segmentos externos (★) de bastonetes espalhados entre os segmentos internos dos cones. Aumento: 1.400 x

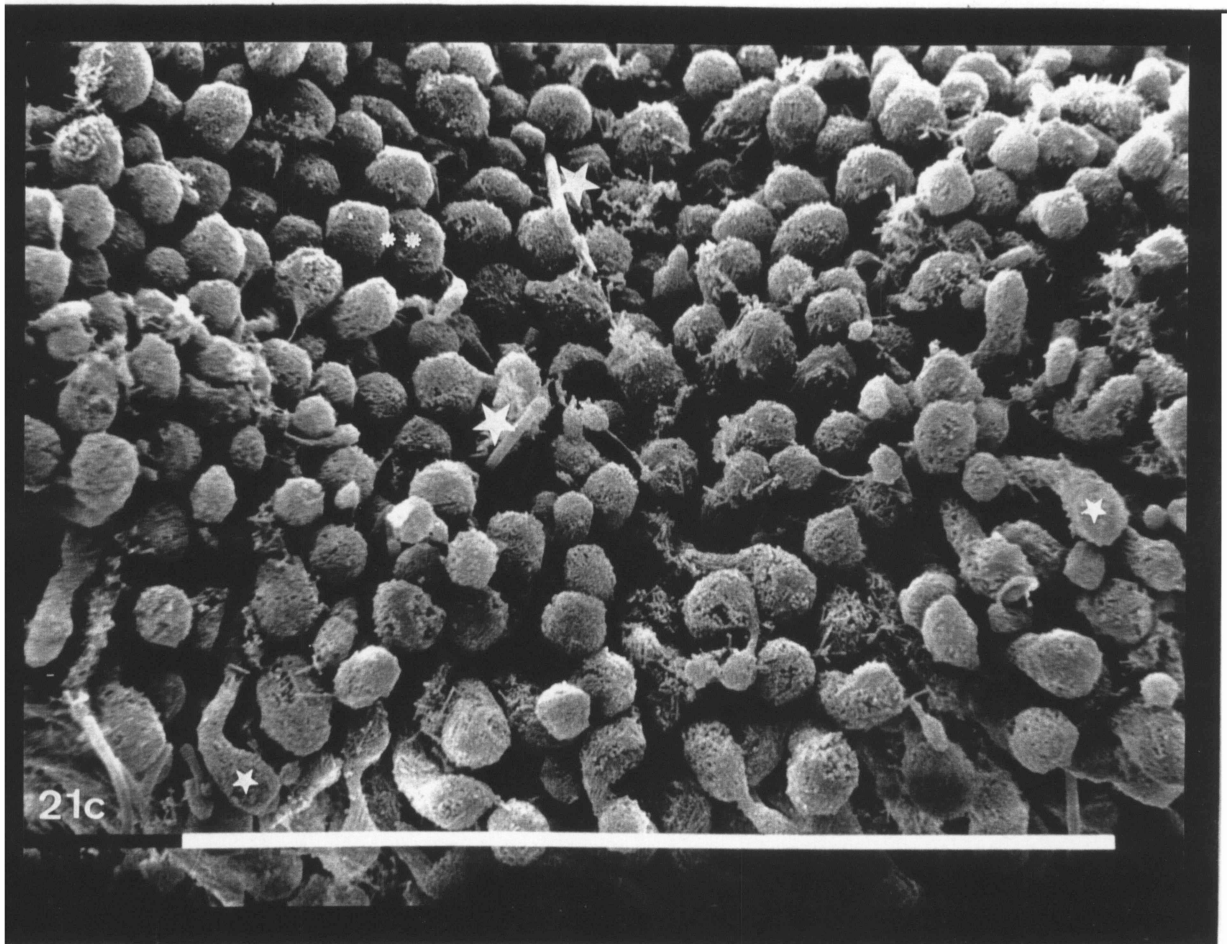


Fig. 22: Segmento interno (✱) e segmento externo (★) de uma célula fotorreceptora na forma de bastonete. Observar a presença de mitocôndrias (m) no segmento interno.
Aumento: 4.800 x

Fig. 23: Microscopia eletrônica de varredura dos segmentos externos (★) de bastonetes que se caracterizam por serem estruturas frágeis e cilíndricas. O aspecto dobrado é artefato de técnica (★). Observar a presença de pigmentos de melanina (✱). Aumento: 5.700 x

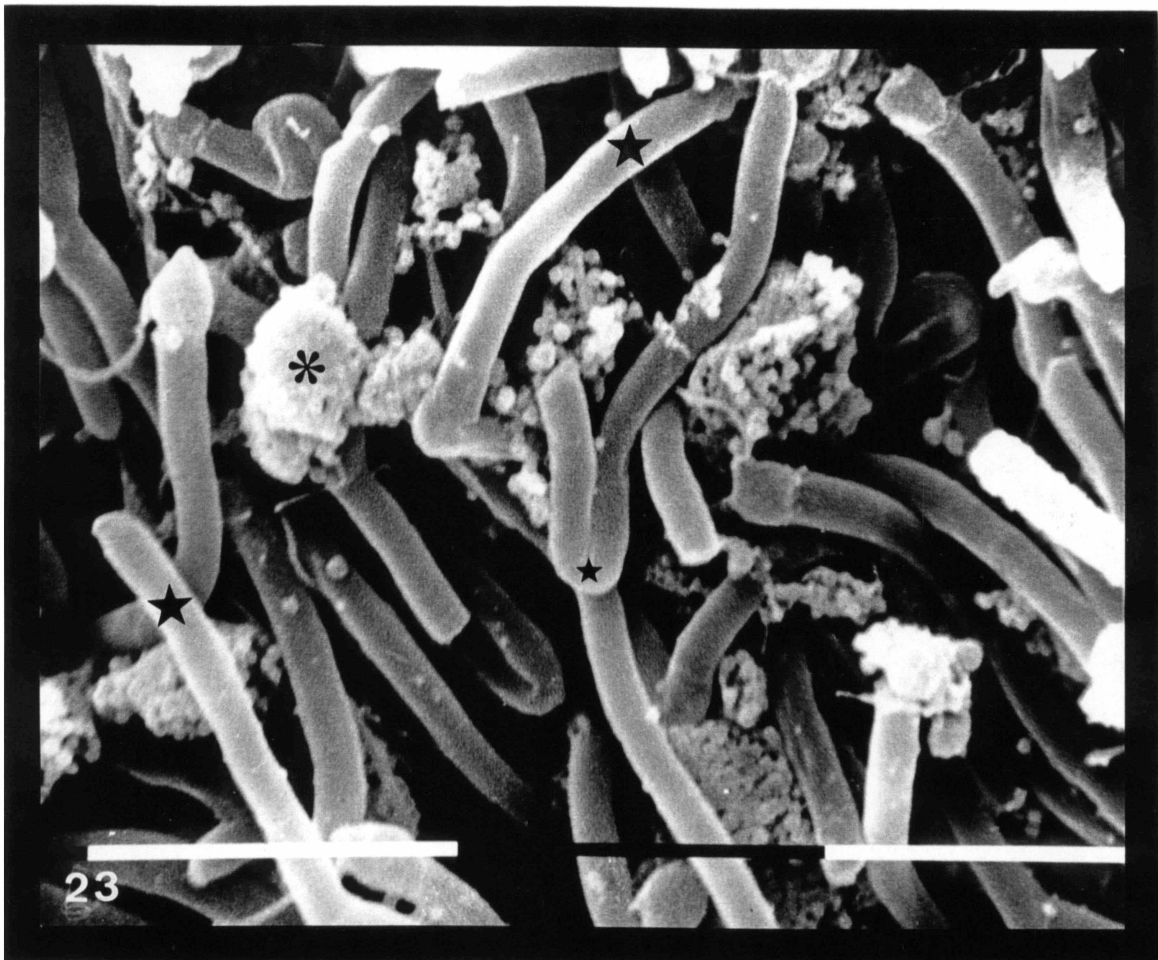
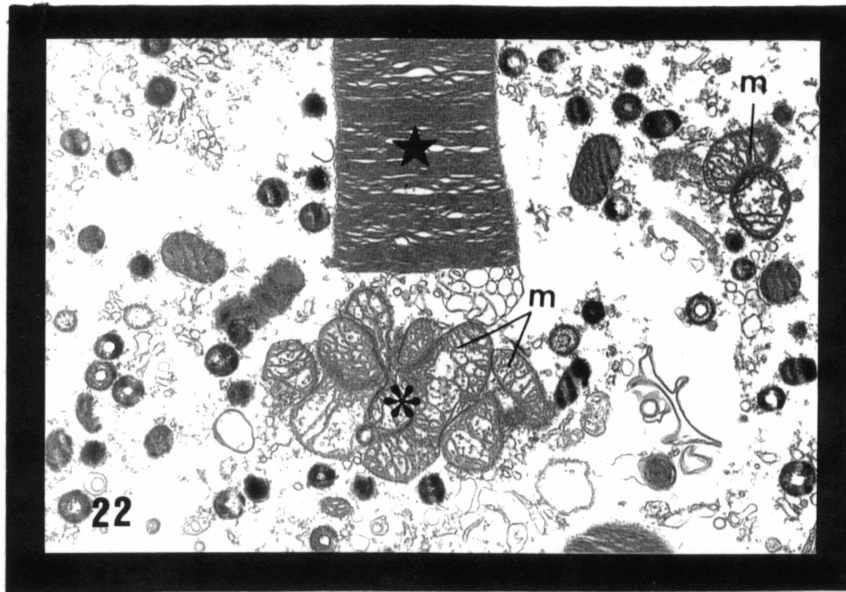



Fig. 24a: Aspecto geral do segmento externo de um bastonete, formado por membranas em forma de discos (**m**). Muitas vezes, os segmentos externos das células fotorreceptoras estão em íntimo contacto (*). Aumento: 23.000 x

Fig. 24b: Detalhe ultraestrutural do segmento externo de um bastonete. Notar que as membranas (**m**) em forma de discos ou lamelas não possuem continuidade com o espaço extracelular (). Aumento: 133.300 x

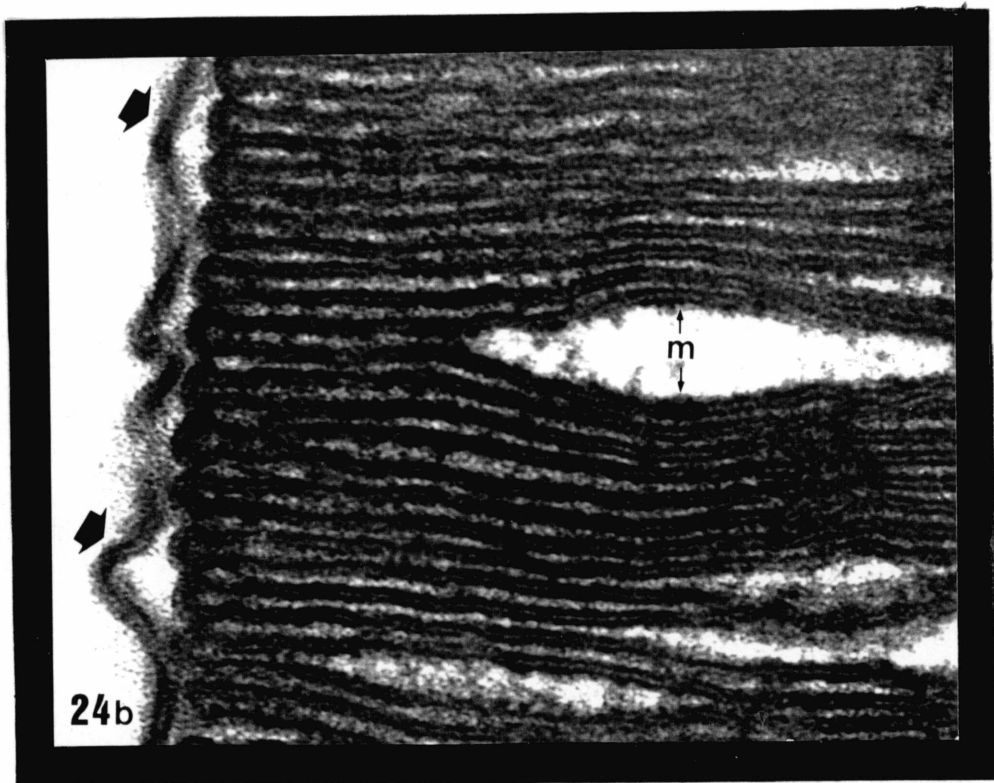
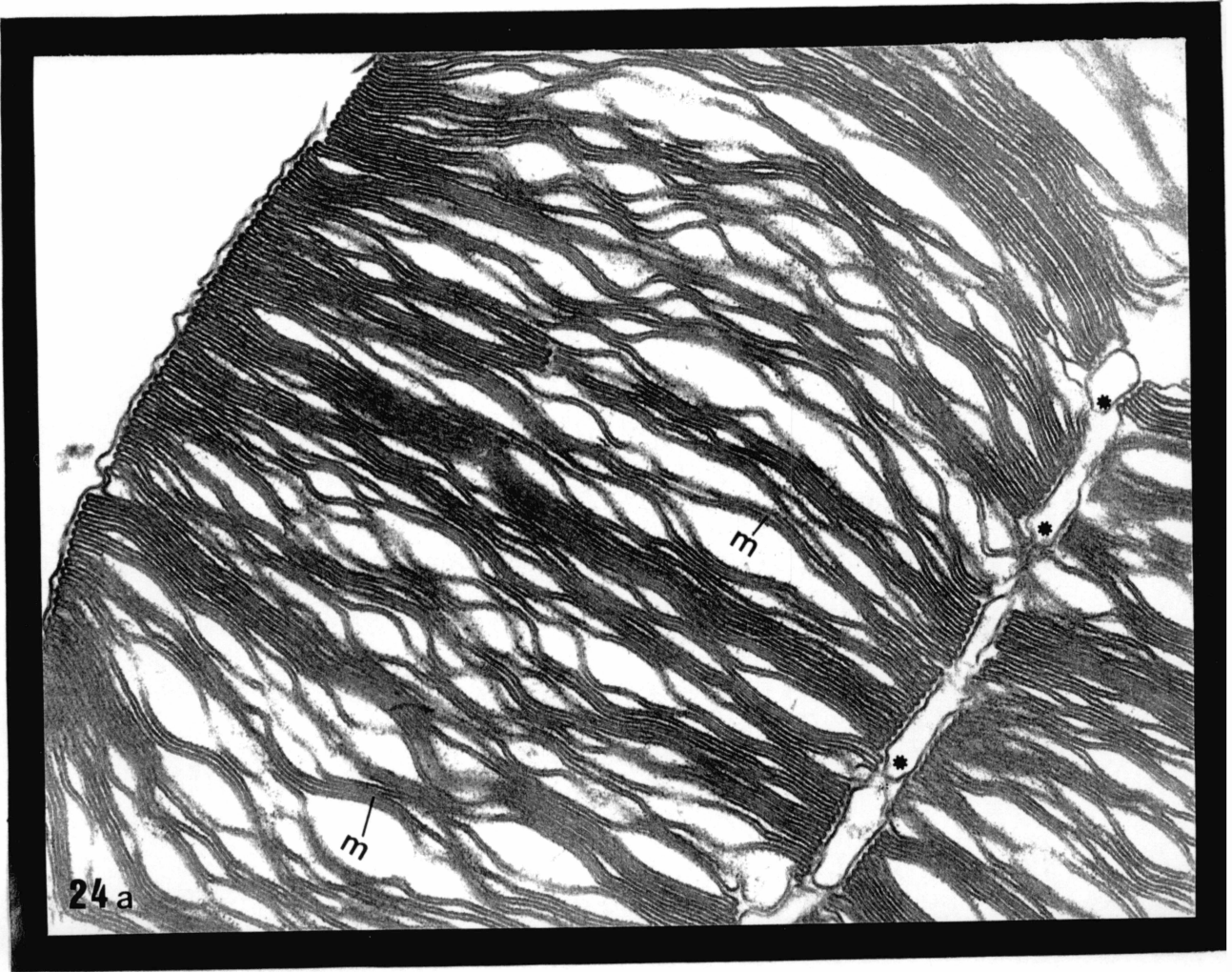








Fig. 25: Corte longitudinal aos segmentos internos dos cones (Si). Observar a camada nuclear externa (). Notar que os núcleos dos bastonetes () são menores e se coram mais fortemente que os núcleos dos cones (). Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 1.379 x

Fig. 26: Corte longitudinal de toda a região nervosa da retina incluindo as células fotorreceptoras (). Observar a posição relativa e a variação de espessura entre a camada plexiforme interna () e a camada plexiforme externa (). Coloração: Tricrômico de Mallory. Aumento: 552 x

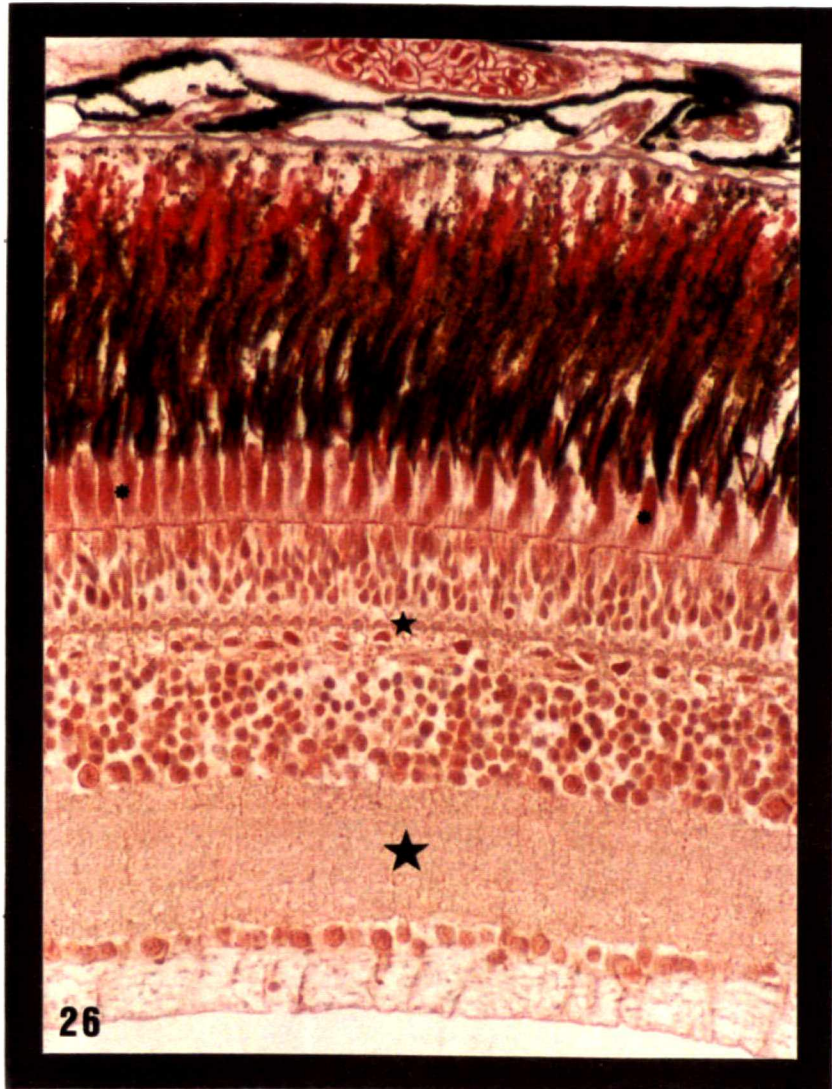
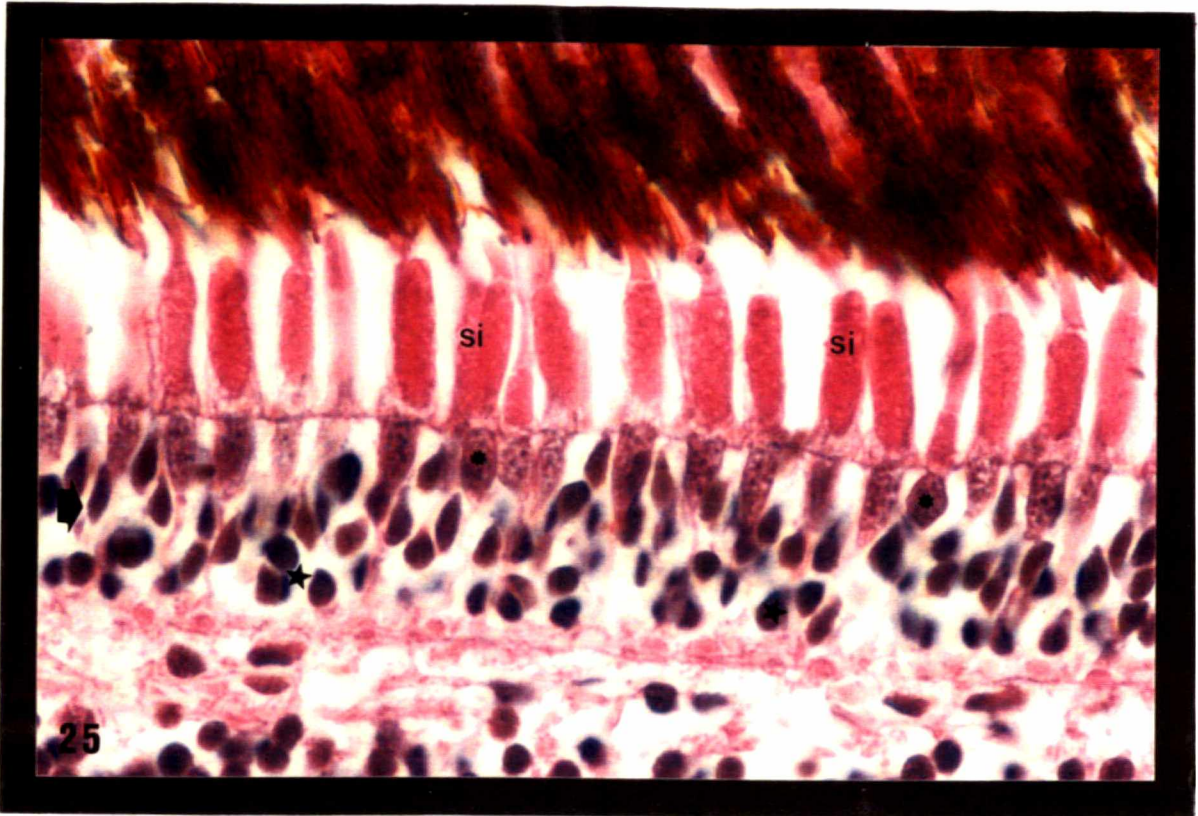


Fig. 27: Pericário (**pe**) de uma célula horizontal com numerosos dendritos (**—→**). Esses dendritos estão em contacto com o pedículo (**★**) dos cones e fazem parte da camada plexiforme externa. Observar a presença de núcleos das células fotorreceptoras (**nu**).
Aumento: 18.600 x

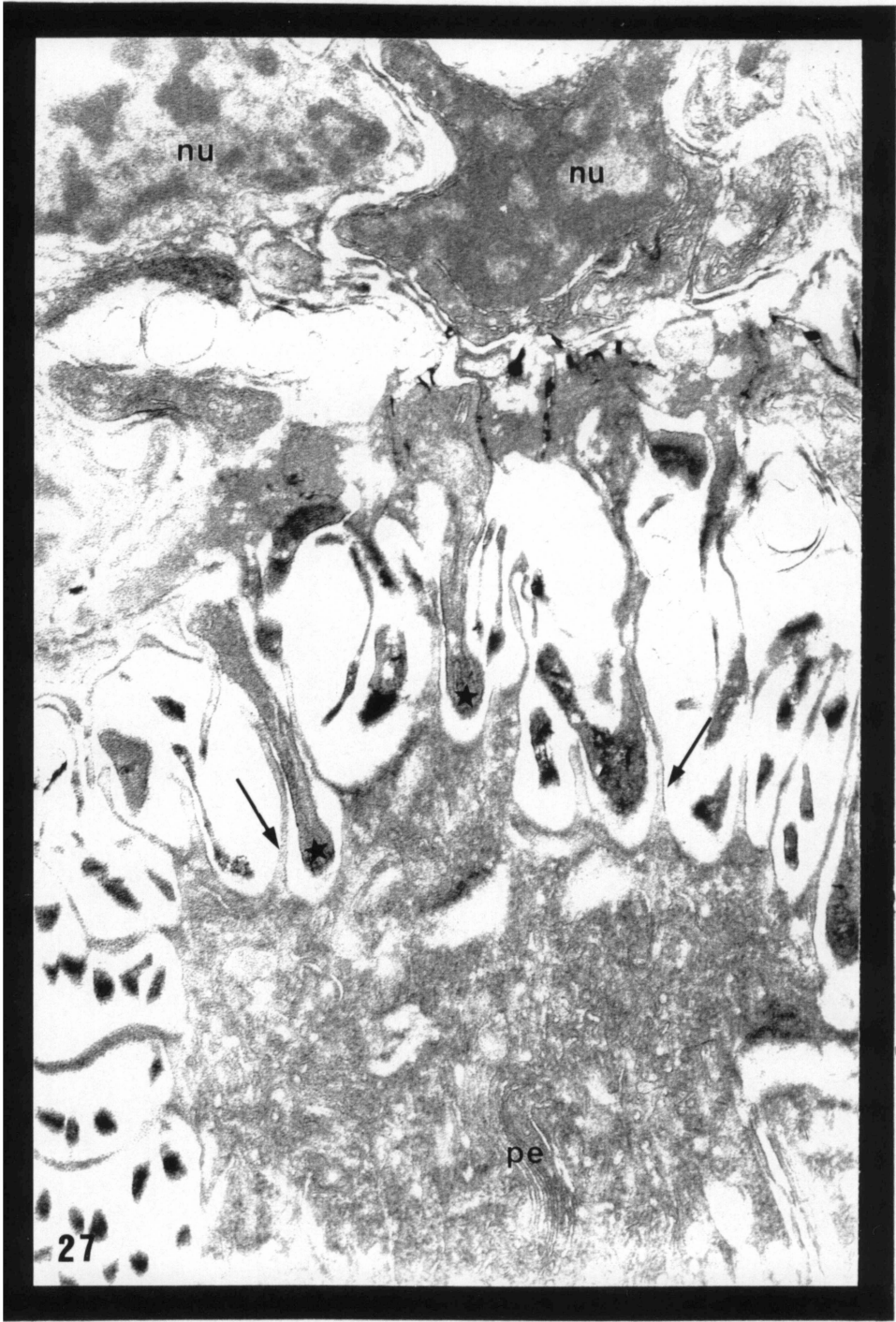



Fig. 28a: Vesícula sináptica (vs) formada pela sinapse entre uma célula fotorreceptora e uma célula bipolar, encontrada na camada plexiforme externa. Observar as terminações das células fotorreceptoras (). Aumento: 12.100 x

