



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA: FISILOGIA

FRANCISCO GILBERTO OLIVEIRA

**PARÂMETROS MORFO-FUNCIONAIS DO OLHO E DA
ORGANIZAÇÃO RETINIANA NO PEIXE DE QUATRO-
OLHOS *Anableps anableps* (Linnaeus, 1758).**



Recife-PE

2004



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA: FISILOGIA

Francisco Gilberto Oliveira

**PARÂMETROS MORFO-FUNCIONAIS DO OLHO E DA
ORGANIZAÇÃO RETINIANA NO PEIXE DE QUATRO-OLHOS**

Anableps anableps (Linnaeus, 1758)

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Fisiologia.

ORIENTADOR:

Prof.^a. Dr.^a. *Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa*

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

CO-ORIENTADOR:

Prof. Dr. *Diógenes Luís da Mota*

Departamento de Histologia e Embriologia

Recife-PE

2004

Oliveira, Francisco Gilberto

Parâmetros morfo-funcionais do olho e da organização retiniana no peixe de quatro-olhos *Anableps anableps* (Linnaeus, 1758) / Francisco Gilberto Oliveira. – Recife : O Autor, 2004.

90 folhas : il. fig., tab., gráf.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2004.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Neurofisiologia comparada – Estudo experimental. 2. Peixe de quatro-olhos (*Anableps anableps*) – Retina – Parâmetros morfo-funcionais. 3. Células ganglionares – Peixe de quatro-olhos – Distribuição. 4. Visão anfíbia – Peixe de quatro-olhos – Características ópticas e neurais. I. Título.

**612.843.1:591 CDU (2.ed.)
571.166 CDD (21.ed.)**

**UFPE
BC2004-400**

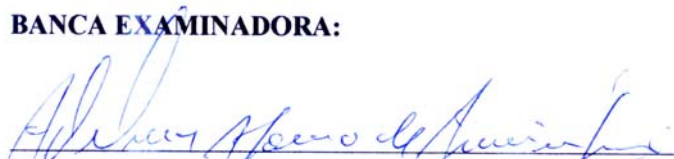
FRANCISCO GILBERTO OLIVEIRA

**PARÂMETROS MORFO-FUNCIONAIS DO OLHO E DA ORGANIZAÇÃO
RETINIANA NO PEIXE DE QUATRO-OLHOS**

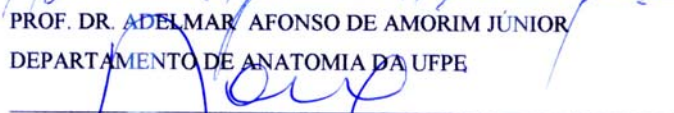
Anableps anableps (Linnaeus, 1758)

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Fisiologia.

BANCA EXAMINADORA:



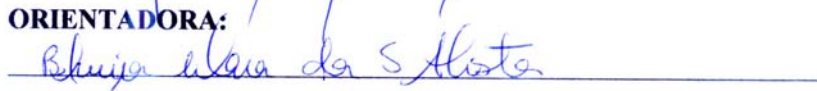
PROF. DR. ADEMAR AFONSO DE AMORIM JÚNIOR
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA DA UFPE



PROFa. Dra. ROSÂNGELA PAULA TEIXEIRA LESSA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA DA UFRPE

PROF. DR. RUBEM CARLOS ARAÚJO GUEDES
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO DA UFPE

ORIENTADORA:



PROFª. DRª. BELMIRA LARA DA SILVEIRA ANDRADE DA COSTA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA DA UFPE/PE

Recife, 2004

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Raimundo e Lourdes**, minha esposa **Telma**, meus
filhos **Débora, Diego, Raquel e Filipe**, e ao meu neto **Gabriel**.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial à Professora Belmira Lara pela orientação do presente trabalho, seu exemplo de respeito ao próximo e humildade que tornam sua conduta ímpar, além de um conhecimento excepcional, transmitido de forma bastante simples e com muita objetividade. Muito mais que uma orientadora foi sempre uma grande amiga. Sinto-me verdadeiramente privilegiado em ter sido seu aluno.

Aos Professores Alexandre Motta Bittencourt e Diógenes Luiz da Mota, que além de colaborar com os seus conhecimentos nos colocaram à disposição toda a infraestrutura do mestrado de morfologia, onde se realizou todo o procedimento de digitalização de imagens.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia pelos ensinamentos, sugestões, críticas e pelo respeito e amizade durante esse período de convivência.

Ao professor Ademar Afonso de Amorim Júnior pelas diversas sessões de fotografia, em vários momentos do nosso experimento;

Ao Alex Benício da Silveira, do Mestrado de Morfologia, pela colaboração na preparação dos cortes histológicos;

Ao Professor Antonio Carlos, do departamento de Zoologia, pelas sugestões

À Professora Elizabeth Yamada pela hospitalidade com que me recebeu em seu laboratório em Belém, oferecendo toda a estrutura necessária e suprimento de diversos materiais necessários ao experimento;

A João Paulo Coimbra, colaborador fantástico que nos forneceu material, sugestões, protocolos e apoio.

Aos colaboradores do Museu Emílio Goeldi, Luciano Fogaça de Assis Montag e Francilena S. Nascimento, pelo apoio e interação na realização deste trabalho;

Ao Professor Fabrício Bezerra de Sá, da UFRPE, por sua ajuda na obtenção de algumas fotos do olho do Anableps em seu laboratório;

Aos amigos Jadir e Anaíde pela hospedagem em Belém durante o período em que realizamos a coleta dos peixes para o experimento;

Ao Prof. Paulo Thiers da UFC que colaborou com alguns softwares e as explicações necessárias para o seu adequado funcionamento;

Ao Sr. Antônio Salomão de Oliveira, sua filha Valéria de Oliveira, sua esposa Aurélia de Albuquerque Oliveira e sua funcionária Helenilce Paixão Borcém que nos deram todo apoio na cidade de Maracanã (PA);

Ao pescador Magno Benedito Pinheiro e seus filhos Max e Marcelo da Paixão Pinheiro pela bela viagem no Rio Maracanã (Pa), onde realizamos a coleta de vários peixes;

Aos colegas de mestrado Cristina, Esmeraldo e Renato, com quem dividimos o espaço no laboratório de Neurofisiologia, e aos que comigo ingressaram: Adriano, Emileide, Fernandinha, Georgeanne, João, Livia, Mônica e Rodrigo pela amizade e estímulo.

Finalmente, gostaria de agradecer a todos que direta ou indiretamente colaboraram para que se tornasse possível a realização do presente trabalho.

RESUMO

O sistema visual representa um importante elo entre um animal e o mundo em sua volta, com profunda influência nos seus hábitos e estilo de vida, nos mais variados habitats. Em peixes do gênero *Anableps* cada olho contém duas córneas, duas aberturas pupilares, uma lente piriforme e uma retina com regiões dorsal e ventral distintas, que proporcionam uma visão simultânea dos meios aéreo e aquático. No presente trabalho foram investigados alguns dos parâmetros morfo-funcionais de componentes ópticos e neurais envolvidos no ganho em resolução e sensibilidade do olho do *Anableps anableps* em 22 animais com comprimento padrão (SL) entre 14 e 20,5 cm. Adotando a técnica de montagens planas, foi realizada uma análise comparativa e quantitativa das regiões dorsal e ventral da retina com ênfase em que tipos de especializações são definidas pela distribuição topográfica de neurônios na camada de células ganglionares e que tipos de populações neuronais, de acordo com o espectro de tamanho, estão presentes nestas hemi-retinas. Medidas das dimensões oculares e da lente foram realizadas em 08 espécimens e montagens planas retinianas foram feitas a partir de olhos de 14 animais, com (SL) variando de 14,5 a 20,5 cm. Os resultados indicaram uma assimetria nas dimensões da lente de magnitude similar ao descrito para animais com SL entre 8,5 e 9,5 cm. e um crescimento assimétrico do olho. Um tapetum coroidal foi evidenciado sobre toda a extensão do olho de animais adaptados ao claro. Uma proeminente faixa visual com densidade pico de 18.286 ± 3.162 células/mm² foi detectada na região central da hemi-retina ventral e uma pequena área de densidade máxima (5.500 ± 602 células/mm²) foi observada em quatro de seis retinas analisadas na periferia temporal da hemi-retina dorsal. A análise comparativa evidenciou também um maior gradiente centro-periférico de densidade celular e um número total de células, cerca de 3 X maior na retina ventral, comparada à dorsal. A distribuição das classes de tamanho dos corpos celulares também sugere que distintas populações celulares estão presentes em cada hemi-retina. Os dados indicam diferentes níveis de resolução e amostragem entre os campos visuais aéreo e aquático e enfatizam a presença de especializações oculares e retinianas capazes de otimizar as estratégias alimentares e comportamentais adotadas por esta espécie em ambientes de alto ou baixo níveis de luminosidade.