Fig. 28b: Detalhe de uma vesícula sináptica (vs) encontrada na camada plexiforme externa. Aumento: 17.000 x

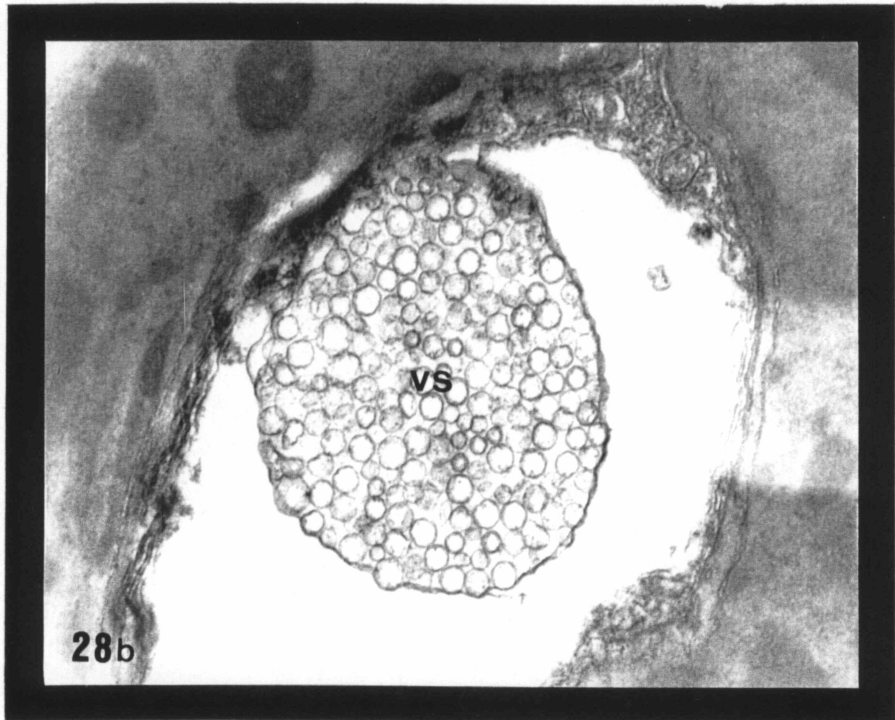
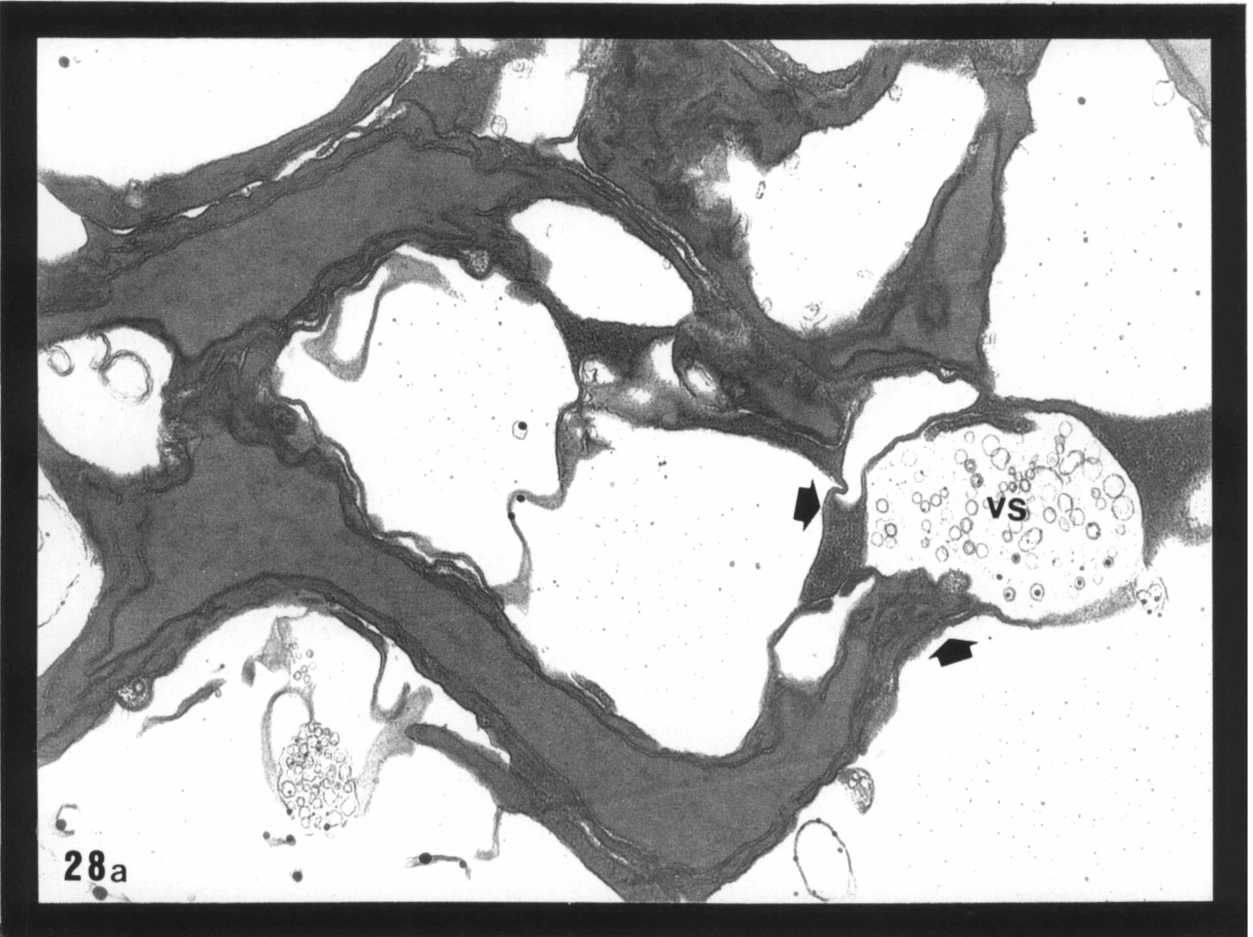


Fig. 29: Aspecto geral da camada plexiforme interna, formada pelos prolongamentos das células bipolares, amácrinas e ganglionares. Observar a presença de várias vesículas sinápticas (**vs**) e alguns prolongamentos das células ganglionares (**p**) bem como o seu pericário (**pe**). Aumento: 7.000 x

Fig. 30: Detalhe de uma célula ganglionar localizada entre a camada plexiforme interna (**cp**) e a camada de fibras do nervo óptico (**cf**). Notar a cromatina eletrodensa (*) que constitui o pericário. Aumento: 4.000 x

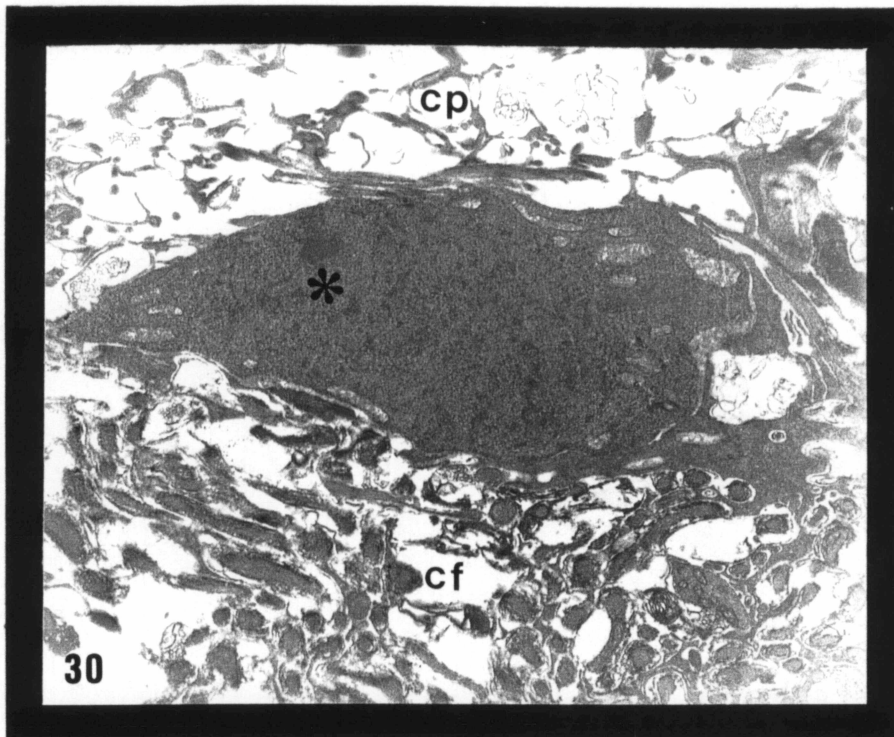
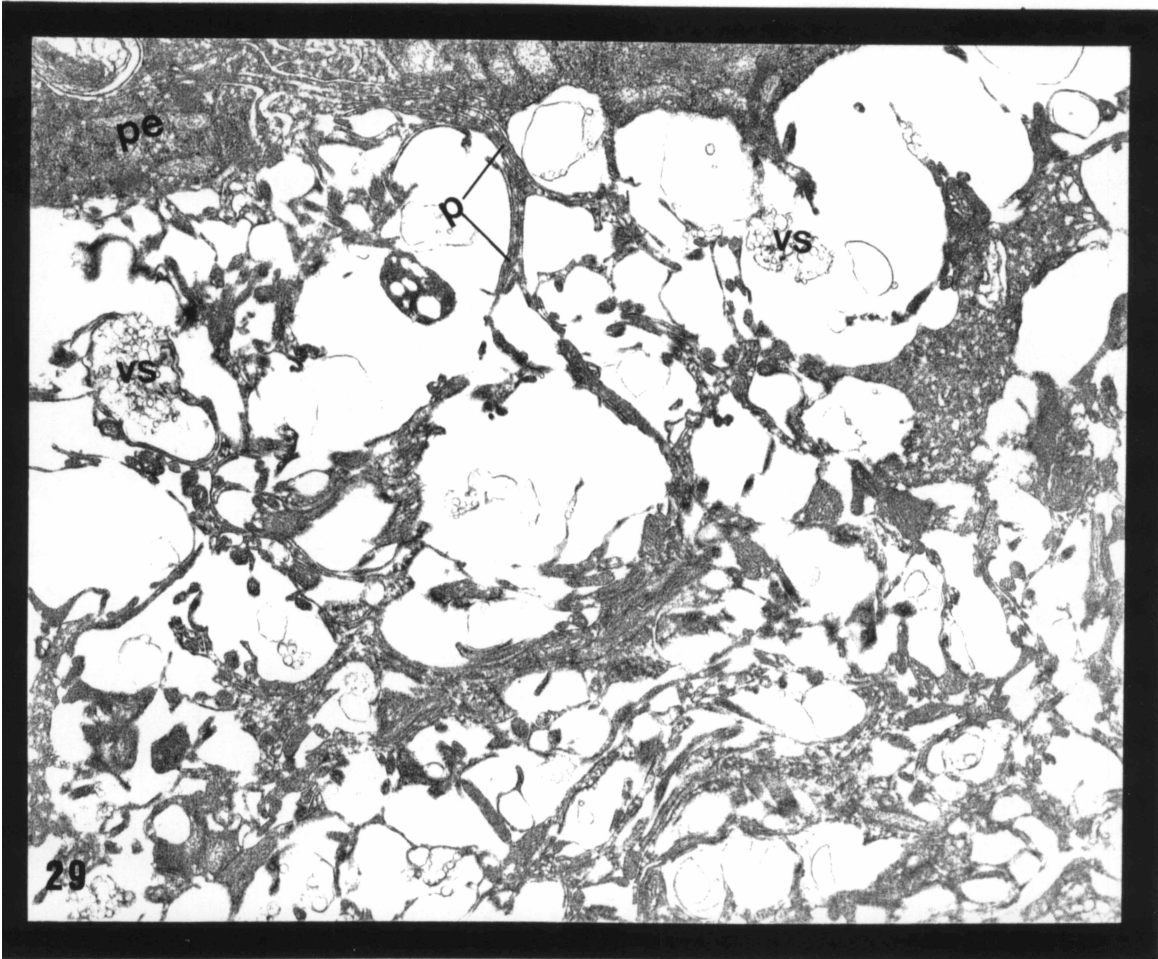


Fig. 31: Corte longitudinal à retina. Notar os processos citoplasmáticos (⇄) das células de sustentação de Müller que estendem-se da membrana limitante externa (★) até a camada de células fotorreceptoras (*). Coloração: Hematoxilina -Eosina. Aumento: 552 x

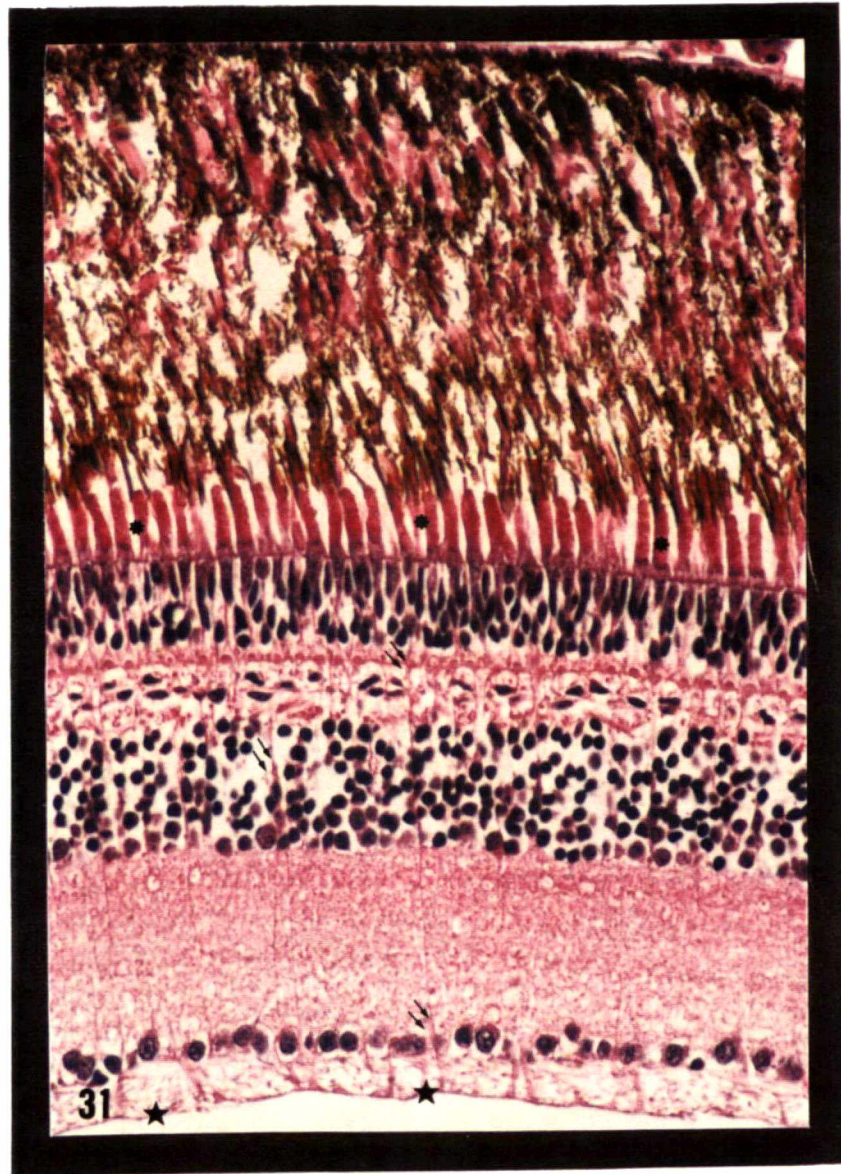


Fig. 32: Epitélio pigmentar da retina (★), com coloração marrom devido a presença de pigmentos de melanina (**pm**). Notar a sua localização entre a coróide (**c**) e a retina neural (**rn**). Coloração: Tricrômico de Mallory. Aumento: 552 x

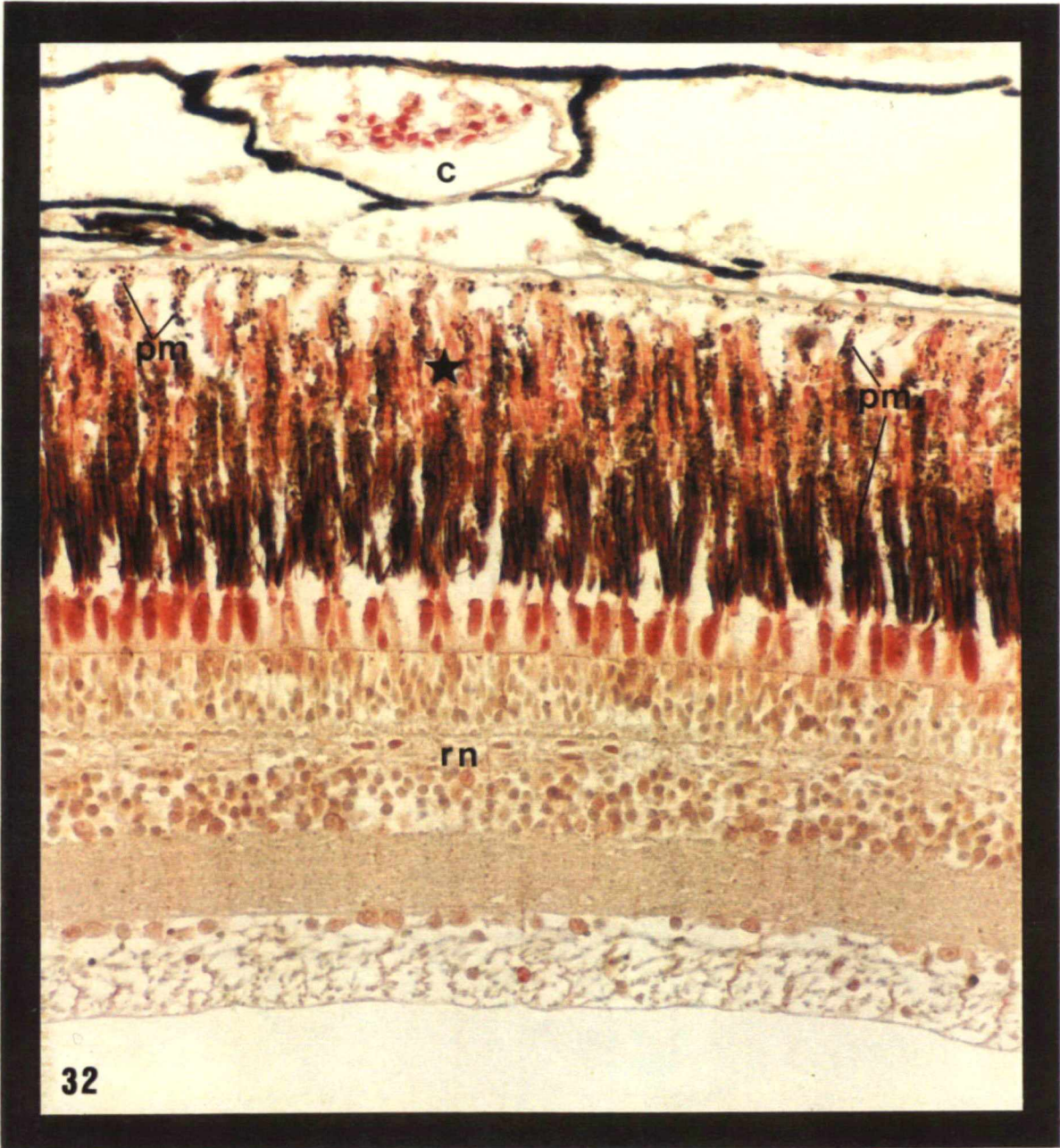


Fig. 33a: Membrana de Bruch (**MB**), na qual a face basal do epitélio pigmentar (**ep**) repousa. Observar a coróide (**c**) rica em hemáceas (**h**). Aumento: 4.800 x

Fig. 33b: Detalhe da membrana de Bruch, rica em fibras colágenas (**fc**). Observar os pigmentos de melanina (**p**). Aumento: 21.200 x

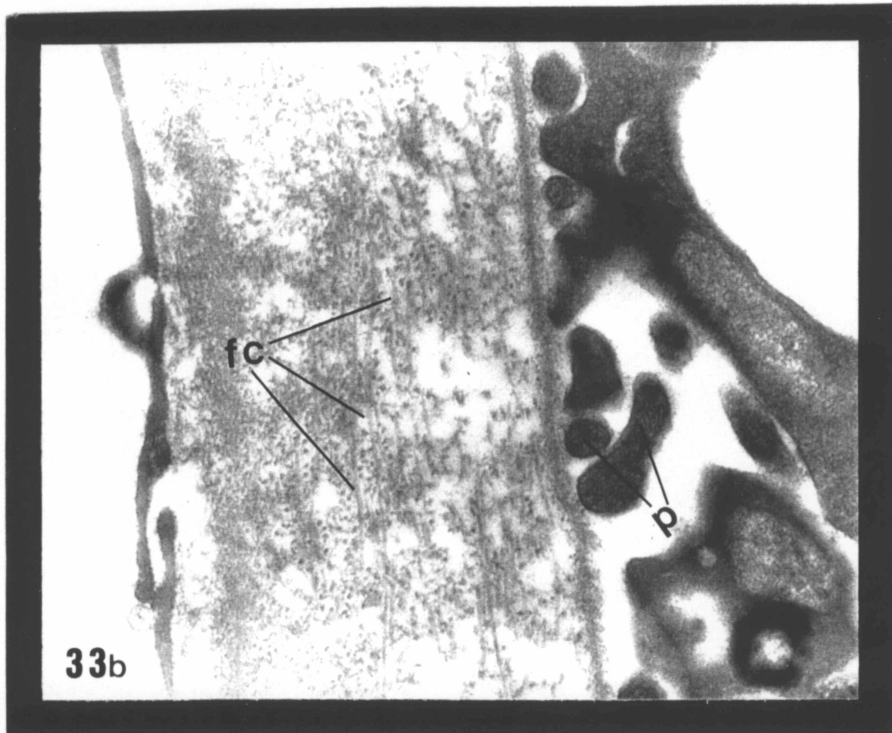
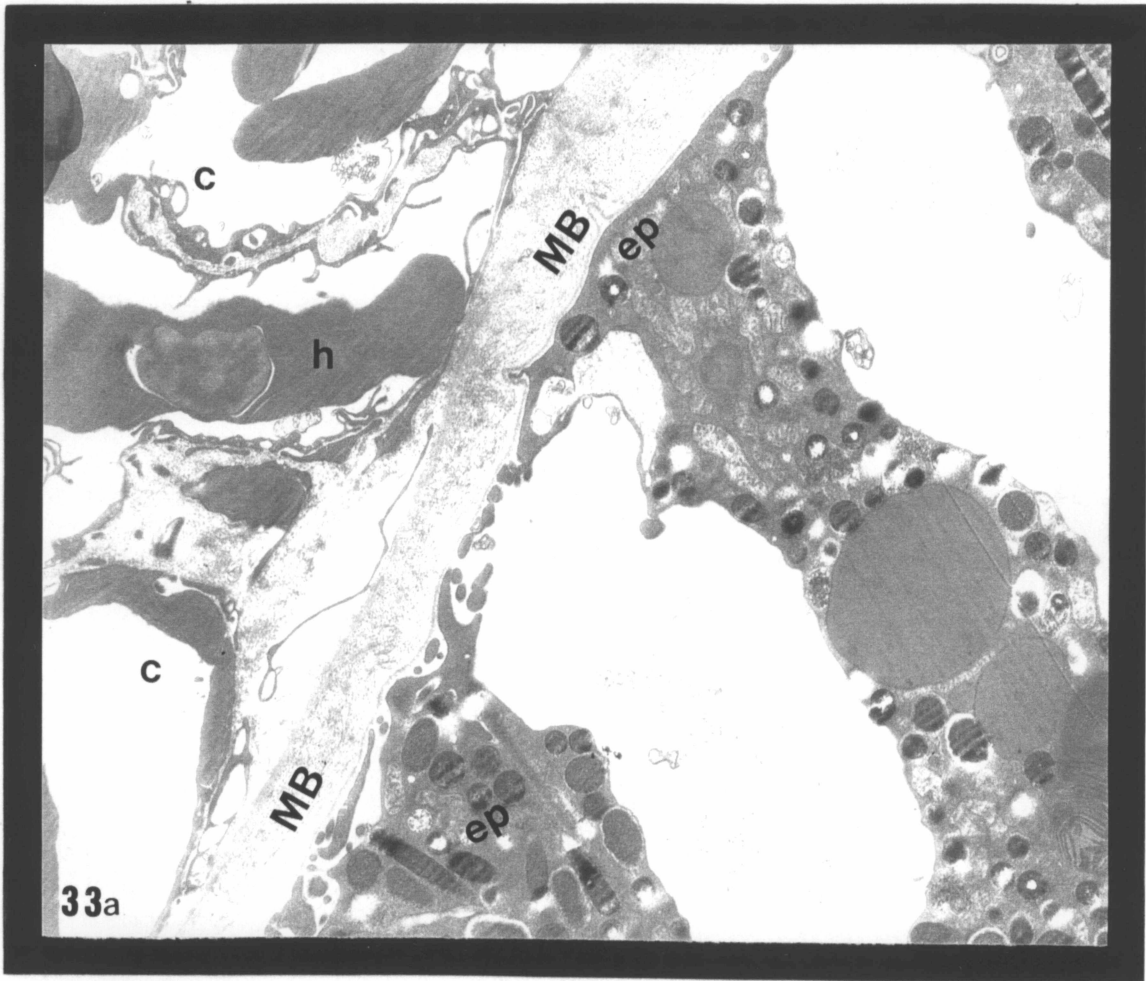