ABSTRACT

The visual system represents an essential link between an animal and its surroundings with profound influence on its habits and life style in diverse types of habitats. In fishes of genus *Anableps* each eye contains two corneas, two pupillary apertures, an egg-shaped lens and one retina with distinct dorsal and ventral portions, which allow a simultaneous aerial and aquatic sight. In the present work, were investigated some of the anatomical and functional parameters of optical and neural components involved in the gain in resolution and sensitivity of the *Anableps anableps* eye in adult animals. Adopting the retinal whole mount preparations, a comparative and quantitative analysis of the dorsal and ventral hemi-retinas were accomplished with emphasis in which types of specializations are defined for the topographical distribution of neurons in the ganglion cell layer and which classes of cell populations according to soma size are present in these hemi-retinas. Measurements of the ocular and eye dimensions were performed in 08 specimens and retinal wholemounts were made from eyes of 13 animals, with corporal length ranging from 15 to 20.5 cm. The results indicated an asymmetry in the lens dimensions similar in magnitude order to that described for young animals and an asymmetric growth of the eye. A choroidal tapetum was visualized overall the extension of the eye in light-adapted animals. A prominent horizontal visual streak with peak of cell density corresponding to $18,286 \pm 3,162$ cells/mm² was detected in central region of the ventral hemi-retina. A small area with maximum density of $5,500 \pm 602$ cells/mm² was observed in some specimens in the temporal periphery of the dorsal hemi-retina. The relative frequency of ganglion cell soma size suggests also that distinct cell populations are present in each retina. The data indicate distinct retinal sampling and resolution to aerial and aquatic visual fields and support the presence of optic and retinal specializations to optimize the feeding and behavioural strategies adopted by *Anableps* at low or high levels of luminosity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Ilustração de uma faixa visual ou “visual streak” e do nicho ecológico onde o peixe marinho *Balistoides conspicillum* habita. **Pág. 21**

FIGURA 2 – Ilustração de uma “área centralis” e do nicho ecológico onde o peixe marinho *Cephalopholis miniatus* habita **Pág. 22**

FIGURA 3 – Ilustração de um cardume de peixes do gênero *Anableps* vistos de lado quando submersos na água **Pág. 27**

FIGURA 4 – Ilustração de peixes do gênero *Anableps* vistos de frente, nadando com os olhos parcialmente fora d’água. **Pág. 28**

FIGURA 5 – Imagem do olho do *Anableps* destituído da córnea, mostrando as extensões laterais da íris que definem as duas aberturas pupilares em um animal adaptado ao claro **Pág. 28**

FIGURA 6 – Esquema do olho do *Anableps* em secção transversal, mostrando o desenho anatômico das pupilas, retinas e lente **Pág. 29**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação de algumas das espécies de peixes analisadas quanto aos tipos e localização de especializações retinianas e a sua relação com o nicho ecológico que habitam. Copiada de Collin (1999) com adição de dados de espécies de peixes cartilaginosos e ósseos obtidos de Collin e Pettigrew, (1988 a,b) e Wagner *et al.* (1998).

Pág. 23

Tabela 2 - Relação de peixes elasmobrânquios analisados quanto aos tipos de especializações retinianas. Dados retirados de Bozanno e Collin (2000).

Pág. 26

LISTA DE ABREVIATURAS

HE	Hematoxilina eosina
HRP	Traçador horseradish peroxidase
LHRH	Hormônio liberador de hormônio luteinizante
MS222	Tricaine methane sulphonate
OPM	Resposta optomotora
SAC	Estrato album central
SFGS	Estrato fibroso griseum superficial
SGC	Estrato griseum central
SO	Estrato Óptico
SPV	Estrato periventricular

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	IX
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
SUMÁRIO	12
 I. INTRODUÇÃO	
I.1- Aspectos Eco-fisiológicos do Sistema Visual	13
I.2 - Importância da visão para os peixes de diferentes habitats e hábitos de vida.	18
I.2.1 Aspectos relativos à distribuição de células ganglionares da retina	18
I.3 Características do peixe <i>Anableps</i>	27
I.4 Justificativa	35
 II OBJETIVOS	
II.1 - Objetivo geral	36
II.2 - Objetivos específicos	36
 III REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
 IV MANUSCRITO SUBMETIDO	48
 IV CONCLUSÕES	85
 V ANEXOS: A- Materiais e Métodos	86
B- Parecer do Comitê de Ética	91

I. INTRODUÇÃO

I.1 Aspectos Eco-fisiológicos do Sistema Visual

O sistema visual como um todo, independente do seu estágio de complexidade na escala filogenética, apresenta-se como um dos componentes do SNC na sua função de informar e de formular comportamentos que visam uma integração do indivíduo com o meio. Trata-se de um sistema sensorial de grande importância adaptativa para os diferentes hábitos de vida nos mais diversos habitats ocupados pelos animais (WALLS, 1942; DUKE-ELDER, 1958; HUGHES, 1977; ALI, 1981; COLLIN, 1999).

Inserido neste contexto, o olho funciona como canal de entrada, sendo um órgão bastante complexo e do ponto de vista funcional, composto por dois sistemas distintos e de ação complementar:

- 1) O primeiro, formado por um sistema óptico capaz de dirigir a penetração dos raios luminosos, possibilitando a formação de imagens do ambiente;
- 2) O segundo, constituído por um sistema sensorial, capaz de extrair informações da imagem formada.

Fazem parte do sistema óptico, os elementos refrativos (córnea e cristalino), as estruturas para acomodação, a pupila e a hemisfera posterior do olho.

O sistema sensorial é representado pela retina, que organizada radialmente em diferentes camadas morfo-funcionais, é responsável pela recepção, análise inicial e transmissão da informação para o encéfalo. A retina dos vertebrados é uma extensão do encéfalo, um tecido neural sobre o qual é mapeada uma imagem do ambiente visual de cada espécie particular. Cada ponto no espaço visual corresponde a um ponto na retina neural a

qual é retinotopicamente mapeada nos centros visuais encefálicos (HUGHES, 1977). A energia luminosa é transformada em impulsos elétricos através de uma rede neuronal que se inicia a partir dos fotorreceptores e, através da participação direta das células bipolares e da modulação feita por interneurônios (células horizontais, amácrinas e interplexiformes), ativa as células ganglionares que conduzirão as informações para os núcleos visuais encefálicos via nervo óptico (WÄSSLE e BOYCOTT, 1991; WU, 1992; REICHENBACH e ROBINSON, 1995).