Fig. 34a: Núcleos (**nu**) das células epiteliais da retina em microscopia óptica. Observar os pigmentos de melanina (**pm**), a membrana de Bruch (**MB**) e a coróide (**c**). Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 1.379 x

Fig. 34b: Núcleos (**nu**) das células epiteliais em microscopia eletrônica de transmissão. Os núcleos (**nu**) possuem posição basal, formato alongado e uma membrana dupla típica (**↘**). Observar a presença de mitocôndrias (**m**), pigmentos de melanina (**pm**), nucléolo (**N**) e membrana plasmática epitelial (**mp**). Aumento: 6.100 x

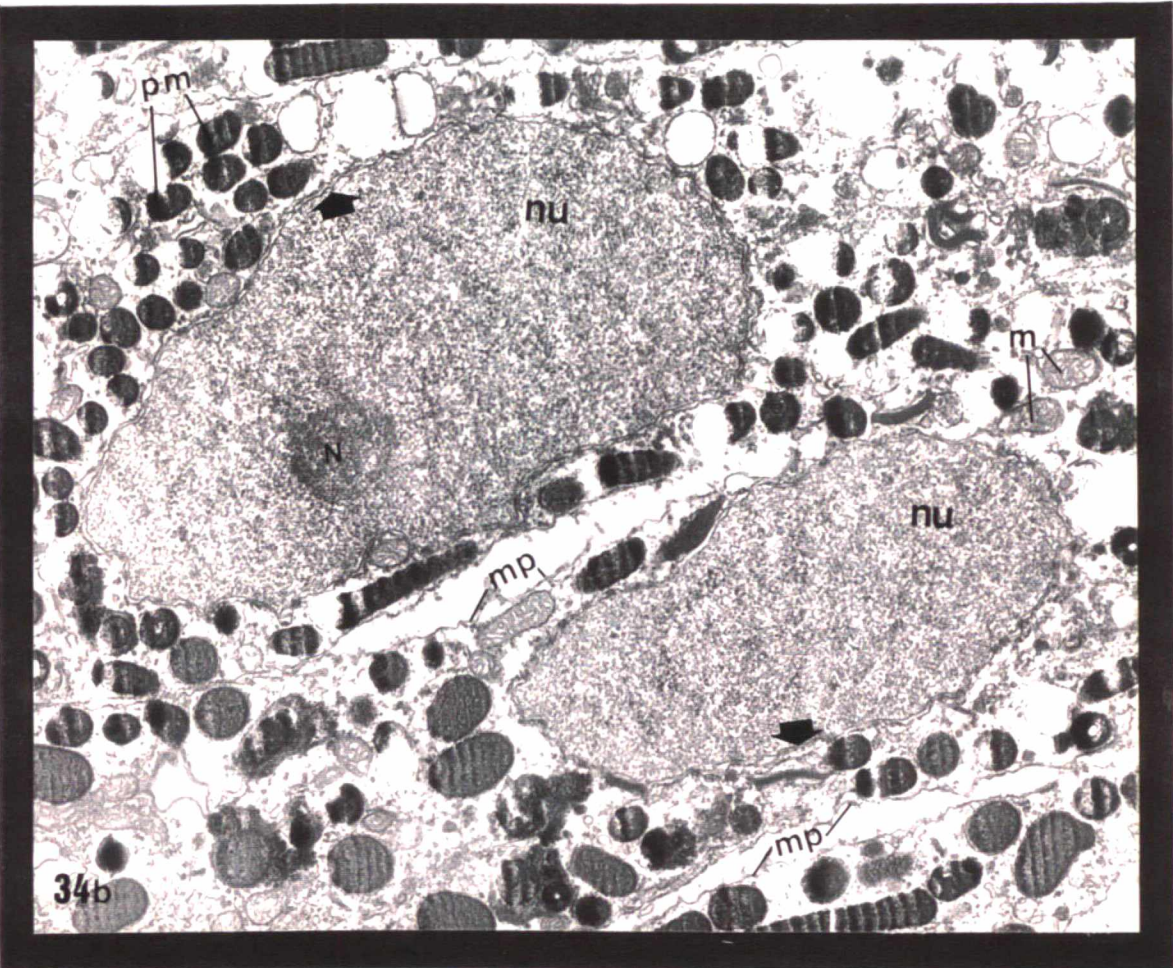
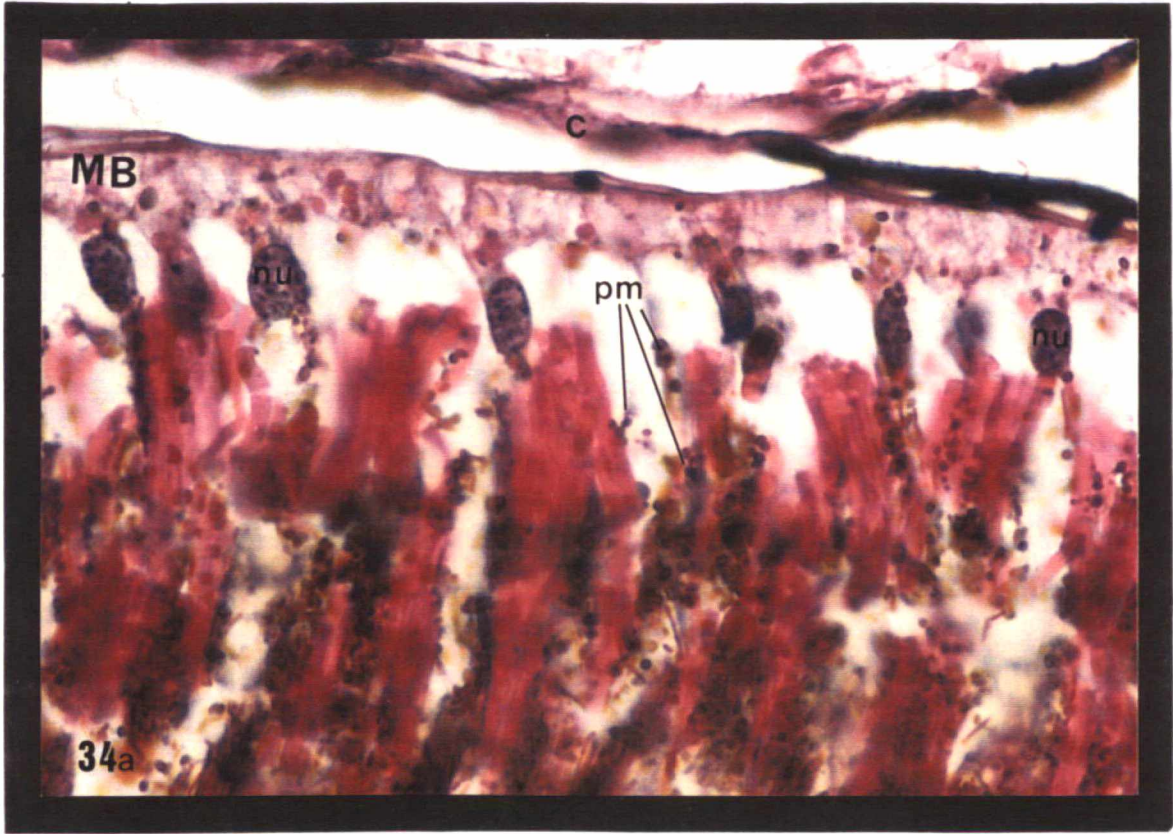



Fig. 35: Detalhe da região basal de uma célula epitelial da retina, rica em mitocôndrias (**m**) de formato geralmente alongado, tipo bastonete. Observar a membrana de Bruch (**MB**), rica em fibras colágenas (**fc**). Aumento: 18.200 x

Fig. 36: Desmosomas () encontrados no epitélio pigmentar da retina unindo duas células epiteliais. Observar a membrana plasmática das células epiteliais (**mp**) e a presença de mitocôndrias (**m**). Aumento: 21.200 x

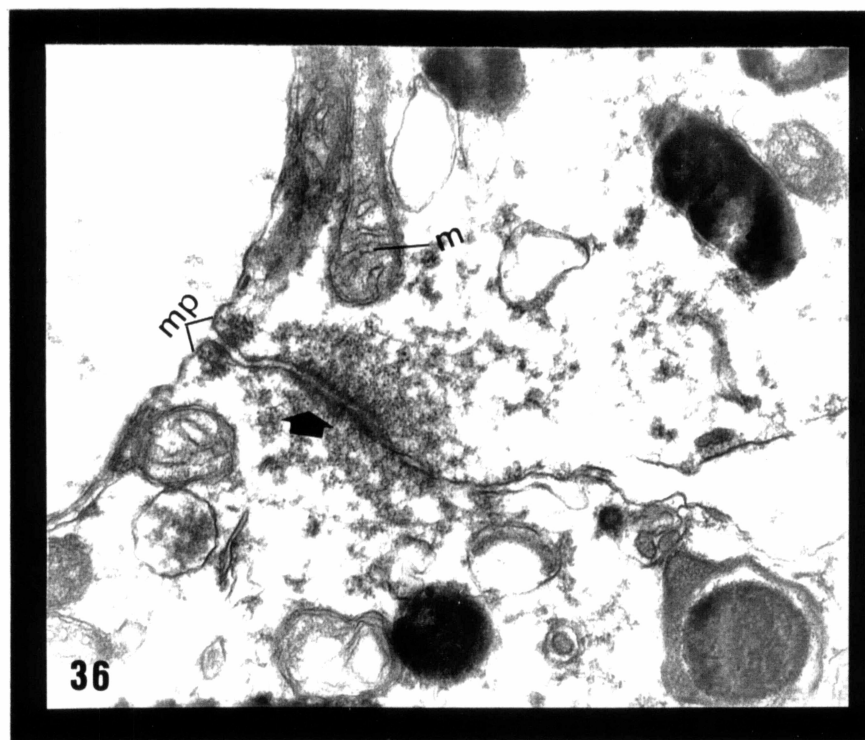
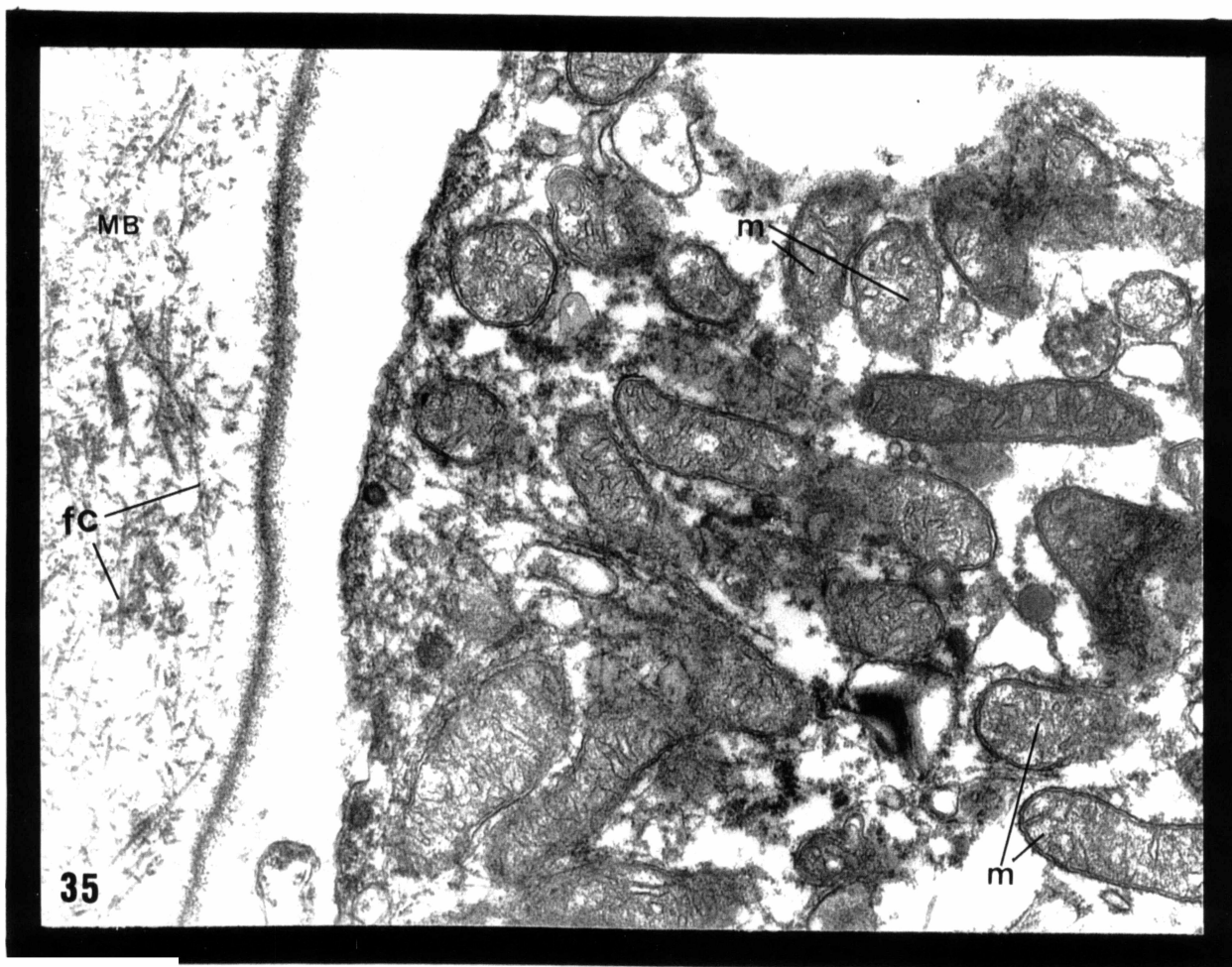


Fig. 37: Detalhe da região apical de uma célula epitelial da retina. A região apical é rica em processos digitiformes (**pd**), pigmentos de melanina (**PM**) e melanossomos (**me**). Observar que esses processos digitiformes se estendem em direção às células fotorreceptoras (★). Aumento: 12.100 x

Fig. 38: Pigmentos de melanina (**PM**) imersos no citoplasma das células epiteliais da retina. Aumento: 17.000 x

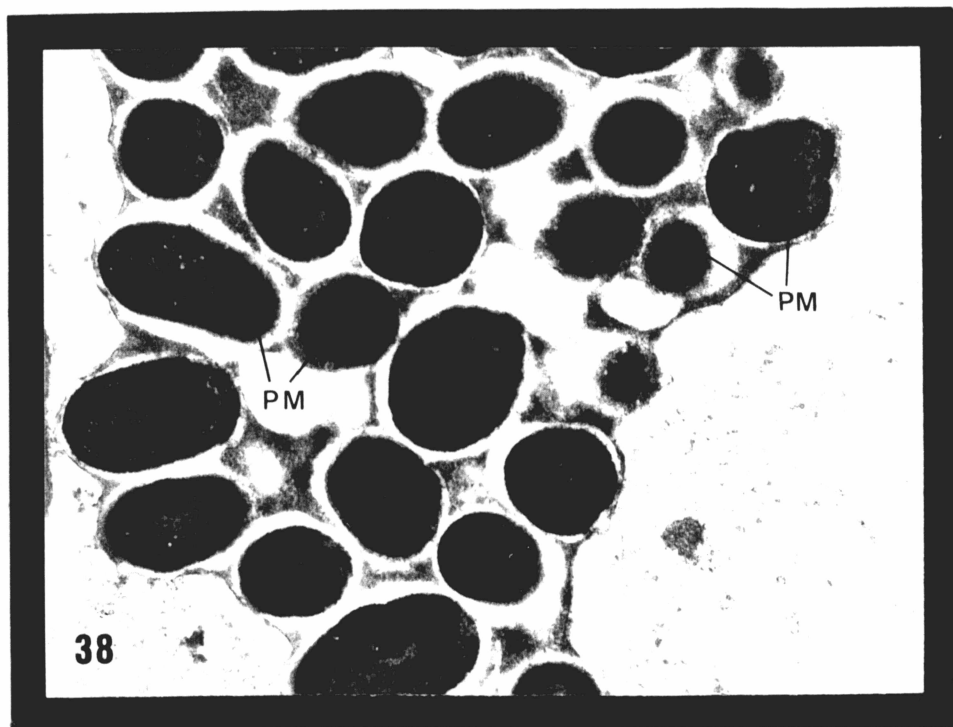
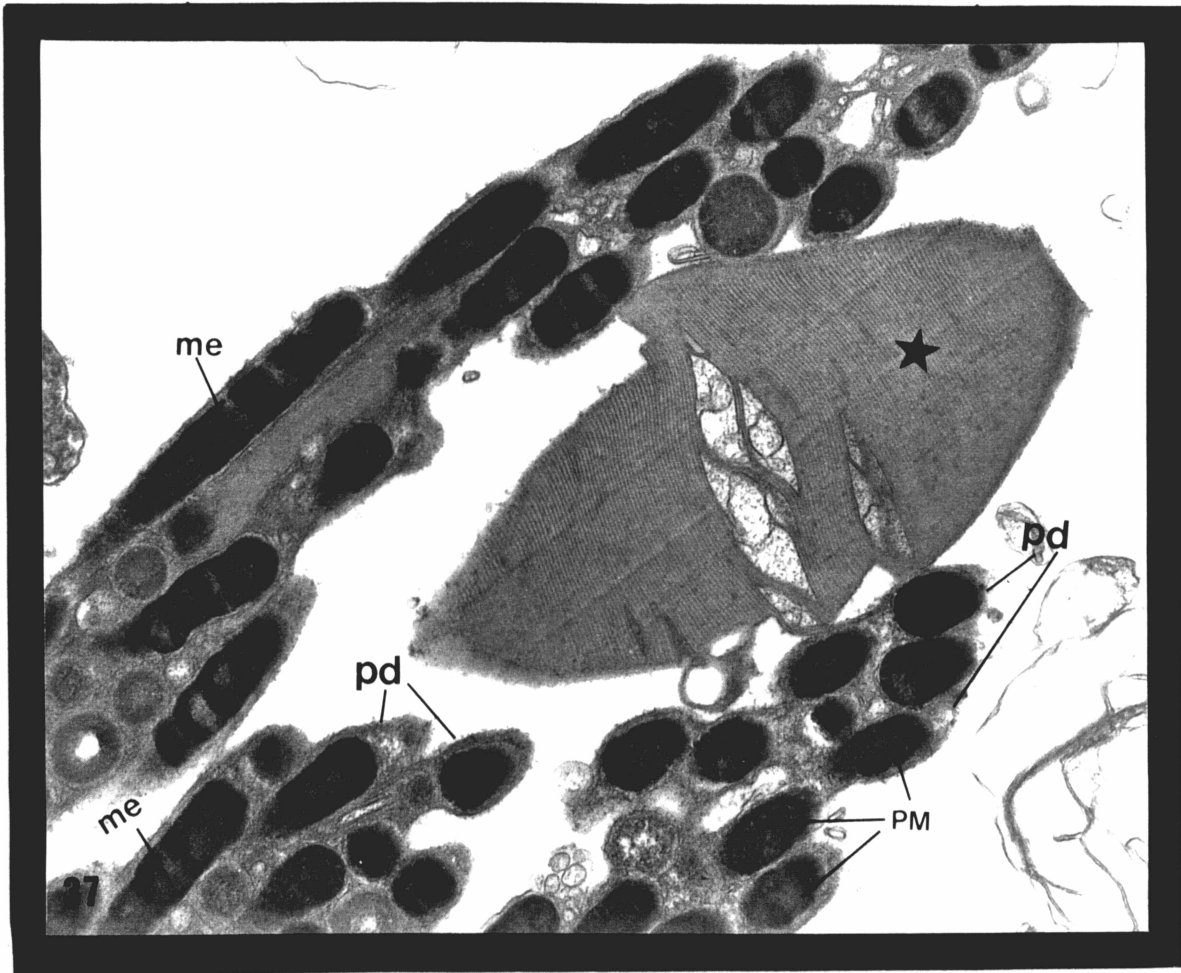


Fig. 39: Retina submetida a um regime de escuro. Observar os pigmentos de melanina (★) agregados na base coroidal das células epiteliais. Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

Fig. 40: Retina submetida a um regime de luz. Observar os pigmentos de melanina (★) dispostos ao longo das projeções apicais das células epiteliais pigmentares. Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

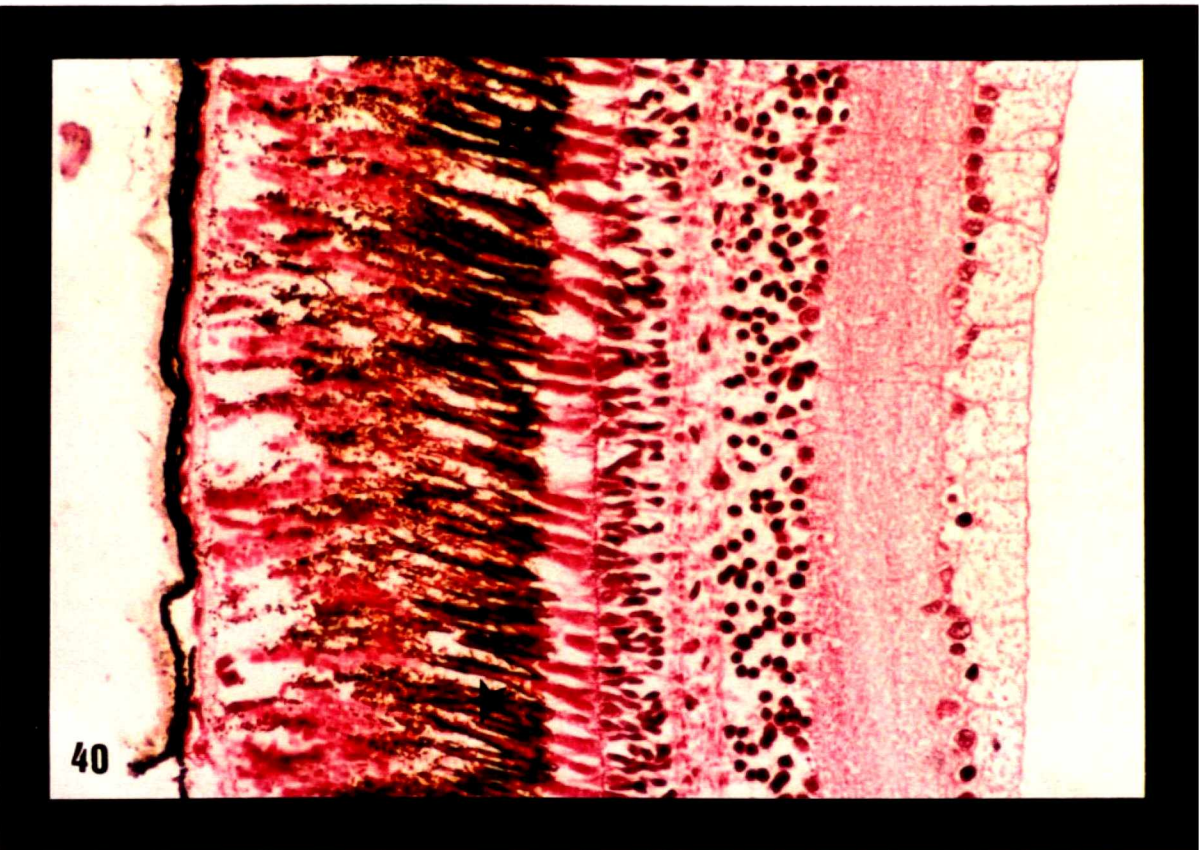
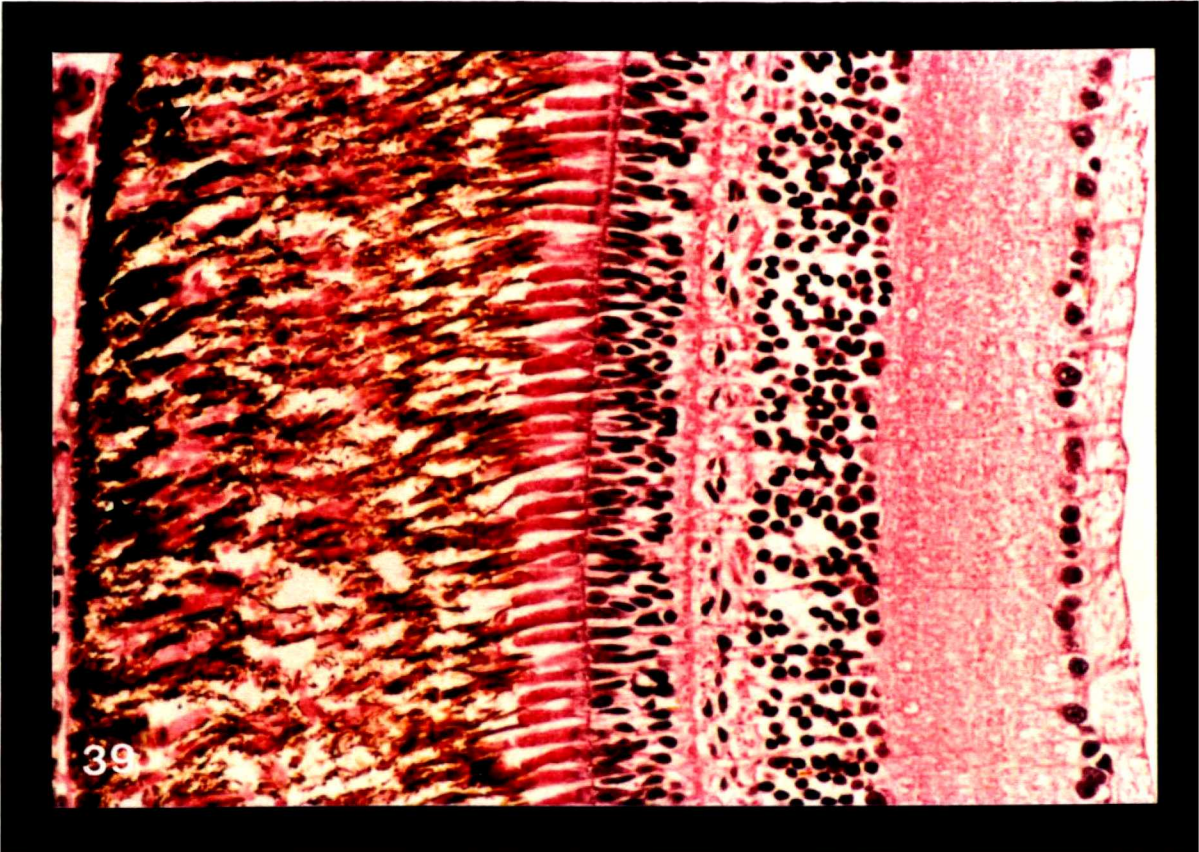


Fig. 41a: Experimental, início do fotoperíodo claro. Corte longitudinal da região lateral da retina. Observar a distribuição dos pigmentos de melanina (★) em toda a camada do epitélio pigmentar da retina. Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

Fig. 41b: Controle, início do fotoperíodo claro. Corte longitudinal da região lateral da retina. Comparar com a Fig. 41a e observar a semelhança na distribuição dos pigmentos de melanina (★) na camada do epitélio pigmentar da retina. Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

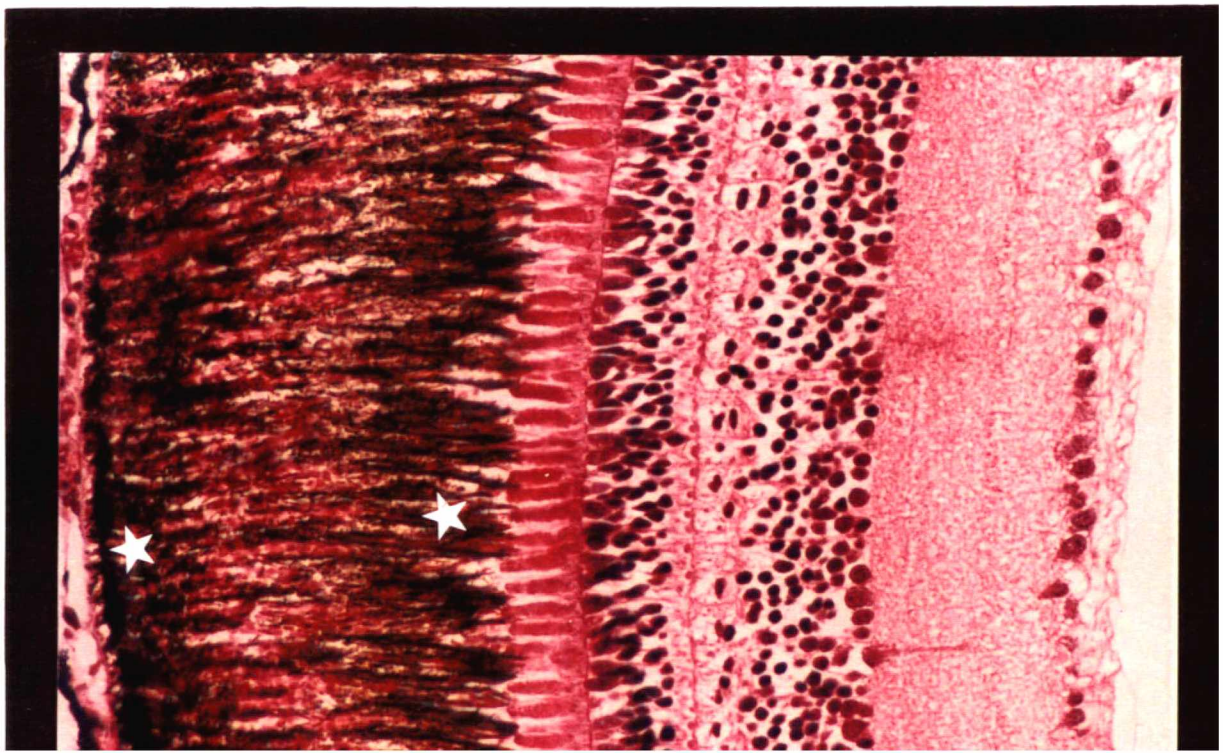
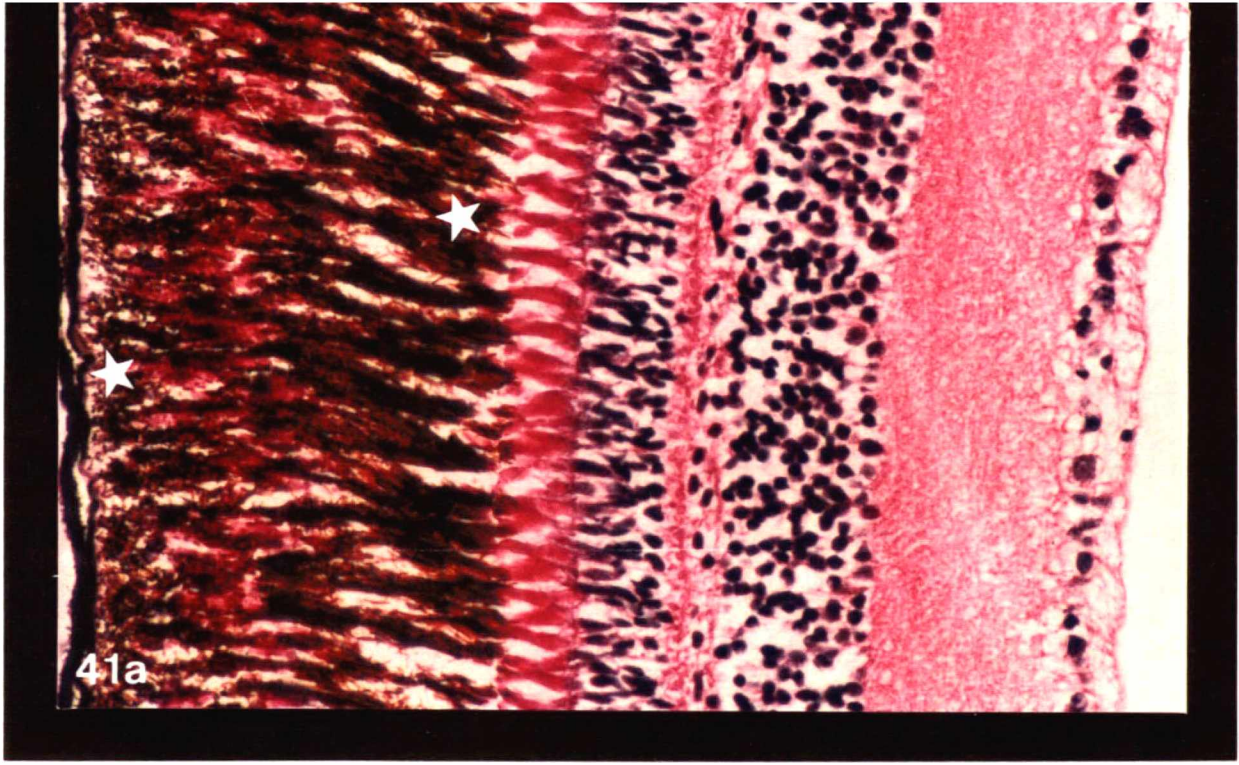


Fig. 42a: Experimental, 30 minutos após exposição à luz vermelha. Corte longitudinal da região lateral da retina. Observar os pigmentos de melanina migrando da região basal (★) para a região apical (*) do epitélio pigmentar da retina. Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

Fig. 42b: Controle, 30 minutos após exposição à luz branca. Corte longitudinal da região lateral da retina. Observar os pigmentos de melanina, como na Fig. 42a, migrando da região basal (★) para a região apical (*) do epitélio pigmentar da retina. Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

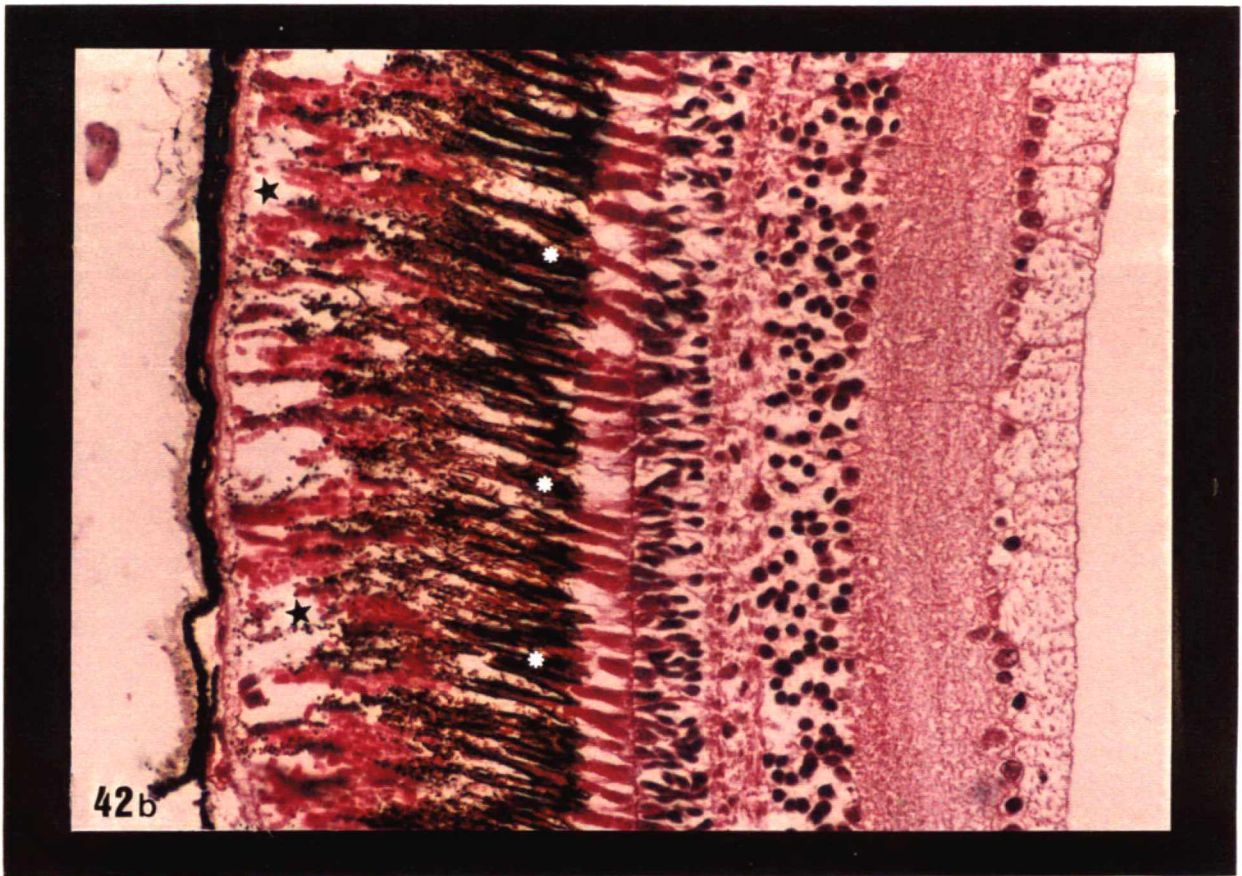
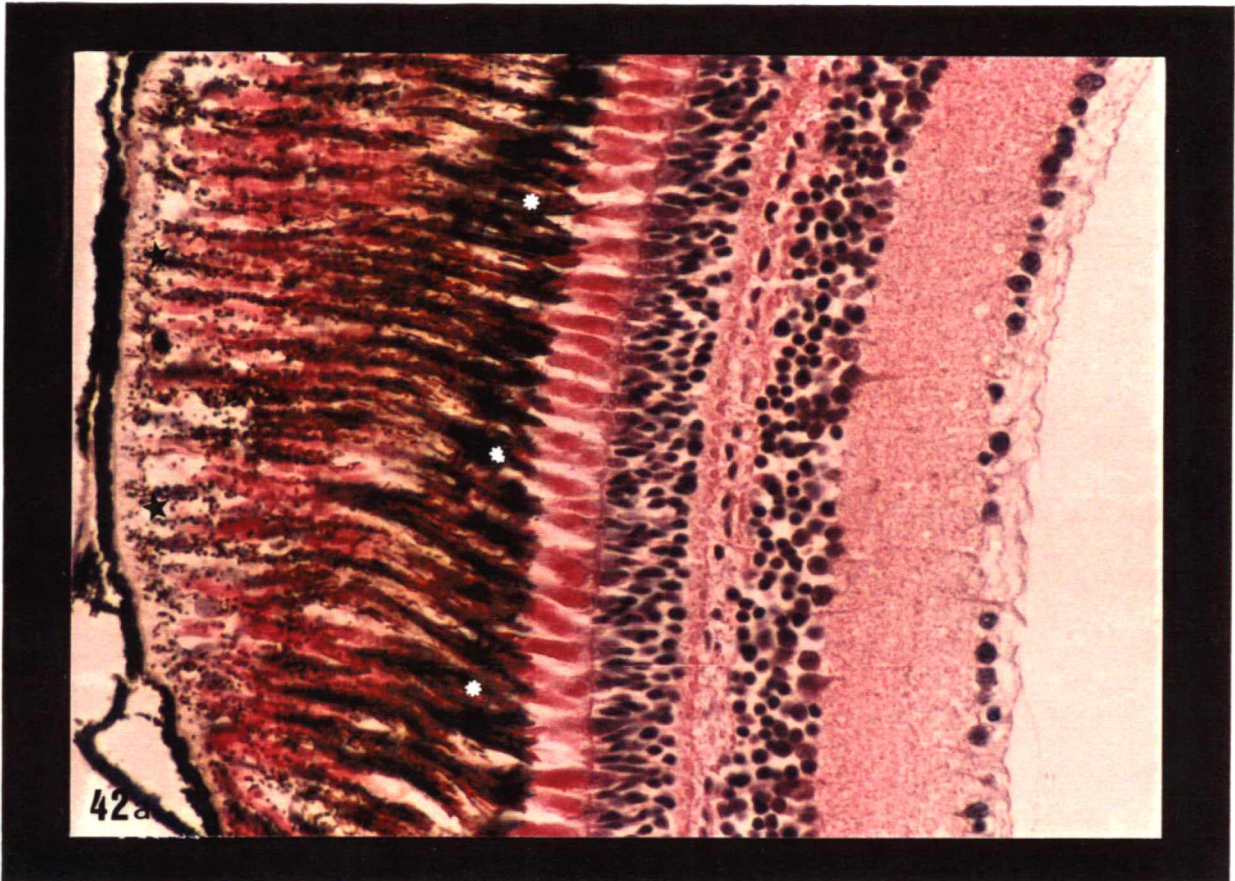


Fig. 43a: Experimental, 4 horas após exposição à luz vermelha. Corte longitudinal da região lateral da retina. Observar a grande quantidade de pigmentos de melanina na região apical (✱) das células epiteliais e a ausência desses pigmentos na região basal (★). Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

Fig. 43b: Controle, 4 horas após exposição à luz branca. Corte longitudinal da região lateral da retina. A quantidade de pigmentos de melanina é menor quando comparada com a Fig. 43a. Observar que a região basal (★) possui maior quantidade de pigmentos de melanina do que o encontrado na Fig. 43a. Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

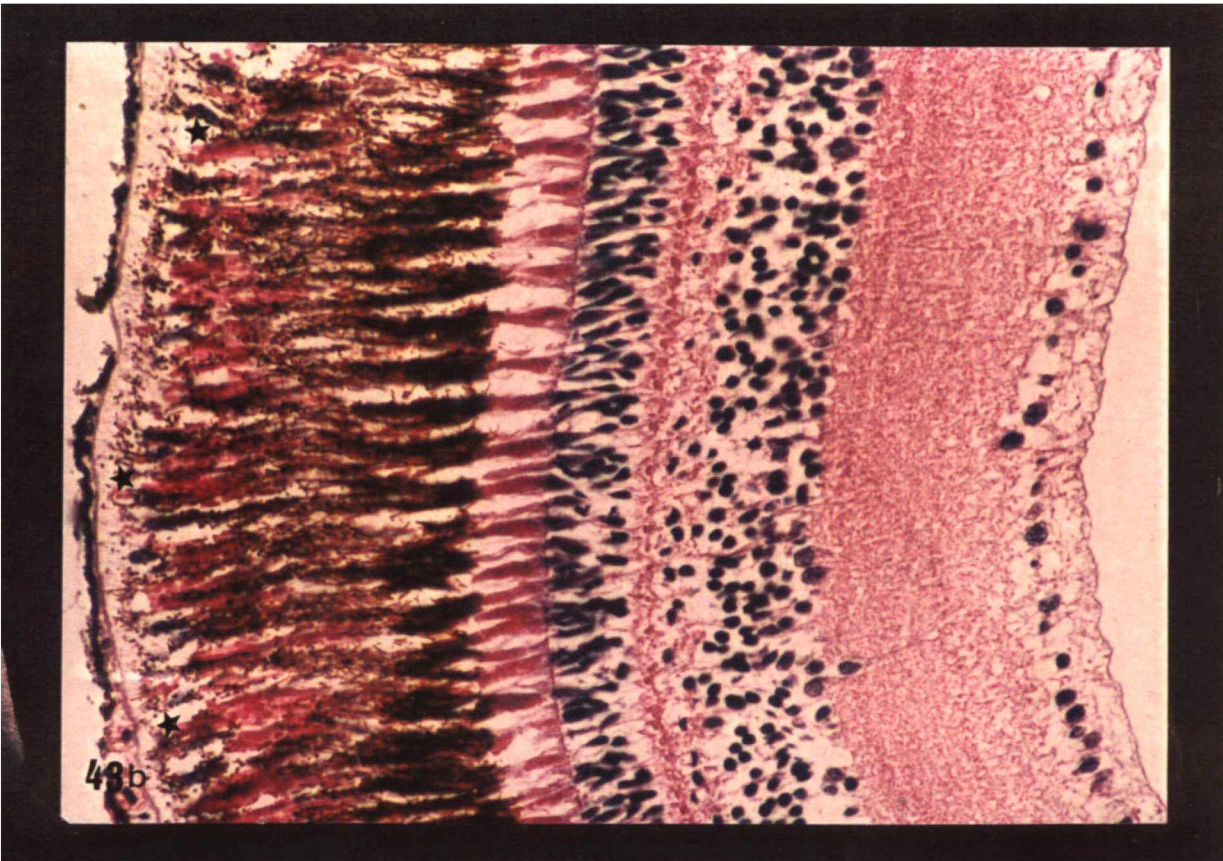
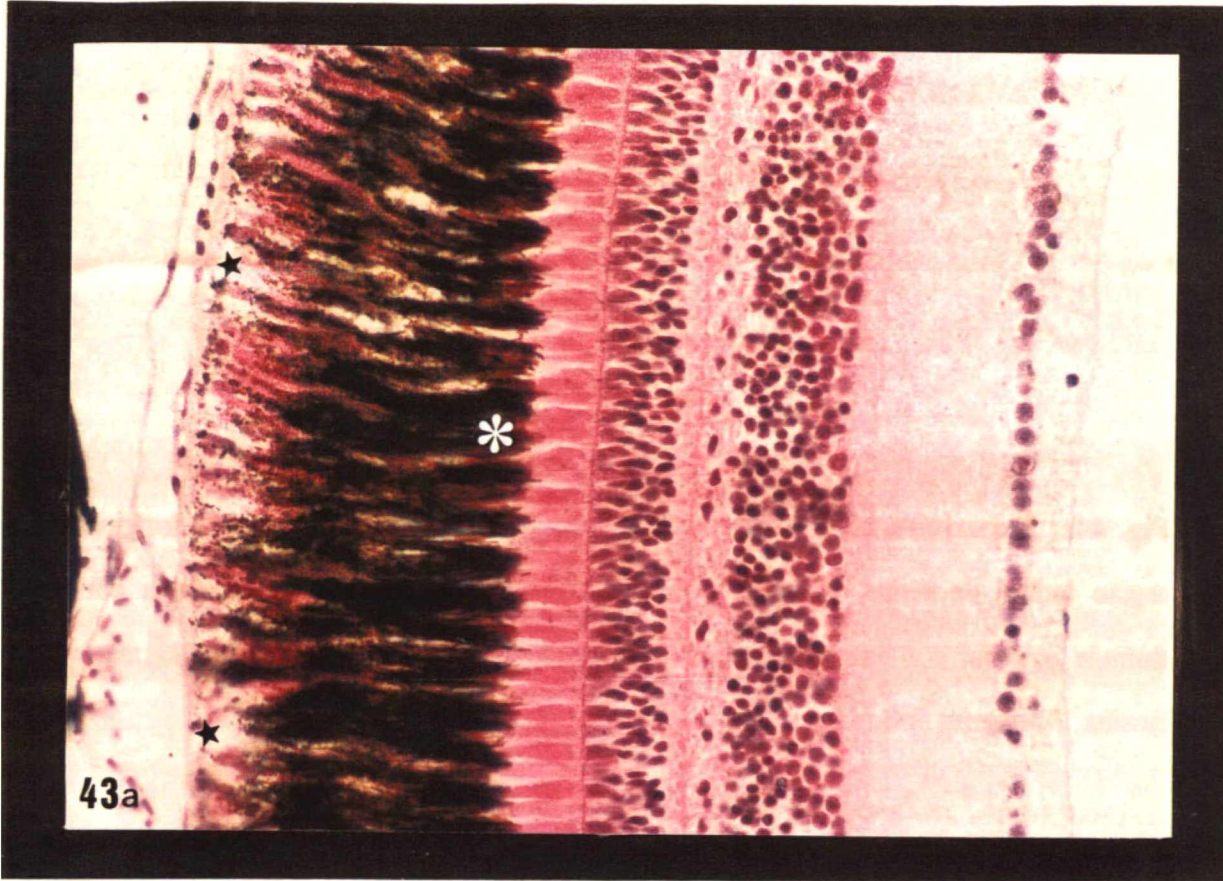


Fig. 44a: Experimental, 8 horas após exposição à luz vermelha. Corte longitudinal da região lateral da retina. Observar a distribuição dos pigmentos de melanina em toda a camada epitelial e a sua concentração na região basal (★).Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

Fig. 44b: Controle, 8 horas após exposição à luz branca. Corte longitudinal da região lateral da retina. Observar os pigmentos de melanina concentrados na região apical (*) do epitélio pigmentar da retina. Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