A análise topográfica da densidade das células ganglionares da retina proporciona informações valiosas sobre a presença de especializações definidas pelo padrão de variação da densidade. Estudos da topografia dessas especializações fornecem informações sobre a localização de áreas de maior acuidade visual, e de como elas se relacionam com regiões do campo visual de interesse para os hábitos de vida de cada animal (revisões em HUGHES, 1977; ALI, 1981; COLLIN, 1999). Medidas de espaçamento celular em regiões de pico de densidade de fotorreceptores e de células ganglionares também possibilitam estimar o poder de resolução espacial de cada especialização (ROLLS e COWEY, 1970; RODIECK, 1973; FRISEN e FRISEN, 1976; COLLIN e PETTIGREW, 1988a, b; COLLIN e PETTIGREW, 1989 SHAND *et al.*, 2000; MIYAZAKI *et al.*, 2002). A distribuição topográfica das células ganglionares em cada espécie examinada vem a ser única, “uma impressão digital”, que reflete a simetria de como o mundo é percebido e pode explicar comportamentos visuais tais como movimento dos olhos e adaptações para um aumento de resolução no campo visual ao longo de vários eixos. (revisão em HUGHES, 1977, COLLIN, 1997; 1999;).

Grande parte das observações feitas por vários neuroanatomistas sobre a organização retiniana foi confirmada neste século com a utilização de uma técnica para montagem plana da retina, que permitiu uma análise microscópica da topografia das células ganglionares ao longo de todo o tecido retiniano. Apesar desta técnica ser antiga (SCHULTZE, 1866 *apud*

HUGHES, 1977), a utilização da mesma para a visualização das células ganglionares foi proposta inicialmente por Stone (1965), que realizou não somente uma análise quantitativa da densidade celular nas diferentes partes da retina do gato como também descreveu os tipos celulares aí existentes. Com a adoção desta técnica, tornou-se possível mapear a densidade das células ganglionares em função de linhas de isodensidade obtendo-se uma definição melhor das especializações retinianas, em termos de sua composição, forma e área ocupada na retina (STONE, 1981).

A importância desta forma de análise na determinação de fatores neurais que influenciam a resolução retiniana despertou o interesse de vários autores e desde então várias espécies de peixes, anfíbios, répteis e mamíferos tem sido investigadas (revisões em HUGHES, 1977; STONE, 1981; COLLIN, 1999).

Dentre as especializações retinianas definidas pela distribuição das células ganglionares destacam-se a fóvea e a área central. Ambas são regiões caracterizadas pela alta densidade celular em relação a outras regiões da retina. A fóvea caracterizada pela presença de ser uma depressão do tecido neural que se origina do afastamento centrífugo das camadas mais internas de modo que a luz incide diretamente sobre os fotorreceptores.. A área central (*sugiro sistematizar utilização dessa nomenclatura em português*) é uma região onde ocorre aumento concêntrico na densidade das células retinianas com um pico de densidade pontual (DUKE-ELDER, 1958, HUGHES, 1977; COLLIN, 1999). Gulliver (1868) *apud* Collin, 1988a, foi o primeiro a relatar a presença de uma fóvea em peixes e descreveu uma depressão bem desenvolvida na retina do cavalo marinho. Slonaker (1897) e Kahmann (1934, 1935) *apud* Collin, 1988a, apresentaram uma comparação qualitativa de classes de vertebrados possuindo uma região de maior acuidade visual.

Além de uma distribuição topográfica em forma de fóvea ou área central, também foi descrita uma especialização retiniana em forma de faixa, caracterizada por uma variação baixa

nos valores de densidade celular em um dos meridianos da retina, que foi designada de faixa visual. Chievitz (1889, 1891) e Slonaker (1897) *apud* Collin, 1988b, foram os primeiros a descrever, em vertebrados, uma região da retina em forma de faixa. Estas regiões em forma de faixa sempre estão associadas com um espessamento da retina freqüentemente observável sem o uso de microscópio de luz. Alguns autores especulavam que estas áreas eram regiões que permitiam um poder de resolução maior (MUNK, 1970 *apud* COLLIN, 1999). Contudo, Walls (1942), sugeriu que estas poderiam ser também áreas de sensibilidade aumentada.