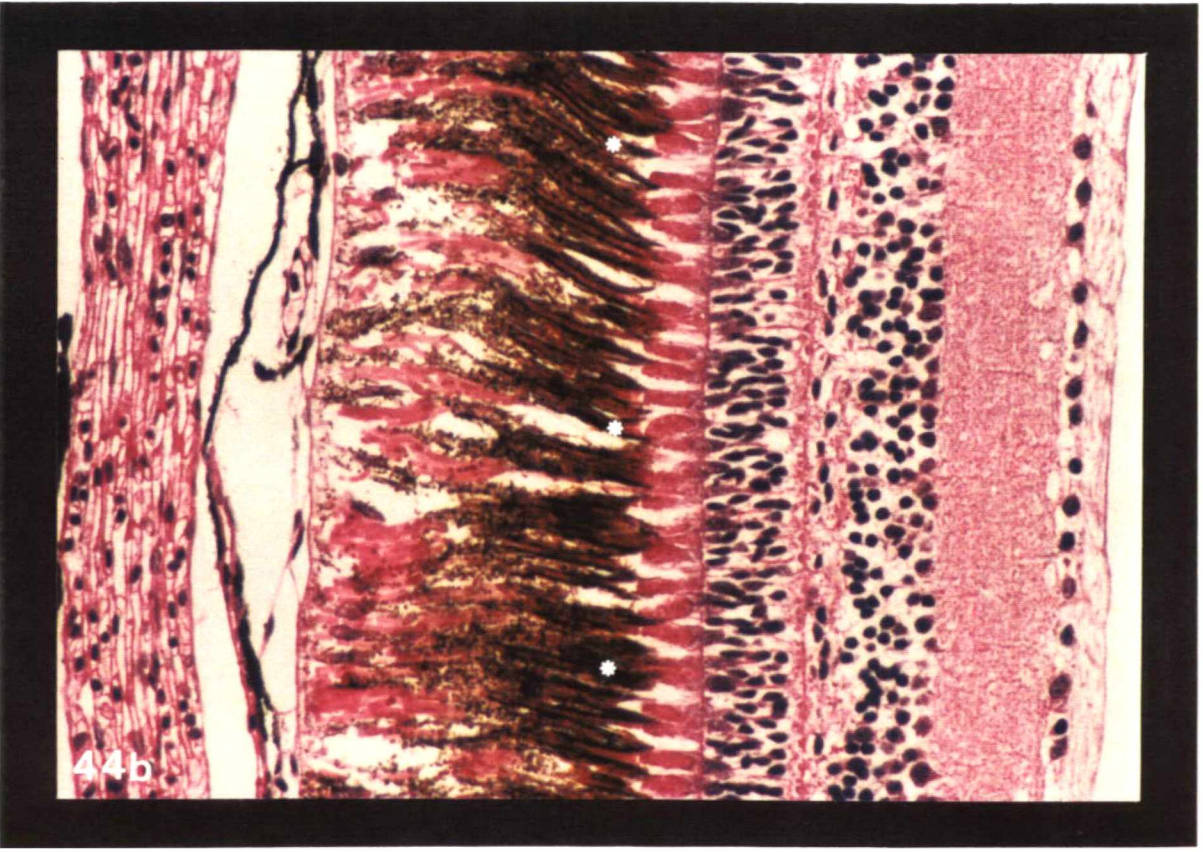
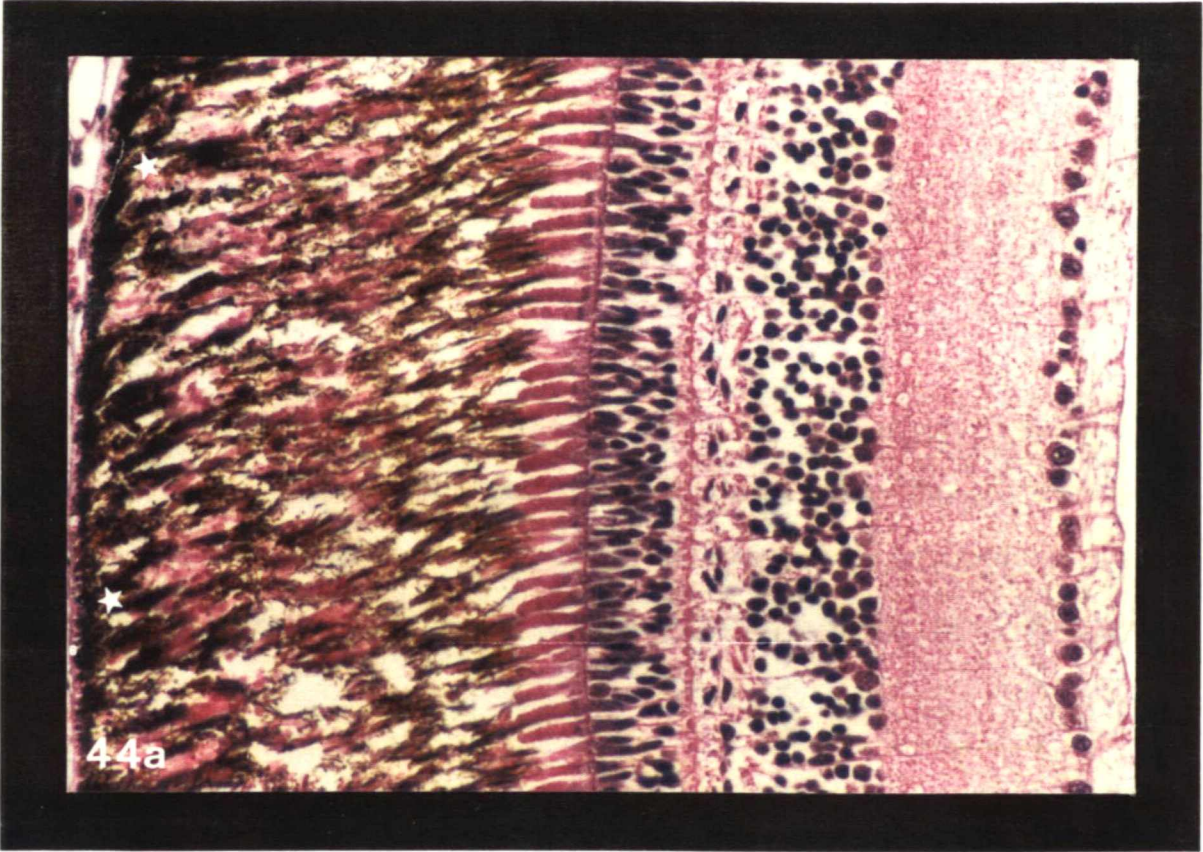


Fig. 45a: Experimental, 24 horas após exposição à luz vermelha. Corte longitudinal da região lateral da retina. Observar a concentração dos pigmentos de melanina na região basal (★) e apical (✱) das células epiteliais. Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

Fig. 45b: Controle, 24 horas após exposição à luz branca. Corte longitudinal da região lateral da retina. Observar a concentração dos pigmentos de melanina na região basal (★) e apical (✱) das células epiteliais como o encontrado na Fig. 45a, só que com menor intensidade. Coloração; Hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

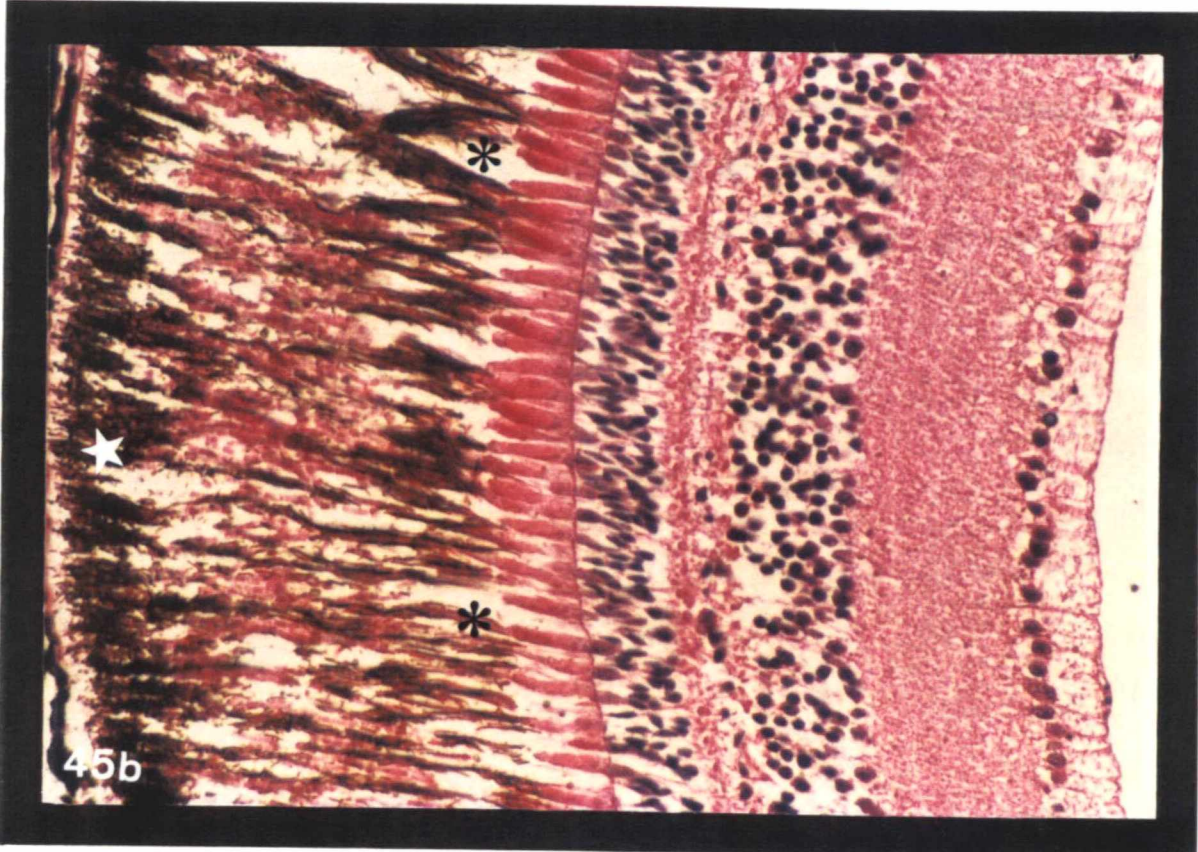
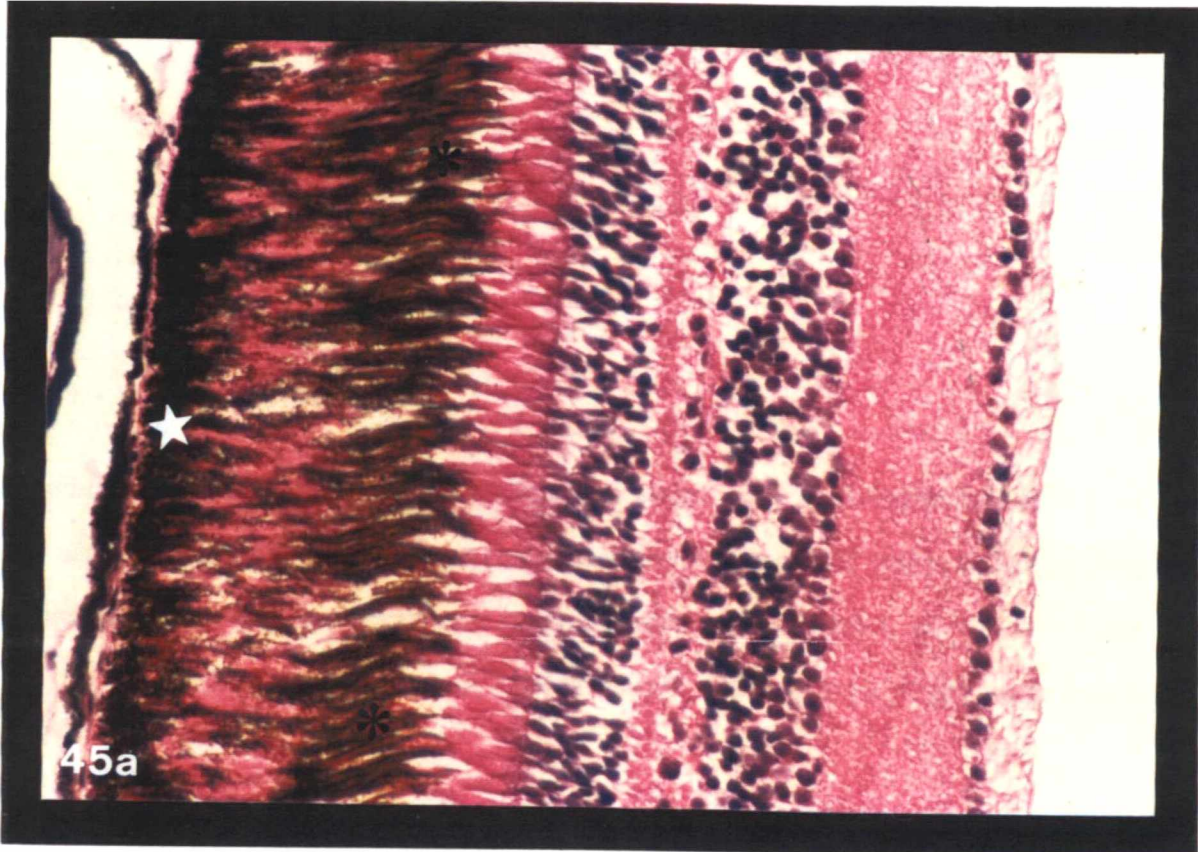


Fig. 46a: Experimental, 48 horas após exposição à luz vermelha. Corte longitudinal da região lateral da retina. Observar a concentração dos pigmentos de melanina na região basal (✱) e apical (★) das células epiteliais, como o encontrado em 24 horas de exposição à luz vermelha (Fig. 45a). Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

Fig. 46b: Experimental, 48 horas após exposição à luz branca. Corte longitudinal da região lateral da retina. Observar a concentração dos pigmentos de melanina na região basal (✱) e apical (★) das células epiteliais, como o encontrado em 24 horas de exposição à luz branca (Fig. 44b). Coloração; Hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

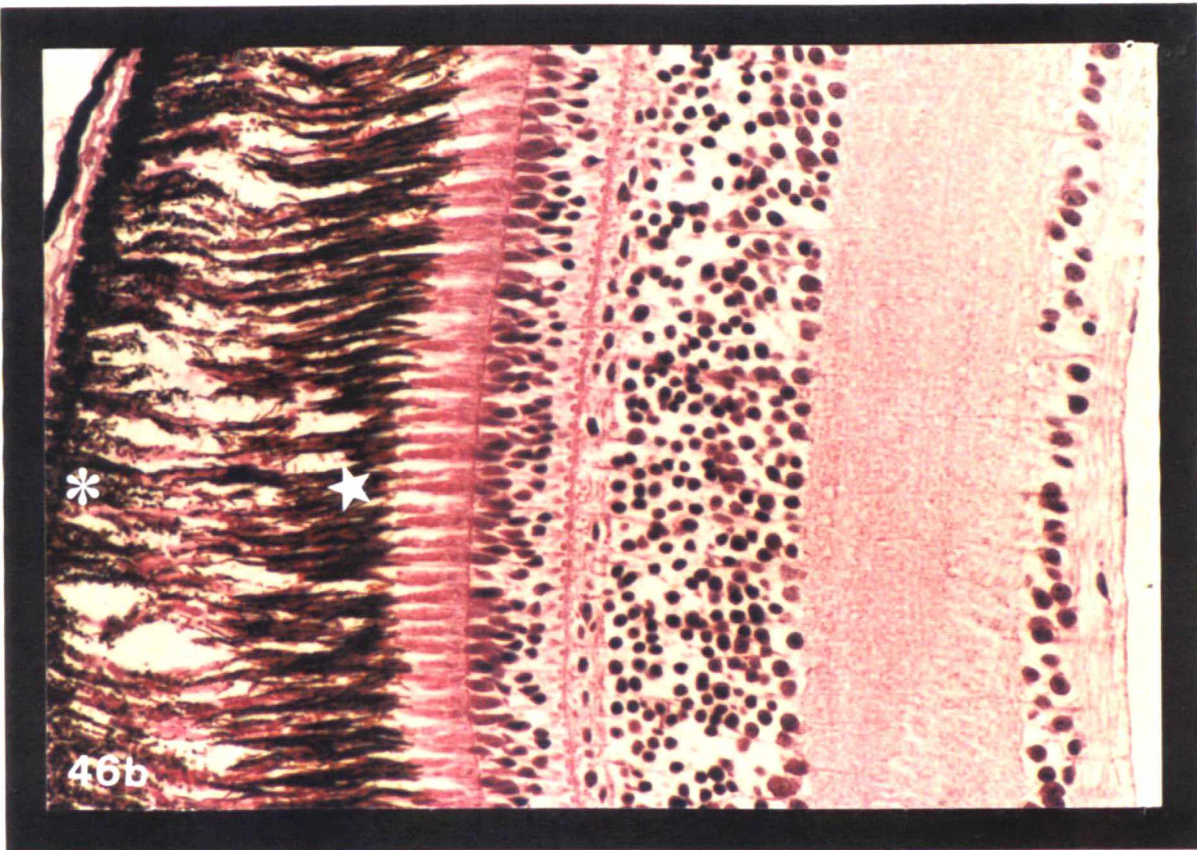
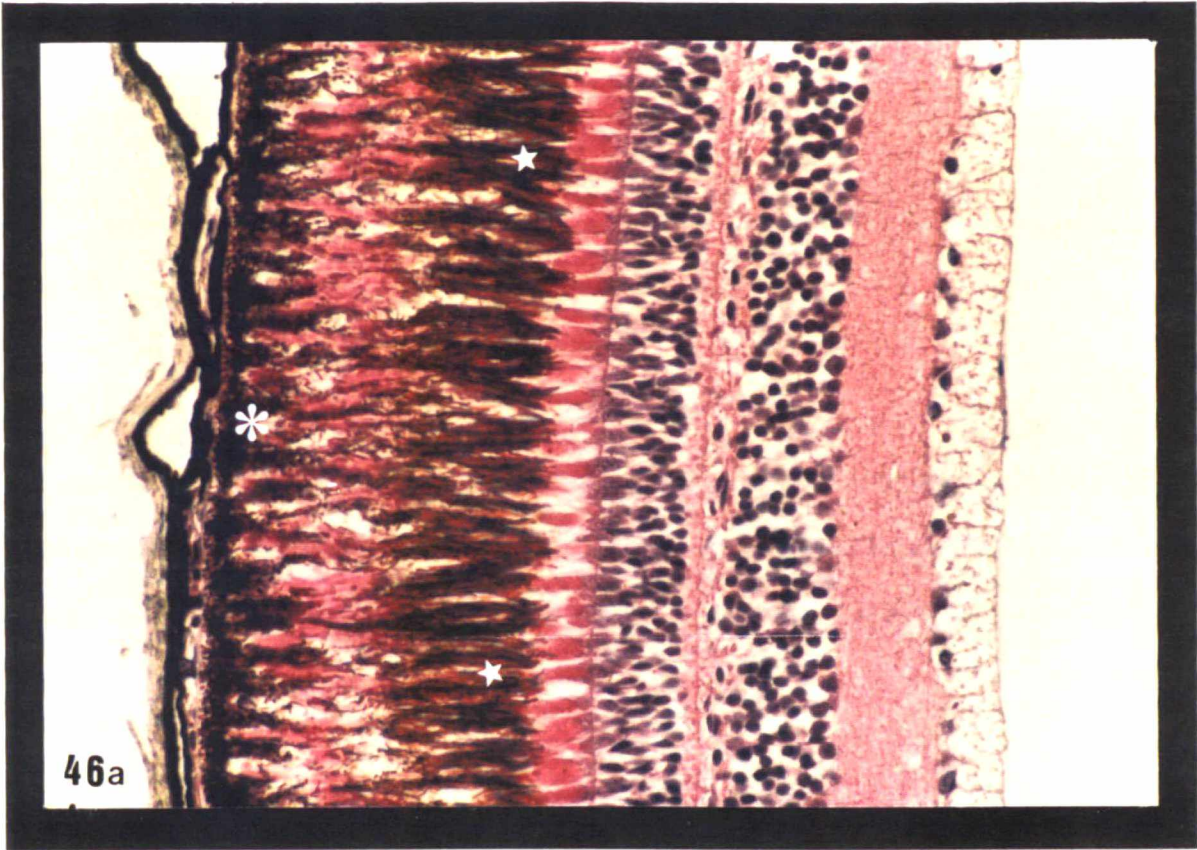


Fig. 47a: Experimental, uma semana após exposição à luz vermelha. Corte longitudinal da região lateral da retina. Observar a concentração dos pigmentos de melanina na região basal (✱) e apical (★) das células epiteliais. Coloração: hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

Fig. 47b: Controle, uma semana após exposição à luz branca. Corte longitudinal da região lateral da retina. Observar a concentração dos pigmentos de melanina na região basal (✱) e apical (★) das células epiteliais. Coloração: Hematoxilina - Eosina. Aumento: 552 x

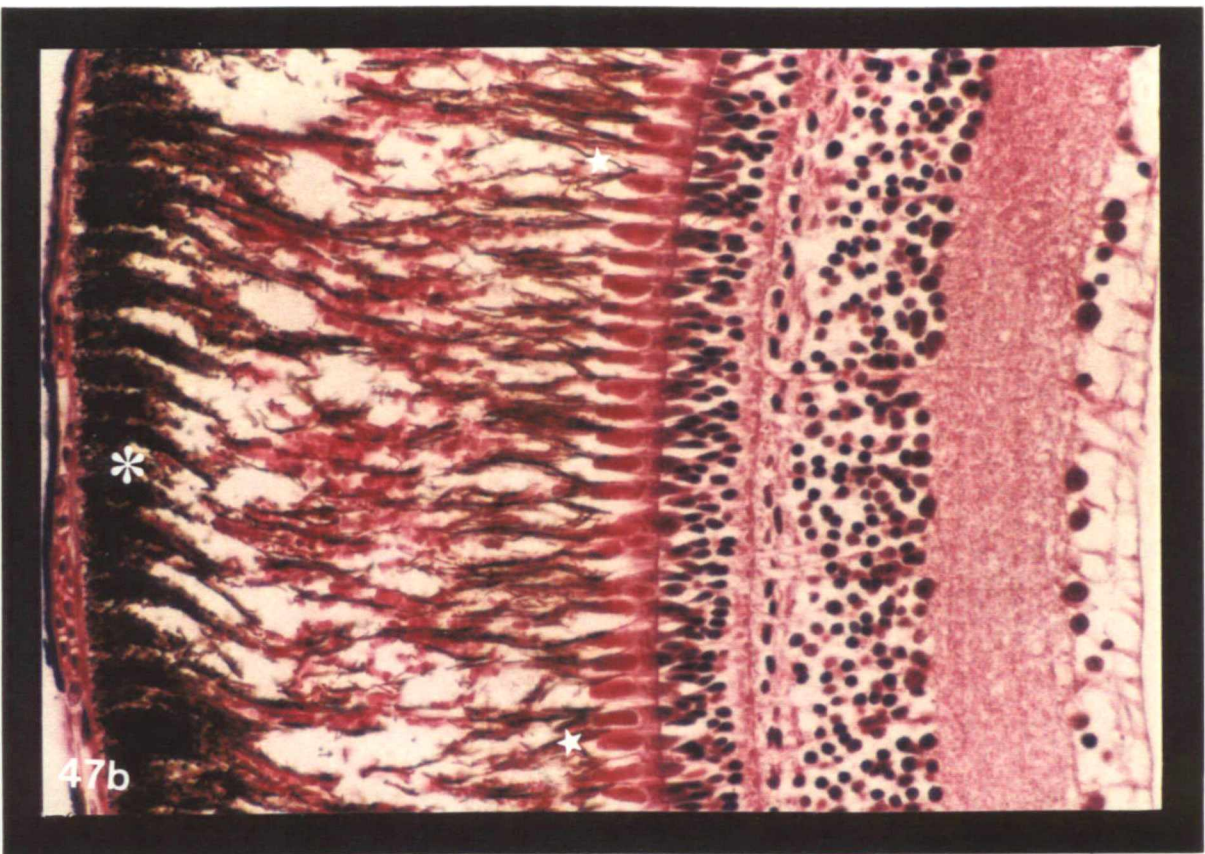
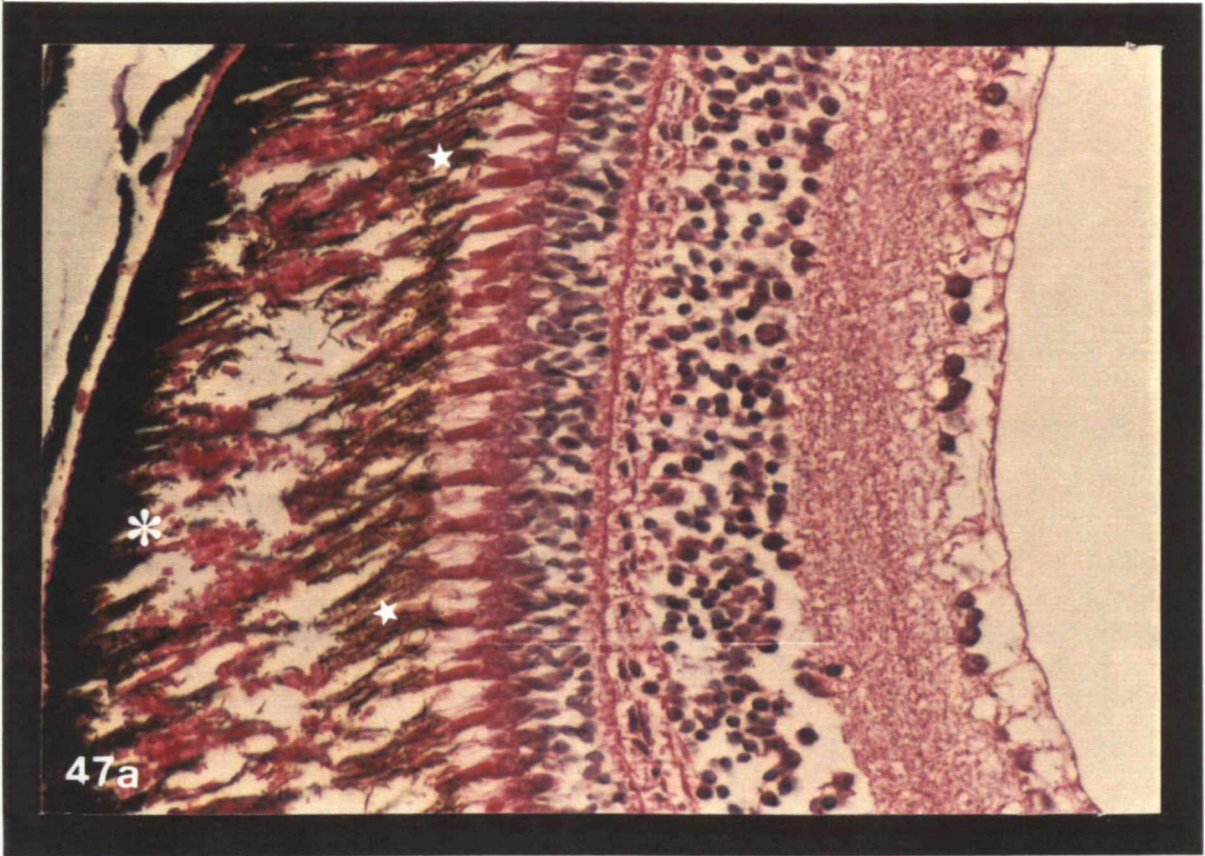






Fig. 48: Experimental, uma semana após exposição à luz vermelha. Membranas destacadas () localizadas no citoplasma das células epiteliais. Observar o segmento externo das células fotorreceptoras () e os pigmentos de melanina (**pm**). Aumento: 9.700 x

Fig. 49: Experimental, uma semana após exposição à luz vermelha. Pacotes de membranas destacadas () localizadas no citoplasma das células epiteliais. Observar o segmento externo das células fotorreceptoras () e os pigmentos de melanina (**pm**). Aumento: 14.500 x

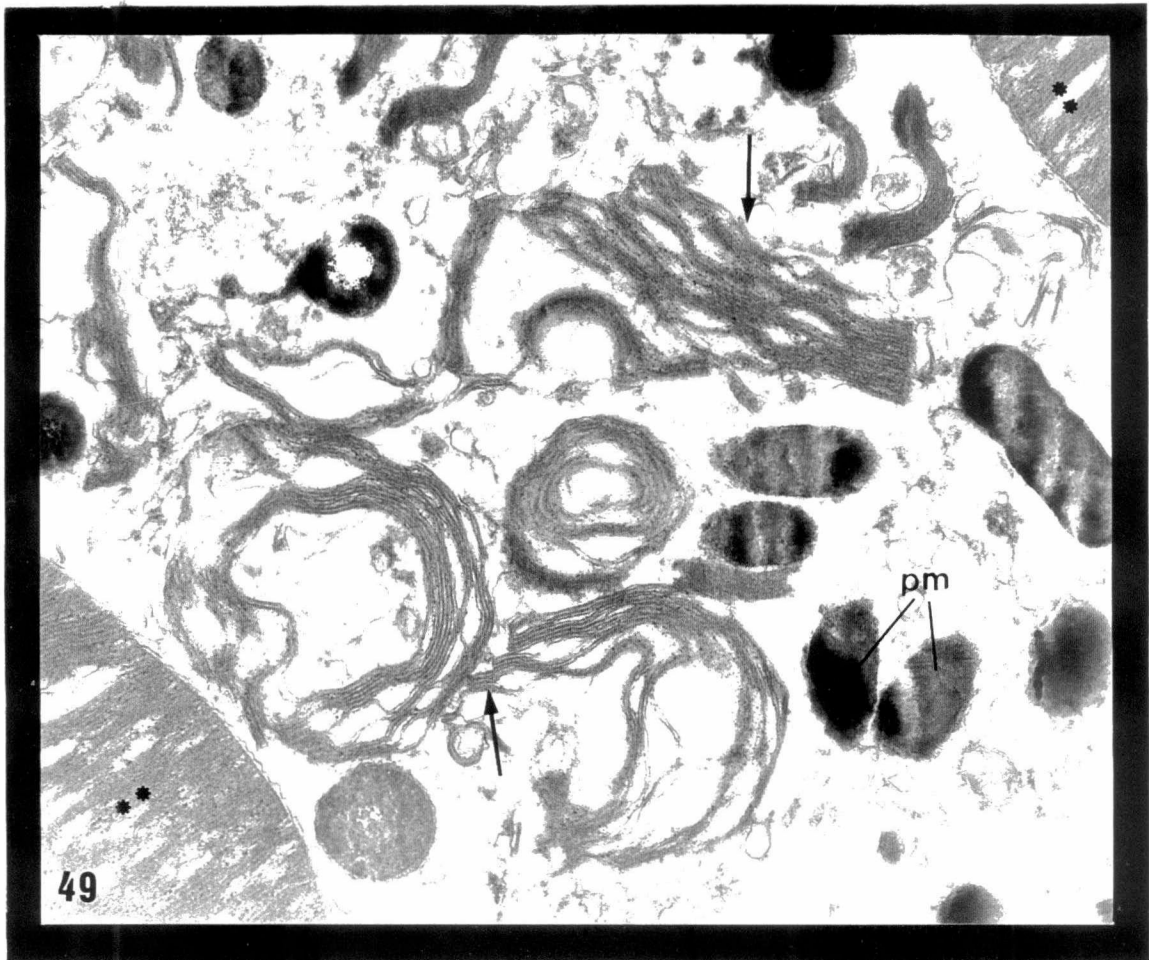
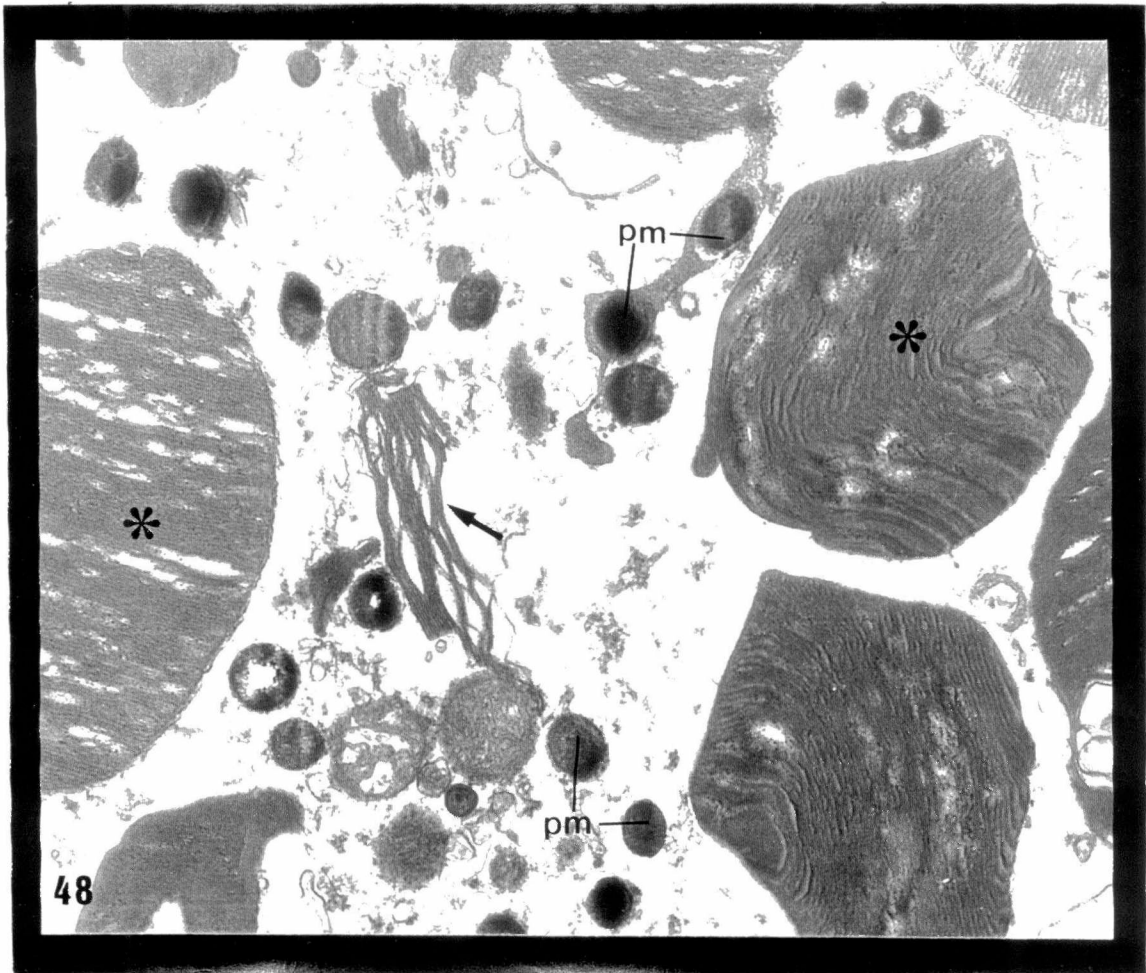


Fig. 05: Localização dos olhos em *Metynnis roosevelti*. **A.** Vista lateral; **B.** Vista dorsal; **C.** Vista frontal, sendo que **C1** representa a posição normal do olho e **C2** representa o olho puxado para dentro inferiormente, quando o animal olha para baixo.

5. Discussão

O peixe utilizado nesse trabalho, *Metynnis roosevelti* Eigenmann, 1915, caracteriza-se por possuir uma grande atividade natatória, necessitando de lugares amplos para isso (SEVERI, 1991; GIESSMANN, 1994; MACHADO-ALLISON, 1983; GÉRY e FRANCE, 1979). O seu habitat são as águas doces rasas de regiões tropicais e subtropicais do Brasil (SEVERI, 1991; MACHADO-ALLISON, 1983).

Assim, a variabilidade dos fatores bióticos e abióticos, características destas regiões, certamente terão influência no desenvolvimento e na ecologia desses animais em seu habitat natural. Entre os fatores ambientais, a luz, fator abiótico da maior importância, foi escolhido para este estudo, já que a energia radiante proveniente do sol é um requisito básico para a existência da vida na Terra.

PEARSE (1939) expressou que " a luz coloca os organismos vivos a braços com um dilema: a exposição direta do protoplasma à luz causa a morte, porém a luz é a fonte final de energia sem a qual a vida não poderia existir ". Conseqüentemente, grande parte das características estruturais e comportamentais dos seres vivos relaciona-se com a solução deste problema.

Ecologicamente, a qualidade, a intensidade e a duração da luz são importantes, pois os organismos respondem de maneiras diversas a elas. Assim, NICOL (1989) e LOUKASHKIN e GRANT (1959) mostram que alguns peixes teleósteos possuem uma periodicidade alimentar que está relacionada com a luz: alguns animais alimentam-se somente à noite; outros preferem os períodos de transição entre a luz e o escuro; enquanto que ainda outros alimentam-se continuamente. Diferentes tempos de alimentação para espécies que utilizam um mesmo habitat reduzem a competição pelo alimento possibilitando uma melhor exploração do ambiente (FANTA et al., 1994). Além disso também o ciclo reprodutivo da maioria dos animais típicos de zonas temperadas sofre a influência do

comprimento do dia da estação, com um pico ocorrendo geralmente na primavera. As migrações verticais, as atividades motoras e as reações de defesa e ataque são outros exemplos de processos vitais que sofrem a influência da luz (NICOL, 1963 e 1989; ALI e RAYMOND, 1972; WHEELER, 1979 e 1982; WOEHL, 1990).

Devido a todas estas possíveis respostas à intensidade luminosa ou à sua periodicidade os níveis de luz e o fotoperíodo foram mantidos constantes para que a única variável à qual fosse submetido *M. roosevelti* fosse o comprimento de onda. Optou-se por um comprimento de onda longo correspondente à cor vermelha, obtido através de filtragem da luz dia por um papel celofane vermelho com pico de absorbância entre 450 a 600 nanômetros. WHEELER (1979 e 1982) relaciona o comprimento de onda longo correspondente à cor vermelha com uma situação de escuro. Além disto em águas rasas este é um comprimento de onda presente, já que a sua penetração ocorre até uma profundidade de 25 metros em águas doces (LEVINE e MACNICHOL, 1982). Sendo *M. roosevelti* um habitante de águas doces rasas, buscou-se nesse trabalho descrever a morfologia retiniana dessa espécie e verificar alterações citológicas quando a mesma é submetida em laboratório a um regime de luz monocromática vermelha.

A retina de *M. roosevelti*, sob o ponto de vista histológico, está dividida em dez camadas que correspondem às diferentes regiões de seus constituintes celulares. Apesar dessa divisão em regiões ser aceita por vários estudiosos (ZAUNREITER et al., 1991; ZYZNAR e ALI, 1975; BURKITT et al., 1994; ROSS et al., 1993; KOHBARA et al., 1987; ECKELBARGER et al., 1980; ALI e RAYMOND, 1972; ALI, 1981; PHAN, 1986), trabalhos recentes a contestam (GRÖTZNER, 1994; GLICKSTEIN, 1976). GLICKSTEIN (1976) considera a distribuição das células que compõe a retina de acordo com sua natureza. Assim, a retina seria formada por três camadas celulares: um grupo de fotorreceptores que traduz a energia luminosa em sinal neural; um conjunto de células com muitas conexões laterais; e um arranjo de células ganglionares que transmitem a imagem modificada para o cérebro. A nomenclatura antiga não está incorreta e foi utilizada na

descrição para *M. roosevelti*, tendo sido feita de acordo com a distribuição dos constituintes dos vários tipos de células da retina. Assim sendo, para comparações de descrições das camadas da retina é sempre importante verificar quais os parâmetros de classificação usados.

A retina de *M. roosevelti* é uma matriz complexa de diferentes tipos de neurônios arranjados em maior ou menor regularidade nas camadas. Como em outros peixes, esses neurônios são responsáveis pela formação de conexões entre as células nervosas modificadas ou fotorreceptoras e os neurônios aferentes, reunidos para constituir o nervo óptico (WITKOVSKY e STELL, 1973; STELL, 1967).

A organização sináptica na retina dos vertebrados inferiores, dentre eles os peixes, quando comparada com a dos vertebrados superiores, caracteriza-se por possuir as conexões interneurais intimamente relacionadas e mais complexas. Isso ocorre devido a uma menor encefalização nos vertebrados inferiores que nos superiores. Nestes últimos a organização sináptica foi simplificada e a atividade interativa foi transferida para os centros nervosos mais altos (DOWLING e WERBLIN, 1969; NAKA, 1977; HITCHCOCK e EASTER JR., 1986).

O estudo dos diferentes tipos de neurônios presentes na retina de *M. roosevelti* mostrou-se um trabalho difícil pois nos peixes teleósteos as células bipolares, horizontais, amácrinas e ganglionares variam não só em quantidade como também morfológicamente, dependendo da espécie (MANGEL e DOWLING, 1987; SHERRY e YAZULLA, 1993; KANEKO, 1970; NAKA, 1977; STELL, 1967; RAYNAULD et al., 1979; HITCHCOCK e EASTER JR, 1986; WITKOVSKY et al., 1974).

A análise em microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão da retina de *M. roosevelti* nos fornece algumas informações sobre os seus neurônios retinianos. Pode-se identificar as células horizontais, bipolares e amácrinas que têm os seus corpos celulares dispostos na camada nuclear interna. As células ganglionares possuem os seus corpos celulares localizados logo abaixo da camada plexiforme interna. Em *M. roosevelti*

observa-se que essas células nervosas, como em outras espécies de peixes, formam uma rede neural que entra em contato com o campo receptivo das células fotorreceptoras e possibilitam um caminho pelo qual a mensagem iniciada nas células fotorreceptoras consiga ser decodificada no sistema nervoso.

Podemos também perceber nitidamente duas camadas plexiformes na retina, sendo que a externa - como em outros peixes teleósteos - caracteriza-se por possuir os primeiros contatos sinápticos do sistema visual (WITKOVSKY e STELL, 1973; STELL, 1967; RAYNAULD et al., 1979).

A retina de *M. roosevelti* caracteriza-se por ser uma retina dupla, com a presença de cones e bastonetes. A existência de uma retina dupla em peixes teleósteos é descrita na maioria dos trabalhos (AHLBERT, 1976; ENGSTRÖM, 1963a e 1963b; KOHBARA et al., 1987; GRÖTZNER, 1994; MEER, 1992; BRAEKEVELT, 1992a; DUNN, 1966b; SILLMAN et al., 1993; WOEHL, 1990; DOWNING et al., 1986; DARTNALL e TANSLEY, 1963; VILLEGAS, 1960; COHEN, 1963; DICKSON e HOLLENBERG, 1971; DICKSON e GRAVES, 1979; ECKELBARGER et al., 1980; LIEPE e BURNSIDE, 1993; PHAN, 1986). A presença de uma retina dupla está coadunada com a teoria da duplicidade, na qual a visão escotópica é mediada pelos bastonetes enquanto que a fótica pelos cones (LEVINE e MACNICHOL JR., 1982; NICOL, 1963; PAULUS et al., 1986; MUNK 1982 e 1981).

M. roosevelti, assim como outros teleósteos, vivem em uma grande variedade de meios luminosos. Cada meio diferente pode apresentar problemas visuais diversos para seus habitantes e uma retina dupla possibilita estratégias adaptativas para esses diferentes meios fóticos.

A densidade de cones na retina de *M. roosevelti* varia de acordo com a região retiniana analisada, sendo maior nas regiões laterais. Em relação aos bastonetes é difícil afirmar alguma coisa, pois os mesmos são mascarados pelos grânulos de melanina. Essas diferenças de densidade de cones e talvez de bastonetes existentes em *M. roosevelti* indica

uma especialização das diferentes partes da retina para uma determinada função. Assim, regiões com maior densidade de cones são responsáveis por uma maior acuidade visual e uma boa resolução, essenciais para a penetração da luz. Regiões com maior densidade de bastonetes são responsáveis pela detecção da presença ou ausência de luz, das diferenças de intensidade luminosa, dos movimentos e das siluetas dos objetos presentes no meio, que muitas vezes podem ser uma presa, um predador ou um companheiro para o acasalamento. ALI e RAYMOND (1972) dividiram a retina da piranha *Serrasalmus marginatus* em quatro regiões, sendo que as regiões dorsal e nasal, com maior densidade de bastonetes, são especializadas para distinguir vultos a baixa luminosidade, enquanto que as ventral e temporal, com maior densidade de cones, são responsáveis pela acuidade visual.

Os cones e bastonetes presentes na retina de *M. roosevelti* possuem o segmento externo formado por discos ou sacos membranosos dispostos transversalmente no eixo das células fotorreceptoras. Essas estruturas membranosas de natureza lipídica foram descritas em várias espécies de peixes teleósteos (DICKSON e GRAVES, 1979; BORWEIN e HOLLENBERG, 1973; JANUSCHKA et al., 1987; VILLEGAS, 1960; YACOB et al., 1977; DICKSON e HOLLENBERG, 1971; BRAEKEVELT, 1992a; ECKELBARGER et al., 1980; SILLMAN et al., 1993; WOEHL, 1990). A característica histológica dos segmentos externos de cones e bastonetes na forma de sacos ou discos membranosos, talvez, tenha a função de aumentar a superfície possibilitando um maior acúmulo de ftopigmentos.

Os pigmentos visuais responsáveis pelo processo fotoquímico estão localizados nessas estruturas membranosas (LEVINE e MACNICHOL JR., 1982; WHEELER, 1979 e 1982). Os diferentes tipos de pigmentos visuais determinam a sensibilidade espectral em uma espécie teleostea, através da captura de fótons de luz e da sua posterior absorção (LEVINE e MACNICHOL JR., 1982; PAULUS et al., 1986; NICOL, 1963).

Para ser capaz de ter visão em cores, um peixe não pode somente ter dois ou mais pigmentos visuais. Necessita de conexões interneurais que possibilitam a comparação dos

sinais provenientes dos fotorreceptores e que são responsáveis pela formação de um caminho neural específico, pelo qual a mensagem dos receptores chega ao sistema nervoso central (LEVINE e MACNICHOL JR., 1982). *M. roosevelti*, provavelmente, possui uma visão cromática, pois apresenta diferentes tipos de cones que devem conter pigmentos visuais específicos. Além disso, apresentam células horizontais e ganglionares que são bons indicadores da sensibilidade espectral e da visão de cores em peixes.

Os diferentes tipos de cones encontrados na retina de *M. roosevelti* são similares àqueles descritos para outros peixes teleósteos (BOEHLERT, 1978; NAG e SUR, 1992; AHLBERT, 1969 e 1976; MAKSIMOV e PODUGOL'NIKOVA, 1978; MARCHIAFAVA, 1985; ENGSTRÖM, 1960 e 1963a; JANUSACHKA et al., 1987; GRÖTZNER et al., 1994; FANTA et al., 1994). No presente estudo, foram encontrados cones simples do tipo longo e curto e cones duplos. Morfologicamente, os cones duplos diferem dos cones simples na retina de *M. roosevelti* por serem formados por duas metades do mesmo tipo e tamanho (isômeros), fusionadas ao longo dos seus segmentos internos; e também por serem mais volumosos e em maior número que os cones simples. Algumas espécies de peixes teleósteos possuem cones duplos cujas metades diferem morfológicamente, sendo portanto estereoisômeros (MAKSIMOV e PODUGOL'NIKOVA, 1978). Não é esse o caso de *M. roosevelti*, pois os dois isômeros coram-se de maneira idêntica em hematoxilina-eosina, o que é corroborado pelos resultados obtidos através de microscopia eletrônica.

Comparações interespecíficas têm mostrado que espécies ativas vivendo em águas rasas, como é o caso de *M. roosevelti*, possuem um mosaico de cones duplos e simples, enquanto que as espécies que vivem em águas profundas possuem somente cones duplos (ENGSTRÖM, 1963a; LYALL, 1957; BOEHLERT, 1978; GRÖTZNER, 1994; FANTA et al., 1994).

Correlacionando a variabilidade de tipos dos cones com a ecologia e o padrão de comportamento em *M. roosevelti*, sugere-se que, a presença de diferentes tipos de cones auxilie na percepção do movimento das presas, possibilitando mecanismos de proteção e

ataque. Facilitaria ainda as migrações verticais e relações intraespecíficas, já que estes animais têm hábitos típicos dos formadores de cardumes. A presença de diferentes tipos de cones favorece também a resolução espacial desses animais.

M. roosevelti apresenta os cones arranjados na forma de um mosaico regular em quadra. Os cones estão dispostos na retina de peixes teleósteos em diferentes mosaicos, sendo os em quadra e em fileira os mais freqüentes (MEER, 1992; FANTA et al., 1994; KUNZ, 1980; EIGENMANN e SHAFER, 1900; LYALL, 1957; ENSGSTRÖM, 1963a e 1960; DUNN, 1966a; WAHL, 1994; GRÖTZNER, 1994; AHLBERT, 1969).

Nenhum significado funcional tem sido atribuído com precisão aos diferentes tipos de mosaico. A sua freqüência sugere que o mosaico em quadra está relacionado com a percepção de movimentos em todas as direções, enquanto que, o mosaico em fileira é restrito à percepção de somente duas direções (KUNZ, 1980; AHLBERT, 1976).

O padrão de cones na forma de mosaico em quadra em peixes teleósteos é geralmente encontrado em espécies que apresentam movimentos rápidos, principalmente em relação às suas presas (DUNN, 1966a; KUNZ, 1980; AHLBERT, 1976). Esse padrão de mosaico em quadra, também presente em *M. roosevelti*, espécie sempre ativa, deve colaborar para uma percepção visual rápida e eficiente do alimento e do ambiente. Além disto *M. roosevelti*, espécie omnívora e migratória é capaz de percorrer grandes extensões durante o período reprodutivo, necessitando para isso de boa capacidade de discriminação visual.

O epitélio pigmentar da retina em *M. roosevelti* é basicamente similar aos descritos em outros vertebrados, mas, com modificações específicas. Como o descrito para todas as espécies de peixes teleósteos, o epitélio pigmentar em *M. roosevelti* consiste em uma única camada de células colunares que possuem na sua região apical numerosos processos digitiformes, utilizados para suportar estruturalmente o segmento externo de fotorreceptores, bem como para orientá-los efetivamente na entrada da luz (BRAEKEVELT, 1992b; NGUYEN-LEGROS, 1978; MIGUEL et al., 1992).

M. roosevelti possui um epitélio pigmentar saliente que ocupa aproximadamente a metade da retina visual. Por viver em ambientes com uma variedade muito grande de intensidade luminosa, esse epitélio tem a função primordial de proteger os segmentos externos principalmente das células fotorreceptoras em forma de bastonetes à uma exposição direta da luz evitando com isso o branqueamento do fotopigmento presente nessas regiões.

O padrão de polarização existente nas células epiteliais, ou seja, região basal em contato com a coróide e a apical com as células fotorreceptoras indica certamente o caminho de entrada de nutrientes na retina. *M. roosevelti* possui uma rede sanguínea bem desenvolvida na coróide. Uma grande parte das substâncias necessárias para o metabolismo dos pigmentos visuais pode passar do fluxo sanguíneo da coróide, ou seja, dos coriocapilares para o interior da retina através do epitélio pigmentar.

No olho de *M. roosevelti*, os pigmentos de melanina presentes nas células do epitélio pigmentar movem-se de acordo com as mudanças de iluminação no meio. No escuro, pigmentos de melanina agregam-se na base da célula, enquanto que na luz, dispersam-se ao longo das projeções apicais. Esse fenômeno, conhecido como movimento retinomotor ou fotomecânico, tem sido observado em outras espécies de peixes (ALI, 1971 e 1975; GUMA'A, 1982; KIRSCH et al., 1989; HARA et al.,1990; BRUENNER e BURNSIDE, 1981; WALLS, 1942; DOUGLAS, 1982; LEVINSON e BURNSIDE, 1981; ES-SOUNNI et al., 1987; MCMAHON e BARLOW JR, 1992; LIEPE e BURNSIDE, 1993).

HERZOG (1905) e EXNER e JANUSCHKE (1906), citados por DOUGLAS (1982), vêem o movimento retinomotor como um meio de adaptação do olho para visão fótica ou diurna e escotópica ou noturna.

Acredita-se que um dos papéis do epitélio pigmentar no movimento retinomotor é o de aumentar a acuidade visual através do isolamento de receptores vizinhos ou seja, dos cones. O outro seria o de prevenir o branqueamento do fotopigmento presente nas células

fotorreceptoras (DOUGLAS, 1982; KIRSCH et al., 1989; ALI, 1971 e 1975). Essas duas funções descritas na literatura devem também ser verdadeiras para a espécie utilizada nesse trabalho.

Quando analisamos a ação da luz monocromática vermelha sobre a retina de *M. roosevelti* e a comparamos com uma retina submetida à luz branca, observamos que não ocorreram variações morfológicas significativas nas células fotorreceptoras e nas células nervosas.

Entretanto nos animais mantidos em regime de luz monocromática vermelha há uma maior migração de pigmentos de melanina no epitélio pigmentar da retina, de forma gradual, da região esclérica das células epiteliais em direção à região apical dessas células. Após 8 horas de exposição à luz vermelha temos uma retina muito semelhante aquela exposta ao escuro. Para várias espécies verifica-se que o comprimento de onda longo correspondente à cor vermelha está relacionado com uma adaptação do animal a uma situação de escuro (WHEELER, 1979 e 1982; LEVINE e MACNICHOL JR., 1982; NICOL, 1963).

O comprimento de onda longo correspondente à cor vermelha têm uma influência sobre o comportamento, a fisiologia e a morfologia dos peixes expostos à ele (LEVINE e MACNICHOL JR, 1989; NICOL, 1963; WHEELER, 1979 e 1982; WOEHL, 1990; FANTA, 1995; CRESCITELLI, 1991, SHAND et al., 1988). A diminuição da atividade motora, o aumento da agressividade e a perda da acuidade visual são alguns exemplos (FANTA, 1995; WOEHL, 1990; WHEELER 1979 e 1982; NICOL, 1963 LEVINE e MACNICHOL JR, 1982).