Pensava-se originalmente, que a significância biológica desta área em forma de faixa estava associada com os hábitos dos animais que vivem em campo aberto (PUMPHREY, 1948) ou no solo (BROWN, 1969). Depois de estudos extensos em vários vertebrados, Hughes (1977) e Collin (1999) sugeriram que a distribuição de células ganglionares na retina para cada espécie é única e reflete a simetria de como cada uma delas percebe o mundo, proporcionando informações sobre o papel que a visão representa no comportamento ecológico do animal.

Sugeriu-se que estas zonas em forma de faixa permitem ao animal esquadrihar o horizonte sem a necessidade de movimentos oculares significativos, os quais são necessários para explorar uma imagem visual quando uma *área central* ou uma fóvea estão presentes (ROWE e STONE, 1977; TANCRED, 1981; COLLIN e PETTIGREW, 1988a COLLIN, 1999). A presença de uma faixa visual também possibilita a percepção de movimentos com um limiar de sensibilidade menor. Em várias espécies de vertebrados, as especializações retinianas em forma de faixa possuem uma representação desproporcionalmente grande no tecto óptico, o que ressalta a sua importância funcional (JACOBSEN, 1962; HERIC e KRUGER, 1965; BRAVO e PETTIGREW, 1981; ITO e MURAKAMI, 1984; COLLIN e PETTIGREW, 1988b; COLLIN, 1999).

Um problema que se enfrenta ao trabalhar com a distribuição topográfica de células ganglionares é o de saber se todas as células contadas na camada de células ganglionares são realmente neurônios com projeção central contribuindo para as especializações retinianas das espécies envolvidas. Collin e Pettigrew (1988), comparando a técnica do material marcado com substância de Nissl e de marcação retrógrada com HRP ou cobalto lisina, encontraram que a proporção de células ganglionares verdadeiras encontradas na área central foi de 92%, na faixa visual horizontal de 80% e 66% na periferia retiniana respectivamente. A proporção de células amácrinas deslocadas na população total de células contadas foi de apenas 24%. A maior contribuição para esta discrepância é da região periférica não especializada da retina, o que demonstra que há pequena diferença em ambas topografias e pico de densidade de células ganglionares retinianas entre as duas técnicas (Ito e Murakami, 1984; Collin e Pettigrew, 1988a, b; Collin e Pettigrew, 1989; Collin e Northcutt, 1993; Shand *et al.*, 2000). Por esta razão a marcação de Nissl é uma técnica bastante aceitável, haja vista que a marcação retrógrada é necessária para a identificação definitiva da população de células ganglionares, mas a topografia e o pico de densidade celular permanecem relativamente inalterados mesmo com a inclusão da população de células amácrinas deslocadas.

I.2 - IMPORTÂNCIA DA VISÃO PARA OS PEIXES DE DIFERENTES HABITATS E HÁBITOS DE VIDA.

I.2.1 Aspectos relativos à distribuição de células ganglionares da retina

Na escala evolutiva, alguns grupos de animais apresentam particularidades notáveis que os diferenciam dos demais. Dentre os peixes, alguns têm necessidades especiais de um sistema visual que os possibilite ver embaixo da água e no ar, possuindo então uma capacidade incomum em combinar dois procedimentos ópticos muito diferentes como acontece entre alguns *teleósteos* (DUKE-ELDER, 1958; FERNALD, 1997; SCHWAB *et al.*, 2001). Até 1973 a ultraestrutura da retina de *teleósteos* havia sido investigada apenas em estudos concernentes principalmente às conexões sinápticas envolvendo células horizontais e bipolares (VILLEGAS, 1960, 1961; VILLEGAS e VILLEGAS, 1963; STELL, 1964, 1965; GOODLAND, 1966; STELL, 1967).

A análise da camada de células ganglionares em teleósteos vem sendo feita em um número crescente de espécies que ocupam nichos ecológicos diferente, com hábitos de vida e estratégias alimentares distintos. Estudos realizados por vários autores permitiram uma análise comparativa entre as especializações retinianas relacionando-as aos diferentes habitats e hábitos alimentares e comportamentais em várias espécies de peixes. Parte dos resultados obtidos nesses estudos está sumarizada nas **tabelas 1 e 2**.