Em *M. roosevelti* exposto à luz monocromática vermelha, nas primeiras quatro horas de exposição a retina se adapta à presença de luz mas algumas horas depois, como a luz apresentada tem um comprimento de onda interpretado como escuro ou pelo menos penumbra intensa, a retina se adapta ao escuro. Isso sugere que *M. roosevelti* tem mecanismos morfofuncionais para rearranjar a distribuição dos pigmentos de melanina na

camada epitelial através de ações fotomecânicas.. Essa alteração ocorreu, tendo em vista que no escuro as células fotorreceptoras ativas são os bastonetes que funcionam na visão periférica e noturna. Não havendo mais a necessidade dos pigmentos de melanina protegerem os segmentos externos dos bastonetes à uma exposição direta da luz evitando com isso o branqueamento dos fotopigmentos, eles se retraem à região basal das células epiteliais. O fenômeno inicial de expansão dos pigmentos de melanina, característica de uma retina adaptada à luz, talvez tenha relação com o ritmo circadiano próprio ao animal e à sua adaptação à alternância constante de claro e escuro. Assim os movimentos retinomotores sofrem a influência simultânea de fatores exógenos como a luz e endógenos como o ritmo circadiano (LEVINSON e BURNSIDE, 1981). Deve-se levar em consideração que a amplitude de um movimento fotomecânico sob ciclos de alternância de luz e escuro podem resultar de uma combinação de movimentos retinomotores endógenos e resposta as condições de luz no meio.

A migração de pigmentos de melanina nos animais controle ocorreu como era o esperado, estendendo-se desde o início do período iluminado até seu final de uma maneira gradual. Isso significa que os pigmentos de melanina nesta espécie migram da região esclérica da camada epitelial da retina para à apical no decorrer do período luminoso, protegendo o segmento externo das células fotorreceptoras em forma de bastonetes à uma exposição direta da luz.

A perda de segmentos externos das células fotorreceptoras e a sua fagocitose pelas células do epitélio pigmentar é um fenômeno usual na retina de peixes teleósteos, sendo consequência de uma contínua renovação de seus constituintes celulares (O'DAY e YOUNG, 1978; BRAEKEVELT, 1980), o que foi observado também em *M. roosevelti*.

A renovação de membranas da extremidade das células fotorreceptoras só foi observado em animais expostos à luz monocromática vermelha após uma semana. Isso talvez seja um mecanismo de defesa para situações de emergências, já que o animal está exposto a uma situação fótica incomum. O ambiente em que os animais expostos à luz

monocromática vermelha vivem corresponde a uma situação de escuro, portanto as células em forma de bastonetes são as mais ativas. Partindo-se disto, os bastonetes possuem uma maior necessidade de renovação de seus constituintes celulares havendo com isso uma maior renovação de seus segmentos externos.

Assim, verifica-se que *M. roosevelti* possui um sistema fotorreceptor competente que lhe possibilita viver em ambientes claros e altamente influenciados pela luz. Para tanto, *M. roosevelti* possui uma retina com características morfofuncionais específicas que determinam o seu comportamento e a sua ecologia.

6. Conclusões

6.1 *Metynnis roosevelti* tem a possibilidade de executar um comportamento visual eficaz, em um meio fótico variado, por ser sua retina uma matriz complexa de neurônios.

6.2 *Metynnis roosevelti* possui uma retina dupla, formada por células fotorreceptoras em forma de cones e bastonetes, o que possibilita estratégias adaptativas para diferentes meios fóticos.

6.3 Os cones em *Metynnis roosevelti* apresentam uma variabilidade morfológica podendo ser classificados em cones duplos e cones simples do tipo curto e longo.

6.4 *Metynnis roosevelti* apresenta diferentes tipos de cones arranjados na forma de um mosaico em quadra.

6.5 *Metynnis roosevelti* possui um epitélio pigmentar bem desenvolvido no qual os pigmentos de melanina sofrem trocas posicionais de acordo com as modificações de iluminação no meio, possibilitando ao animal a proteção dos fotopigmentos presentes nos segmentos externos das células fotorreceptoras em forma de bastonete.

6.6 O comprimento de onda correspondente à cor vermelha está relacionado com a adaptação de *Metynnis roosevelti* a uma situação de escuro, o que foi comprovado pelo rearranjo na distribuição dos pigmentos de melanina na camada epitelial da retina em animais mantidos sob regime de luz monocromática vermelha.

6.7 Em animais controle, isto é, mantidos sob regime de luz branca, a migração dos pigmentos de melanina ocorreu como era o esperado, estendendo-se desde o início do período iluminado até seu final de uma maneira gradual.

6.8 O epitélio pigmentar da retina em *Metynnis roosevelti* participa dos processos de renovação dos segmentos externos das células fotorreceptoras apenas do tipo bastonete, e em maior intensidade quando expostas à um regime de luz monocromática vermelha.

6.9 Em *Metynnis roosevelti* os movimentos retinomotores sofrem a influência tanto do ritmo exógeno do ciclo de alternância de luz e escuro como também o ritmo endógeno, o que motivou a reação inicial à luz vermelha mesmo que correspondendo ao escuro.

6.10 *Metynnis roosevelti* possui um sistema fotorreceptor complexo e competente que possibilita sua vida em ambientes claros e altamente influenciados pela luz, bem como a capacidade adaptativa necessária para enfrentar situações fóticas inusitadas, aumentando suas chances de seleção natural positiva.

ANEXO: SOLUÇÕES FIXADORAS E CORANTES

SOLUÇÃO SALINA DE CORTLAND

Reagentes para 1.000 ml de solução

H ₂ O destilada.....	1.000 ml (q.s.p.)
NaCl.....	7,25 g
KCl.....	0,38 g
CaCl ₂ . H ₂ O.....	0,23 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,23 g
NaHCO ₃	1,00 g
Glucose	1,00 g

Preparo: Dissolver um a um todos os reagentes, na ordem citada acima, em 950 ml de H₂O destilada, usando o agitador magnético com leve aquecimento. Ajuste o pH para 7,6 utilizando HCl ou NaOH. Complete o volume para 1.000 ml de H₂O destilada. Conservar em frasco escuro sob refrigeração. O último reagente depois de adicionado, determina o prazo de validade de 30 dias para a solução, mesmo sob refrigeração.

Fonte: WOELF, 1963

FLUIDO DO BOUIN

Reagentes para 50 ml de solução

Solução aquosa de ácido pícrico saturada.....	37,50 ml
Formaldeído.....	12,50 ml
Ácido acético glacial.....	2,50 ml

Preparo: Misturar os componentes da fórmula.

Fonte: BÜCHERL, 1962; CULLING at al., 1985

FLUIDO DE GENDRE

Reagentes para 50 ml de solução

Ácido pícrico, solução saturada em álcool 95%.....	40,00 ml
Formaldeído	7,50 ml
Ácido acético glacial.....	2,50 ml

Preparo: Misturar os componentes da fórmula

Fonte: CULLING et al., 1985

ALBUMINA DE MAYER

Reagentes para 50 ml de solução

Glicerina.....	uma parte
Clara de ovo.....	uma parte
Cristais de Timol	

Preparo: Agitar a glicerina com a clara de ovo por 30 minutos. Filtrar e acrescentar alguns cristais de timol para evitar fungos. Conservar sob refrigeração.

Fonte: CULLING et al., 1985

GLUTARALDEÍDO a 2,5% em TAMPÃO FOSFATO 0,4M

Reagentes para 50 ml de solução

Glutaraldeído em solução aquosa a 25%.....	5,00 ml
Solução tampão fosfato Sorensen 0,4M e de pH 7,2.....	45,00 ml

Preparo: Misturar os componentes da fórmula, sob capela, com máscara e luvas. Conservar a solução sob refrigeração e acertar o pH para 7,2 com HCl ou NaOH.

Fonte: modificado a partir de GLAUERT, 1986 e CULLING et al., 1985

GLUTARALDEÍDO a 0,5% em TAMPÃO FOSFATO 0,4 M

Reagentes para 50 ml de solução

Glutaraldeído em solução aquosa a 25%.....	1,00 ml
Solução tampão fosfato Sorensen 0,4M e de ph 7,2.....	49,00 ml

Preparo: Misturar os componentes da fórmula, sob capela, com máscara e luvas.
Conservar a solução sob refrigeração e acertar o pH para 7,2 com HCl ou NaOH.

Fonte: modificado a partir de GLAUERT, 1986 e CULLING et al., 1985

GLUTARALDEÍDO a 3,0% em TAMPÃO CACODILATO 0,2M

Reagentes para 50 ml de solução

Glutaraldeído em solução aquosa a 25%.....	6,00 ml
Ácido cacodílico (PM=160).....	1,60 g
H ₂ O destilada.....	q.s.p. 50,00 ml

Preparo: Misturar os componentes da fórmula, sob capela, com máscara e luvas.
Conservar a solução sob refrigeração e acertar o pH para 7,2 com HCl ou NaOH.

Fonte: modificado a partir de GLAUERT, 1986 e CULLING et al., 1985

SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO SORENSEN 0,4M

Reagentes para 50 ml de solução

Solução A: H ₂ PO ₄ . H ₂ O.....	0,77g
H ₂ O destilada.....	q.s.p. 14,00 ml
Solução B: Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O.....	3,80 g
H ₂ O destilada.....	q.s.p. 36,00 ml

Preparo: Misturar as soluções A e B e acertar o pH para 7,2 com HCl ou NaOH.

Fonte: modificado a partir de GLAUERT, 1986

TETRÓXIDO DE ÓSMIO

Reagentes para 50 ml de solução

OsO ₄	2,00 g
H ₂ O destilada.....	50,00 ml

Preparo: Dissolver o OsO₄ em H₂O destilada sob capela usando máscara e luvas. Conservar a solução embalada em três frascos, sendo o primeiro de dentro para fora, o portador da solução. Para o preparo de OsO₄ a 2% diluir o OsO₄ a 4% em tampão fosfato Sorensen 0,4M na proporção de 1:1

Fonte: modificado a partir de GLAUERT, 1986 e CULLING et al., 1985

ACETATO DE URANILA a 2%

Reagentes para 50 ml de solução

Acetato de uranila.....	1,00 g
H ₂ O destilada.....	50,00 ml

Preparo: Dissolver o acetato de uranila em H₂O destilada. Evitar contacto com a luz, caso contrário ocorrerá precipitação da solução. Conservar sob refrigeração.

Fonte: modificado a partir de GLAUERT, 1986

ÁCIDO TÂNICO a 2%

Reagentes para 50 ml de solução

Ácido tânico.....	1,00 g
Solução tampão fosfato Sorensen 0,2M e de pH 7,2.....	50,00 ml

Preparo: Dissolver o ácido tânico em tampão fosfato Sorensen 0,2M e de pH 7,2.

Fonte: GLAUERT, 1986

TRICRÔMICO DE MALLORY

Reagentes para 50 ml de solução

Solução A: Fucsina ácida.....	0,25 g
H ₂ O destilada.....	50,00 ml
Ácido acético glacial.....	1,00 ml
Solução B: Azul de metileno ou de anilina.....	0,25 g
Orange G.....	1,00 g
Ácido fosfotungstênico.....	0,50 g
H ₂ O destilada.....	50,00 ml

Preparo: Misturar os componentes da solução A e B separadamente.

Fonte: modificado a partir de CLARK, 1981

REATIVO DE SCHIFF

Reagentes para 50 ml de solução

Fucsina ácida.....	0,38 g
Metabissulfito de sódio ou potássio.....	2,30 g
HCl concentrado.....	0,75 ml
H ₂ O destilada.....	50,00 ml

Preparo: Dissolver a fucsina ácida em H₂O destilada e ferver esta solução. Deixar esfriar em temperatura ambiente até 60°C . Filtrar a solução e adicionar o metabissulfito de sódio ou potássio. Adicionar o HCl e esperar 24 horas. A solução deverá estar com a cor de palha, caso contrário acrescentar 0,25 g de carvão ativado para cada 100 ml de solução, agitar bem e filtrar. Esperar mais de 6 horas antes do

Fonte: modificado a partir de CLARK, 1981

ÁGUA SULFUROSA

Reagentes para 50 ml de solução

Metabissulfito de sódio.....	2,50 g
HCl a 10N.....	2,50 ml
H ₂ O destilada.....	50,00 ml

Preparo: Misturar os reagentes.

Fonte: modificado a partir de CLARK, 1981

ÁCIDO PERIÓDICO a 0,5%

Reagentes para 50 ml de solução

Ácido periódico.....	0,25 g
H ₂ O destilada.....	50,00 ml

Preparo: Misturar os reagentes.

Fonte: modificado a partir de CLARK, 1981

EOSINA

Reagentes para 50 ml de solução estoque a 1%

Eosina.....	0,50 g
Álcool 95% P.A.....	40,0 ml
H ₂ O destilada.....	10,00 ml

Preparo: Para a solução estoque, misturar os reagentes até obter uma solução homogênea. A solução para uso terá uma parte de eosina a 1% e três partes de álcool a 80% P.A. Acrescentar 0,50 ml de ácido acético glacial para cada 95,00 ml de solução de eosina para uso.

Fonte: modificado a partir de CULLING et al., 1985

HEMATOXILINA FÉRRICA DE HEIDENHAIN

Reagentes para 50 ml de solução

Solução A: Hematoxilina.....0,25 g
 Álcool absoluto.....5,00 ml
 H₂O destilada.....45,00 ml

Solução B: Sulfato férrico amoniacal.....2,50 g
 H₂O destilada.....50,00 ml

Preparo: Para a solução A, dissolver a hematoxilina no álcool antes de adicionar a H₂O destilada. A solução deverá amadurecer durante 3 a 4 semanas antes do uso. Para a solução B dissolver o sulfato férrico amoniacal em H₂O destilada.

Fonte: CULLING et al., 1985

FUCSINA ÁCIDA

Reagentes para 50 ml de solução

Fucsina ácida.....0,50 g
 H₂O destilada.....50,00 ml

Preparo: Dissolver a fucsina ácida na água destilada.

Fonte: BEÇAK e VANRELL, 1970

VERDE - LUZ

Reagentes para 50 ml de solução

Verde luz.....0,50 g
 H₂O destilada.....50,00 ml

Preparo: Misturar os componentes da solução

Fonte: BEÇAK e VANRELL, 1970

HEMATOXILINA DE HARRIS

Reagentes para 50 ml de solução

Hematoxilina.....	0,25 g
Alúmen de potássio(Sulfato de alúmen de potássio) ou de amônio.....	5,00 g
Óxido de mercúrio amarelo.....	0,12 g
Álcool 95% P.A.....	2,50 ml
Ácido acético glacial.....	1,20 ml
H ₂ O destilada.....	50,00 ml

Preparo: Dissolver a hematoxilina no álcool a 95% e reservar . Dissolver o alúmen de potássio em H₂O destilada fervente. Misturar as duas soluções e adicionar o óxido de mercúrio amarelo. Esfriar em água corrente, filtrar e adicionar o ácido acético glacial.

Fonte: modificado a partir de CULLING at al., 1985

SOLUÇÃO DE REYNOLDS

Reagentes para 50 ml de solução

Nitrato de chumbo.....	1,30 g
Citrato de sódio.....	1,75 g
Hidróxido de sódio 1 N.....	8,00 ml
H ₂ O destilada.....	50,00 ml

Preparo: Aquecer a H₂O destilada e deixar esfriar em banho maria. Dissolver o nitrato de chumbo e o citrato de sódio em uma pequena quantidade de H₂O destilada. Agitar e deixar em repouso intercaladamente durante trinta minutos. Adicionar gota a gota a solução de hidróxido de sódio 1 N até a solução ficar transparente. Adicionar à solução a quantidade de H₂O destilada para completar o volume total da solução.

Fonte: GLAUERT, 1986

AZUL DE TOLUIDINA A 1%**Reagentes para 50 ml de solução**

Azul de Toluidina.....	0,50 g
H ₂ O destilada.....	50,00 ml

Preparo: Misturar o azul de toluidina em água destilada

Fonte: modificado a partir de GLAUERT, 1986

FLOXINA**Reagentes para 50 ml de solução**

Floxina a 1%.....	12,50 ml
Álcool a 80% (P.A.).....	37,50 ml

Preparo: Misturar os reagentes e adicionar 5 ml de ácido acético glacial em cada 95 ml de solução corante.

Fonte: CLARK, 1981

Referências Bibliográficas

- AHLBERT, I. B. The organization of the cone cells in the retinae of four teleosts with different feeding habits (*Perca fluviatilis* L., *Lucioperca lucioperca* L., *Acerina cernua* L. and *Coregonus albula* L). **Arkiv. Zool.**, Stockholm, v. 22, n. 11, p. 445- 481, 1969.
- AHLBERT, I. B. Organization of the cone cells in the retinae of salmon (*Salmo salar*) and trout (*Salmo trutta trutta*) in relation to their feeding habits. **Acta. Zool. (Stockl.)**, v. 57, p. 13-35, 1976.
- ALI, M. A. Les reponses retinomotrices: caracteres et mecanismes. **Vision Res.**, Oxford, v. 11, p. 1225-1288, 1971.
- ALI, M. A. **Vision in Fishes**. New York: Plenum Press, 1975. v. 1.
- ALI, M. A. Adaptations rétinienne aux habitats. **Rev. Can. Biol.**, Montreal, v. 40, n. 1, p. 3-17, 1981.
- ALI, M. A.; ANCTIL, M.; MOHIDEEN, H. M. Structure rétinienne et la vascularisation intraoculaire chez quelques poissons marins de la région de Gaspé. **Can. J. Zool.**, Ottawa, v. 46, p. 729-750, 1968.
- ALI, M. A.; KLYNE, M. A.; PARK, E. H.; LEE, S. H. Structural changes in retinal pigmented epithelium of *Rivulus marmoratus* poey embryos during development. **Anat. Embryol.**, v. 177, p. 451-457, 1988.

ALI, M. A.; RAYMOND, N. La retina de piranha (*Serrasalmus marginatus*). **Rev. Biol. (Lisb.)**, v. 8, n. 1-4, p. 27-32, 1972.

ALLEN, E.E.; FERNALD, R. D. Spectral sensitivity of the african cichlid fish, *Haplochromis burtoni*. **J. Comp. Physiol. A Sens. Neural Behav. Physiol.**, Heidelberg, v. 157, p. 247-253, 1985.

BECKER, D. L.; COOK, J. E. Divergent axon collaterals in the regenerating goldfish optic tract : a fluorescence double - label study. **Development (Camb)**, v. 104, p.317 - 320, 1988.

BERNSTEIN, M. H. Functional architecture of the retinal epithelium. IN: SMELSER, G.K. (ed). **The structure of the eye**. New York: Academic Press, 1961. p. 139-150.

BEÇAK, W. Y.; VANRELL, J. P. **Técnicas de citologia e histologia**. São Paulo:Nobel, 1970. 470 p.

BLAXTER, J. H. S.; JONES, M. P The development of the retina and retinomotor responses in the herring. **J. Mar. Biol. Assoc. U. K.**, Cambridge, v. 47, p. 677-697, 1967.

BOEHLERT, G. W. Intraspecific evidence for the function of single and double cones in the teleost retina. **Science (Washington D C)**, v. 202, p. 309-311, 1978.

BORWEIN, B.; HOLLENBERG, M. J. The photoreceptors of the " four eyed " fish, *Anableps anableps* L. **J. Morphol.**, New York, v. 140, p. 405-442, 1973.

BOUJARD, T.; MOREAU, Y.; LUQUET, P. Diel cycles in *Haplosternum littorale* (Teleostei): entrainment of feeding activity by low intensity colored light. **Environ. Biol. Fishes**, Dordrecht, v. 35, p. 301-309, 1992.

BOWMAKER, J. K.; GOVARDOVSKII, V. I.; SHUKOLYUKOV, S.A.; ZUEVA, L.V.; HUNT, D. M.; SIDELEVA, V. G.; SMIRNOVA, O. G. Visual pigments and the photic environment: the cottoid fish of lake Baikal. **Vision Res.**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 591-605, 1994.

BOWMAKER, J. K.; KUNZ, Y. W. Ultraviolet receptors, tetrachromatic colour vision and retinal mosaics in the brown trout (*Salmo trutta*): age - dependent changes. **Vision Res.**, Oxford, v. 27, n. 12, p. 2101-2108, 1987.

BOWMAKER, J. K.; THORPE, A.; DOUGLAS, R. H. Ultraviolet - sensitive cones in the goldfish. **Vision Res.**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 349-352, 1991.

BRAEKEVELT, C. R. Wandering phagocytes at the retinal epithelium - photoreceptor interface in the teleost retina. **Vision Res.**, Oxford, v. 20, p. 495-499, 1980.

BRAEKEVELT, C. R. Retinal photoreceptor fine structure in the velvet cichlid (*Astronotus ocellatus*). **Anat. Embryol.**, Heidelberg, v. 186, p. 363-370, 1992 a.

BRAEKEVELT, C. R. Retinal pigment epithelial fine structure in the velvet cichlid (*Astronotus ocellatus*). **Anat. Embryol.**, Heidelberg, v. 186, p. 371-377, 1992 b.

BRECKLER, J.; BURNSIDE, B. Myosin - I in retinal pigment epithelial cells. **Invest. Ophthalmol. Visual Sci.**, Hagerstown, v. 35, n. 5, p. 2489-2499, 1994.

BRUENNER, U.; BURNSIDE, B. Pigment granule migration in isolated cells of the teleost retinal pigment epithelium. **Invest. Ophthalmol. Visual Sci.**, Hagerstown, v. 27, p. 1634-1643, 1986.

BÜCHERL, W. **Técnica microscópica**. São Paulo: Polígono, 1962. 164 p.

BURKITT, H. G.; YOUNG, B.; HEATH, J. W.; **Wheater histologia funcional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara - Koogan, 1994. 409 p.

BURNSIDE, B.; ADLER, R.; O'CONNOR, P. Retinomotor pigment migration in the teleost retinal pigment epithelium. **Invest. Ophthalmol. Visual. Sci.**, Hagerstown, v. 24, n. 1, p. 1-15, 1983.

BURNSIDE, B.; WANG, E.; PAGH-ROEHL, K.; REY, H. Retinomotor movements in isolated teleost retinal cone inner - outer segment preparations (CIS - COS): Effects of light, dark and dopamine. **Exp. Eye Res.**, London, v. 57, p. 709-722, 1993.

CAMERON, D.A.; PUGH JR, E. N. Double cones as a basis for a new type of polarization vision in vertebrates. **Nature**, London, v. 353, p. 161-164, 1991.

CHINO, Y. M.; HASHIMOTO, Y. Dopaminergic amacrine cells in the retina of japanese dace. **Brain Res. Rev.**, Amsterdam, v. 372, p. 323-337, 1986.

CLARK, G. (ed) **Staining procedures**. 4. ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1981. 512p.

CLARKE, G. I. On the depth at which fish can see. **Ecology**, Tempe, v. 17, n. 3, p. 452-456; 1936.

COHEN, A. I. Vertebrate retinal cells and their organization. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.**, Cambridge, v. 38, p. 427-459, 1963.

- COHEN, A. I. Further studies on the question of the patency of saccules in outer segments of vertebrate photoreceptors. **Vision Res.**, Oxford, v. 10, p. 445-453, 1970.
- COLLIN, S. P. The visual system of the florida garfish, *Lepisosteus platyrhincus* (Ginglymodi). **Brain. Behav. Evol.**, Basel, v. 42, p. 295-320, 1993.
- CORMACK, D. H. **Ham histologia**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara - Koogan, 1991. 570 p.
- CRESCITELLI, F. The scotopic photoreceptors and their visual pigments of fishes: functions and adaptations. **Vision Res.**, Oxford, v. 31,n.3, p. 339-348, 1991.
- CULLING, C. F. A.; ALLISON, R. T.; BARR, W. T. **Cellular pathology technique**. 4.ed. London: Butterworth, 1985. 642 p.
- DARTNALL, H. J. A.; TANSLEY, K. Physiology of vision: retinal structure and visual pigments. **Annu. Rev. Physiol.**, Palo Alto, v. 25, p. 433-458, 1963.
- DICKSON, D. H.; GRAVES, D. A. Fine structure of the lamprey photoreceptors and retinal pigment epithelium (*Petromyzon marinus* L.). **Exp. Eye Res.**, London, v. 29, p. 45-60, 1979.
- DICKSON, D.H.; HOLLENBERG, M.J. The fine structure of the pigment epithelium and photoreceptor cells of the newt, *Triturus viridescens dorsalis* (Rafinesque). **J. Morphol.**, New York, v. 135, p. 389-432, 1971.
- DOUGLAS, R. H. The function of photomechanical movements in the retina of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Exp. Biol.**, Cambridge, v. 96, p. 389-403, 1982.

- DOUGLAS, R.H.; WAGNER, H. J. Endogenous patterns of photomechanical movements in teleosts and their relation to activity rhythms. **Cell Tissue Res.**, Heidelberg, v. 226, p. 133-144, 1982.
- DOWLING, J. E. **Neurons and Networks - an introduction to neuroscience**. London: Belknap Press, 1992. 447 p.
- DOWLING, J. E.; WERBLIN, F. S. Organization of retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. I. Synaptic structure. **J. Neurophysiol.(Bethesda)**, v. 32, n. 3, p. 315-338, 1969.
- DOWNING, J. E. G.; DJAMGOZ, M. B. A.; BOWMAKER, J. K. Photoreceptors of a cyprinid fish, the roach: morphological and spectral characteristics. **J. Comp. Physiol. A Sens. Neural Behav. Physiol.**, Heidelberg, v. 159, p. 859-868, 1986.
- DUNN, R. F. Studies on the retina of the *Gecko coleonyx variegatus*. II - The rectilinear visual cell mosaic. **J. Ultrastruct. Res.**, Orlando, v. 16, p. 672-684, 1966 a.
- DUNN, R. F. Studies on the retina of the *Gecko coleonyx variegatus*. III - Photoreceptor cross - sectional area relationships. **J. Ultrastruct. Res.**, Orlando, v. 16, p. 685-692, 1966 b.
- EASTER JR., S.S.; MACY, A. Local control of retinomotor activity in the fish retina. **Vision Res.**, Oxford, v. 18, p. 937-942, 1978.
- EASTMAN, J. T. Ocular morphology in antarctic notothenioid fishes. **J. Morphol.**, New York, v. 196, p. 283-306, 1988.

- EASTMAN, J. T. **Antarctic fish biology-evolution in a unique environment**. San Diego: Academic Press, 1993. 322 p.
- ECKELBARGER, K. J.; SCALAN, R.; NICOL, J. A. C. The outer retina and tapetum lucidum of the snook *Centropomus undecimalis* (Teleostei). **Can. J. Zool.**, Ottawa, v. 58, p. 1042-1051, 1980.
- EIGENMANN, C. H.; SHAFER, G. D. The mosaic of single and twin cones in the retina of fishes. **Am. Nat.**, Chicago, v. 34, n. 398, p. 109-118, 1900.
- ENGSTRÖM, K. Cones types and cone arrangement in the retina of some cyprinids. **Acta. Zool. (Stockl.)**, v. 41, p. 277-295, 1960.
- ENGSTRÖM, K. Cone types and cone arrangements in teleost retinae. **Acta. Zool. (Stockl.)**, v. 44, p. 179-243, 1963 a.
- ENGSTRÖM, K. Structure, organization and ultrastructure of the visual cells in the teleost family *Labridae*. **Acta. Zool. (Stockl.)**, v. 44, p. 1-41, 1963 b.
- ES-SOUNNI, A.; KLYNE, M. A.; DUTIL, J. D.; ALI, M. A. Retinal cone movements in the yellow eel. **Zool. Anz.**, Jena, v. 219, n. 5/6, p. 377-381, 1987.
- EXNER, S.; JANUSCHKE, H. Die stäbchenwanderung im auge vom *Abramis brama* bei Lichtveränderungen. **Ber. d. K. K. Akad. Wiss. Wien (Math. Natur)**, v. 115, p. 269-280, 1906.
- FANTA, E. Influence of background color on the behavior of the fish *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). **Arq. Biol. Tecnol.**, Curitiba, v. 38, n. 4, 1995.

FANTA, E.; GRÖTZNER, S. R.; LUVIZOTTO, M. F.; ISHIDA, M. L.; WACHOWICZ, L. M. P. The environmental impact and the behavior of antarctic fish: I-Light. IN: SCAR INTERNATIONAL CONFERENCE ON "ANTARCTIC SCIENCE -GLOBAL CONCERNS " (1991, Bremen). **Proceedings**... Bremen, 1991.

FANTA, E.; MEYER, A. A.; GRÖTZNER, S. R.; LUVIZOTTO, M. F. Comparative study on feeding strategy and activity patterns of two antarctic fish: *Trematomus newnesi* Boulenger, 1902 and *Gobionotothen gibberifrons* (Lönnberg, 1905) (Pisces, Nototheniidae) under different light conditions. **Antarct. Rec.**, Tokyo, v. 38, n.1, p.13-29, 1994.

FENDER, D. H. Control mechanisms of the eye. **Sci. Am.**, New York, v. 211, n.1, p. 24-33, 1964.

FERNALD, R. D. Chromatic organization of a cichlid fish retina. **Vision Res.**, Oxford, v. 21, p. 1749-1753, 1981.

FERRERO, E.; ANCTIL, M.; ALI, M. A. Ultrastructural correlates of retinomotor responses in inner segments of vertebrate photoreceptors. **Rev. Can. Biol.**, Montreal, v. 38, n. 4, p. 249-264, 1979.

GÉRY, J. **The characids of the world**. New Jersey: T.F.H. Neptune City, 1977. 672 p.

GÉRY, J.; FRANCE, C.N.R.S. The Serrasalminidae (pisces, characoidei) from the Serra do Roncador, Mato Grosso, Brasil. **Amazoniana**, Kiel, v. 6, n. 4, p. 467-495, 1979.

GIESSMANN, G. H. **Interação, crescimento e comportamento de *Tilapia rendalli* (Cichlidae) e *Metynnis roosevelti* (Characidae) (Pisces)**. Curitiba, 1994. 164 p.

Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

GLAUERT, A. M. (ed) **Practical methods in electron microscopy**. 4. ed. New York: Elsevier Biomedical Press, 1986. v. 5, part I, 311 p.

GLICKSTEIN, M. The vertebrate eye. IN: MASTERTON, R.B.; BITTERMAN, M.E.; CAMPBELL, C.B.G.; HOTTON, N. **Evolution of brain and behavior in vertebrates**. New York: John Willy & Sons, 1976. p. 53-71.

GRÖTZNER, S. R. **Estudo morfo - funcional comparativo da retina dos peixes antárticos *Notothenia (Gobionotothen) gibberifrons* Lönnberg, 1905 e *Trematomus newnesi* Boulenger, 1902**. Curitiba, 1994. 74p. Tese (Mestrado em Morfologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade federal do Paraná.

GUMA'A, S. A. Retinal development and retinomotor responses in perch, *Perca fluviatilis* L. **J. Fish. Biol.**, London, v. 20, p. 611-618, 1982.

HAIRSTON JR., N. G.; LI, K. T.; EASTER JR., S. S. Fish vision and the detection of planktonic prey. **Science (Washington D C)**, v. 218, p. 1240-1242, 1982.

HARA, M.; YOSHIDA, M.; TONOSAKI, A. Fine structural and volumetric changes of lamprey photoreceptor cells during light and dark periods. **Cell Tissue Res.**, Heidelberg, v. 259, p. 33-41, 1990.

HAWRYSHYN, C. W. Polarization Vision in Fish. **Sci. Am.**, New York, v. 80, p. 164-175, 1992.

HAWRYSHYN, C. W.; MCFARLAND, W. N. Cone photoreceptor mechanisms and the detection of polarized light in fish. **J. Comp. Physiol. A Sens. Neural Behav. Physiol.**, Heidelberg, v. 160, p. 459-465, 1987.

HERMAN, K. G.; STEINBERG, R. H. Melanosome metabolism in the retinal pigmented epithelium of the opossum. **Cell Tissue Res.**, Heidelberg, v. 227, p. 485-507, 1982.

HERZOG, H. Experimentelle untersuchungen zur physiologie der bewegungsvorgänge in der netzhaut. **Arch. Anat. Physiol. (Physiol. Abt)**, v. 5/6, p. 413-464, 1905.

HIDAKA, S.; CHRISTENSEN, B. N.; NAKA, K. I. The synaptic ultrastructure in the outer plexiform layer of the catfish retina: a three - dimensional study with HVEM and conventional EM of golgi - impregnated bipolar and horizontal cells. **J. Comp. Neurol.**, New York, v. 247, p. 181-199, 1986.

HITCHCOCK, P. F.; EASTER JR., S.S. Retinal ganglion cells in goldfish: a qualitative classification into four morphological types, and a quantitative study of the development of one of them. **J. Neurosci.**, New York, v. 6, n. 4, p. 1037-1050, 1986.

HORRIDGE, G. A. The evolution of visual processing and the construction of seeing systems. **Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, London, v. 230, p. 279-292, 1987.

ISHIKAWA, M.; TAKAO, M.; WASHIOKA, H.; TOKUNAGA, F.; WATANABLE, H.; TONOSAKI, A. Demonstration of rod and cone photoreceptors in the lamprey retina by freeze - replication and immunofluorescence. **Cell Tissue Res.**, Heidelberg, v. 249, p. 241-246, 1987.

JAMESON, D.; HURVICH, L. M. Complexities of perceived brightness. **Science (Washington D C)**, v. 133, p. 174-179, 1961.

- JANUSCHKA, M. M.; BURKHARDT, D. A.; ERLANDSEN, S. L.; PURPLE, R.L.
The ultrastructure of cones in the walleye retina. **Vision. Res.**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 327-341, 1987.
- JOHNS, P. R. Growth of the adult goldfish eye - III. Source of the new retinal cells. **J. Comp. Neurol.**, New York, v. 176, p. 343-358, 1977.
- KANEKO, A. Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina. **J. Physiol. (Camb.)**, v. 207, n. 03, p. 623-633, 1970.
- KIRSCH, M.; WAGNER, H. J.; DOUGLAS, R. H. Rods trigger light adaptive retinomotor movements in all spectral cone types of a teleost fish. **Vision Res.**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 389-396, 1989.
- KOHBARA, J.; NIWA, H.; OGURI, M. Comparative light microscopic studies on the retina of some elasmobranch fishes. **Nihon Suisoan Gakkaishi**, Tokyo, v. 53, n. 12, p. 2117-2125, 1987.
- KONG, K.L.; FUNG, Y. M.; WASSERMAN, G. S. Filter - mediated color vision with one visual pigment. **Science (Washington D C)**, v. 207, p. 783-786, 1980.
- KRAFT, T. W.; BURKHARDT, D. A. Telodentrites of cone photoreceptors: structure and probable function. **J. Comp. Neurol.**, New York, v. 249, p. 13-27, 1986.
- KUNZ, Y. W. Cone mosaics in a teleost retina: changes during light and dark adaptation. **Experientia (Basel)**, v. 36, n. 12, p. 1371-1374, 1980.
- LA VAIL, M. M. Rod outer segment disc shedding in relation to cyclic lighting. **Exp. Eye Res.**, London, v. 23, p. 277-280, 1976.

LEVINE, J. S.; MACNICHOL JR., E.F. Color vision in fishes. **Sci. Am.**, New York, v. 216, n. 2, p. 108-117, 1982.

LEVINSON, G.; BURNSIDE, B. Circadian rhythms in teleost retinomotor movements. **Invest. Ophthalmol. Visual Sci.**, Hagerstown, v. 20, n. 3, p. 294-303, 1981.

LIEPE, B.A.; BURNSIDE, B. Light - activation of teleost rod photoreceptor elongation. **Exp. Eye Res.**, London, v. 57, p. 117-125, 1993.

LIVINGSTONE, M. Segregation of form, color, movement, and depth processing in the visual system: anatomy, physiology, art and illusion. In: COHEN, B.; BODIS - WOLLNER, I. (eds). **Vision and the brain**. New York: Raven Press, 1990. p. 119-139.

LOUKASHKIN, A.S.; GRANT, N. Behavior and reactions of the pacific sardine, *Sardinops caerulea* (Girard), under the influence of white and colored lights and darkness. **Proc. Calif. Acad. Sci.**, San Francisco, v. 29, n. 15, p. 509-548, 1959.

LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, New York, v. 9, p. 409-414, 1961.

LYALL, A. H. Cone arrangements in teleost retinae. **Q. J. Microsc. Sci.**, Cambridge, v. 98, part 2, p. 189-201, 1957.

MACHADO - ALLISSON, A. Estudios sobre la sistematica de la subfamilia serrasalminae (teleostei, characidae). Parte II. Discusion sobre la condicion monofiletica de la subfamilia. **Acta. Biol. Venez.**, Caracas, v. 11, n. 4, p. 145-195, 1983.

- MACK, A. F.; FERNALD, R. D. Regulation of cell division and rod differentiation in the teleost retina. **Dev. Brain Res.**, Amsterdam, v. 76, p. 183-187, 1993.
- MAKSIMOV, V.V.; PODUGOL' NIKOVA, T. A. Two types of twin cones in the retina of the " Bigeye kil'ka " *Clupeonella grimmi*. **J. Ichthyol.**, Bethesda, v. 18, n. 2, p.336-340, 1978.
- MANGEL, S. C.; DOWLING, J. E. The interplexiform - horizontal cell system of the fish retina: effects of dopamine, light stimulation and time in the dark. **Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, London, v. 231, p. 91-121, 1987.
- MARC, R. E.; SPERLING, H. G. Color receptor identities of golfish cones . **Science (Washington D C)**, v. 191, p. 487-489, 1976.
- MARCHIAFAVA, P. L. Cell coupling in double cones of the fish retina. **Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, London, v. 226, p. 211-215, 1985.
- MAWAS, J. L' Épithélium pigmentaire de la rétine. **Ann. Ocul.**, Paris, v. 186, p. 488-506, 1953.
- MCMAHON, D. G.; BARLOW JR., R. B. Visual responses in teleosts. **J. Gen. Physiol.**, New York, v. 100, n. 1, p. 155-168, 1992.
- MECKE, E. Absence of changes in colour discrimination ability of goldfish when reared in monochromatic light. **Ann. Zool. Fenn.**, Helsinki, v. 20, p. 239-244, 1983.
- MEER, H. J. van der Constructional morphology of photoreceptor patterns in percomorph fish. **Acta Biotheor.**, Dordrecht, v. 40, p. 51-85, 1992.

MENEZES, N. A.; WAGNER, H. J.; ALF, M. A. Retinal adaptations in fishes from a floodplain environment in the central amazon basin. **Rev. Can. Biol.**, Montreal, v. 40, n. 1, p. 111-132, 1981.

MIGUEL, E.; WAGNER, H. J.; ANADÓN, R. Ultrastructural study of the retinal pigment epithelium during metamorphosis in the sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.). **Cell Tissue Res.**, Heidelberg, v. 267, p. 375-384, 1992.

MUNK, O. On the cones of the mesopelagic teleost *Trachipterus trachipterus* (Gmelin, 1789). **Vidensk. Medd Dan. Naturhist Foren.**, Copenhagen, v. 143, p. 101-111, 1981.

MUNK, O. Cones in the eye of the deep - sea teleost *Dirtemus argenteus*. **Vision Res.**, Oxford, v. 22, p. 179-181, 1982.

MUNK, O. Duplex retina in the mesopelagic deep - sea teleost *Lestidiops affinis* (Ege, 1930). **Acta. Zool. (Stockh.)**, v. 70, n. 3, p. 143-149, 1989.

NAG, T. C.; SUR, R. K. Cones in the retina of the catfish, *Clarias batrachus* (L). **J.Fish. Biol.**, London, v. 40, p. 967-969, 1992.

NAGLE, B. W.; OKAMOTO, C.; TAGGART, B.; BURNSIDE, B. The teleost cone cytoskeleton. **Invest. Ophthalmol. Visual Sci.**, Hagerstown, v. 27, p. 689-701, 1986.

NAKA, K. I. Functional organization of catfish retina. **J. Neurophysiol. (Bethesda)**, v. 40, n. 1, p. 26-43, 1977.

NEUMEYER, C. Wavelength discrimination in the goldfish. **J. Comp. Physiol. A Sens. Neural Behav. Physiol.**, Heidelberg, v. 158, p. 203-213, 1986.

NGUYEN - LEGROS, J. Fine structure of the pigment epithelium in the vertebrate retina.

Int. Rev. Cytol., San Diego, v. 7, (Supl.) p. 287-328, 1978.

NICOL, J. A. C. Some aspects of photoreception and vision in fishes. **Adv. Mar. Biol.**,

San Diego, v. 1, p. 171-208, 1963.

NICOL, J. A. C. **The eyes of fishes**. Oxford: Clarendon Press, 1989. 308 p.

NIXON, S. W. Physical energy inputs and the comparative ecology of lake and marine ecosystems. **Limnol. Oceanogr.**, Grafton, v. 33, n. 4 part 2, p. 1005-1025, 1988.

NORDQUIST, D.; MCLOON, S. C. Morphological patterns in the developing vertebrate retina. **Anat. Embryol.**, Heidelberg, v. 184, p. 433- 440, 1991.

O'DAY, W. T.; YOUNG, R. W. Rhythmic daily shedding of outer - segment membranes by visual cells in the goldfish. **J. Cell Biol.**, New York, v. 76, p. 593-604, 1978.

ODUM, E. P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 434 p.

OMURA, Y.; OGURI, M. Photoreceptor development in the pineal organ and the eye of *Plecoglossus altivelis* and *Paralichthys olivaceus* (Teleostei). **Cell Tissue Res.**, Heidelberg, v. 266, p. 315-323, 1991.

PADGHAM, C.A.; SAUNDERS, J.E. **The perception of light and colour**. Londres: Bill & Sons, 1975. 192 p.

PANKHURST, N. W. Ocular morphology of the sweep *Scorpiis lineolatus* and the spotty *Notolabrus celidotus* (Pisces: Teleostei) grown in low intensity light. **Brain Behav. Evol.**, Basel, v. 39, p. 116-123, 1992.

PANKHURST, N. W.; MONTGOMERY, J. C. Visual function in four antarctic nototheniid fishes. **J. Exp. Biol.**, Cambridge, v. 142, p. 311-324, 1989.

PAULUS, W. M.; HÖMBERG, V.; CUNNINGHAM, K.; HALLIDAY, A. M. Colour and brightness coding in the central nervous system: theoretical aspects and visual evoked - potentials to homogeneous red and green stimuli. **Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, London, v. 227, p. 53-66, 1986.

PHAN, M. T. Histologia da retina de peixes antárticos do estreito de Bransfield. **An. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v. 58, (Supl.) p. 35-42, 1986.

PEARSE, A. S. **Animal Ecology**. 2.ed. Mc. Graw-Hill, 1939.

POGGIO, T.; KOCH, C. Synapses that compute motion. **Sci. Am.**, New Yorke, v. 256, n. 2, p. 42-48, 1987

RAYNAULD, J. P. Goldfish retina: sign of the rod input in opponent color ganglion cells. **Science (Washington D C)**, v. 177, p. 84-85, 1972.

RAYNAULD, J. P.; LAVIOLETTE, J. R.; WAGNER, H. J. Goldfish retina: a correlate between cone activity and morphology of the horizontal cell in cone pedicles. **Science (Washington D C)**, v. 204, p. 1436-1438, 1979.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron - opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, New York, v. 17, p. 208-212, 1963.

ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. **Histologia - Texto e Atlas**. 2. ed. São Paulo: Panamericana, 1993. 779 p.

- ROSSETO, E. S.; DOLDER, H.; SAZIMA, I. Double cone mosaic pattern in the retina of larval adult piranha, *Serrasalmus spilopleura*. **Experientia (Basel)**, v. 48, p. 597-599, 1992.
- SAMEJIMA, M.; TAMOTSU, S.; MURANAKA, Y.; MORITA, Y. Dissociation of photoreceptor cells from the pineal organ of the lamprey, *Lampetra japonica*. **Cell Tissue Res.**, Heidelberg, v. 263, p. 589-592, 1991.
- SCHNAPF, J. L.; BAYLOR, D. A. How photoreceptor cells respond to light. **Sci.Am.**, New York, v. 256, n. 4, p. 32-37, 1987.
- SCHULTZE, M. Zur anatomie und physiologie der retina. **Arch. Mikrosk. Anat. Entw. Mech.**, v. 2, p. 175-286, 1866.
- SEVERI, W. **Aspectos morfométricos e estruturais das brânquias de pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, serrasalmidae)**. São Paulo, 1991. 151 p. Tese (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos.
- SHAND, J. Changes in retinal structure during development and settlement of the goatfish *Upeneus tragula*. **Brain Behav. Evol.**, Basel, v. 43, p. 51-60, 1994.
- SHAND, J.; PARTRIDGE, J. C.; ARCHER, S. N.; POTTS, G. W.; LYTHGOE, J.N. Spectral absorbance changes in the violet / blue sensitive cones of the juvenile pollack, *Pollachius pollachius*. **J. Comp. Physiol. A Sens. Neural Behav. Physiol.**, Heidelberg, v. 163, p. 699-703, 1988.

- SHERRY, D. M.; YAZULLA, S. Goldfish bipolar cells and axon terminal patterns: a Golgi study. **J. Comp. Neurol.**, New York, v. 329, p. 188-200, 1993.
- SILLMAN, A. J.; RONAN, S. J.; LOEW, E. R. Scanning electron microscopy and microspectrophotometry of the photoreceptors of the ictalurid catfishes. **J. Comp. Physiol. A Sens. Neural Behav. Physiol.**, Heidelberg, v. 173, p. 801-807, 1993.
- SILLMAN, A. J.; SPANFELNER, M. D.; LOEW, E. R. The photoreceptors and visual pigments in the retina of the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. **Can. J. Zool.**, Ottawa, v. 68, p. 1544-1551, 1990.
- SPENCER, W. H. Renaissance of the retinal pigment epithelium. **Arch. Ophthalmol.**, Milan, v. 88, p. 1, 1972.
- SPRINGER, A.D.; MEDNICK, A.S. Relationship of ocular pigmentation to the boundaries of dorsal and ventral retina in a nonmammalian vertebrate. **J. Comp. Neurol.**, New York, v. 245, p. 74-82, 1986.
- STEEDMAN, H. F. **Section cutting in microscopy**. Springfield: Charles C. Thomas, 1960.
- STELL, W. K. The structure and relationships of horizontal cells and photoreceptor bipolar synaptic complexes in goldfish retina. **Am. J. Anat.**, New York, v. 121, p. 401-424, 1967.
- STERBA, G. **Süßwasserfische aus aller welt**. Berchtesgarden: Zimmer & Hergoz, 1959.
- TEYKE, T.; SCHAERER, S. Blind mexican cave fish (*Astyanax hubbsi*) respond to moving visual stimuli. **J. Exp. Biol.**, Cambridge, v. 188, p. 89-101, 1994.

THORNTON, J. E.; PUGH JR., E. N. Red / green color opponency at detection threshold. **Science (Washington D C)**, v. 219, p. 191-193, 1983.

VILLEGAS, G. M. Electron microscopic study of the vertebrate retina. **J. Gen. Physiol.**, New York, v. 43, p.15-43, 1960.

VILTER, V. Déterminisme intrinsèque de migrations pigmentaires dans la rétine. **C. r. Soc. Biol.**, Paris, v. 140, p. 277-278, 1946.

WAGNER, H. J.; MENEZES, N.A.; ALI, M.A. Retinal adaptations in some brazilian tide pool fishes (Teleostei). **Zoomorphologie**, Berlin, v. 83, p. 209-226, 1976.

WAHL, C. M. Periodic cone cell twists in the walleye, *Stizostedion vitreum*, a new type of retinomotor activity. **Vision Res.**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 11-18, 1994.

WALLS, G. L. **The vertebrate eye**. New York: Hafner, 1942.

WARREN, R. H.; BURNSIDE, B. Microtubules in cone myoid elongation in the teleost retina. **J. Cell Biol.**, New York, v. 78, p. 247-259, 1978.

WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, New York, v. 4, n. 4, p. 475-478, 1958.

WEISS, L.; GREEP, R. O. **Histologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara - Koogan, 1981. 1.016 p.

WERBLIN, F.S; DOWLING, J. E. Organization of the retina of the mudpuppy *Necturus maculosus*. II . Intracellular recording. **J. Neurophysiol. (Bethesda)**, v. 32, n. 3, p. 339-355, 1969.

WHEELER, T. G. Retinal red sensitivity under dark-adapted conditions. **Brain Res. Rev.**, Amsterdam, v. 175, p. 140-144, 1979.

WHEELER, T. G. Color vision and retinal chromatic information processing in teleost: a review. **Brain Res. Rev.**, Amsterdam, v. 4, p. 177-235, 1982.

WILLIAMSON, M.; KEAST, A. Retinal structure relative to feeding in the rock bass (*Ambloplites rupestris*) and bluegill (*Lepomis macrochirus*). **Can. J. Zool.**, Ottawa, v. 66, p. 2840-2846, 1988.

WITKOVSKY, P.; NELSON, J.; RIPPS, H. Action spectra and adaptation properties of carp photoreceptors. **J. Gen. Physiol.**, New York, v. 61, p. 401-423, 1973.

WITKOVSKY, P.; SHAKIB, M.; RIPPS, H. Interreceptorial junctions in the teleost retina. **Invest. Ophthalmol.**, St. Louis, v. 13, n. 12, p. 996-1009, 1974.

WITKOVSKY, P.; STELL, W. K. Retinal structure in the smooth dogfish *Mustelus canis*: electron microscopy of serially sectioned bipolar cell synaptic terminals. **J. Comp. Neurol.**, New York, v. 150, p. 147-168, 1973.

WOEHL, O.M. **Efeitos da luz vermelha sobre o comportamento e a estrutura da retina de *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1729) (Pisces, Cichlidae)**. Curitiba, 1990, 91 p. Tese (Mestrado em Ciências veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

WOLKEN, J. J. Structure and molecular organization of retinal photoreceptors. **J. Opt. Soc. Am.**, New York, v. 53, n. 1, p. 1-19, 1963.

YACOB, A.; WISE, C.; KUNZ, Y. W. The accessory outer segment of rods and cones in the retina of the guppy, *Poecilia reticulata* P. (Teleostei). **Cell Tissue Res.**, Heidelberg, v. 177, p. 181-193, 1977.

YORKE, M. A.; DICKSON, D. H. Diurnal variations in myeloid bodies of the newt retinal pigment epithelium. **Cell Tissue Res.**, Heidelberg, v. 235, p. 177-186, 1984.

YOSHIDA, M.; TONOSAKI, A. Anti - lamprey (*Lamprata japonica*) retinal antibodies which distinguish between short and long photoreceptor cells. **Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.**, Oxford, v. 107 B, n. 2, p. 183-188, 1994.

YOUNG, R. W. An hypothesis to account for a basic distinction between rods and cones. **Vision Res.**, Oxford, v. 11, p. 1-5, 1971.

YOUNG, R. W.; BOK, D. Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. **J. Cell Biol.**, New York, v. 42, p. 392-403, 1969.

ZAUNREITER, M.; JUNGER, H.; KOTRSCHAL, K. Retinal structure; physiology and pharmacology. **Vision Res.**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 383-394, 1991.

ZYZNAR, E. S.; ALI, M. A. An interpretative study of the organization of the visual cells and tapetum lucidum of *Stizostedion*. **Can. J. Zool.**, Ottawa, v. 53, p. 180-196, 1975.