Alguns estudos analisaram de forma quantitativa a densidade de células ganglionares de espécies de *teleósteos* de recifes de coral que possuem uma faixa horizontal além de uma área central bem desenvolvidas. A relevância destas especializações em peixes é discutida por vários autores, e em geral tem sido demonstrado que as mesmas estão relacionadas aos

diferentes nichos ecológicos ocupados por cada espécie (COLLIN e PETTIGREW, 1988; COLLIN, 1999; MIYAZAKI *et al.*, 2002).

A presença de uma faixa horizontal foi observada em espécies de hábitos sedentários tais como *Fundulus heteroclitus* (BUTCHER, 1938), *Boleophthalmus sculptus*, *Periophthalmus sobrinus*, *P. koelreuteri africanus* (MUNK, 1970), *Aplocheilus lineatus* (ENGSTRÖM, 1963) e *Epiplatys grahami* (MUNK, 1970) bem como em espécies de água corrente, tais como *Navodon modestus* (atualmente, *Thamnaconus modestus*), (ITO e MURAKAMI, 1984; COLLIN e PETTIGREW, 1988; BOZZANO e COLLIN, 2000; SHAND *et al.*, 2000; DOUGLAS *et al.*, 2002; MIYAZAKI *et al.*, 2002;)

Exemplos de organização retiniana, evidenciando a presença de uma faixa visual ou de uma área central são apresentados nas **figuras 1 e 2** respectivamente.

Além da diversidade de tipos de especializações retinianas, algumas considerações sobre a diversidade de tipos de projeção retiniana para o tecto óptico foram feitas por vários autores (BARTHELD e MEYER, 1987; MELZER e POWERS, 2001; EASTMAN e LANNON, 2003). A laminação do tecto óptico de Actinopterygian tem despertado interesse há mais de um século (STIEDA, 1868; MIRTO, 1895; RAMON, 1899; ARIENS-KAPPERS *et al.*, 1936; MEEK, 1981; VANEGAS *et al.*, 1984; LEGHISSA, 1955; *apud* BARTHELD e MEYER, 1987).

Uma variação da espessura da lâmina tectal em diferentes espécies foi descrita e tentativas foram feitas para compreender a significância funcional desta variabilidade (WINKELMANN e WINKELMANN, 1968; SINGH e KHANNA, 1970; SCHMATOLLA, 1972; KISHIDA, 1979). A projeção retinotectal foi primeiro estudada com o método de Golgi (MIRTO, 1895; RAMON, 1899), posteriormente com métodos de degeneração e técnicas autoradiográficas, e mais recentemente com a utilização dos marcadores peroxidase de raiz forte (HRP) e cobalto lisina, os quais têm sido bastante utilizados (NORTHCUTT, 1983;

VANEGAS e ITO, 1983; PUSHCHIN e KONDRASHEV, 2003). Geralmente acredita-se que a principal camada retinorecipiente no tecto óptico de peixes é o estrato fibroso griseum central, mas o registro de fibras retinofugais em outras camadas tectais variam consideravelmente entre as espécies (NORTHCUTT, 1983; VANEGAS e ITO, 1983; VANEGAS *et al.*, 1984). As discrepâncias são sempre explicadas nas diferentes espécies (SPRINGER e MEDNICK, 1985) ou como artefatos devido à sensibilidade diferente dos métodos, (MEEK, 1983; VANEGAS, 1983; VANEGAS *et al.*, 1984), ou devido ao transporte transináptico de traçadores (VANEGAS *et al.*, 1984). Alguns estudos consideraram a hipótese de que as diferenças nas projeções retinotectais poderiam refletir relações filogenéticas. Uma análise comparativa de camadas retino-recipientes em diferentes espécies de peixes mostrou que o estrato fibroso griseum superficial (SFGS) recebe a principal entrada em todas as espécies examinadas. O estrato periventricular (SPV) e estrato álbum central (SAC) contêm uma projeção esparsa em muitas espécies. A maior diferença encontrada na presente série é uma projeção para o SGC, e para a parte superficial do estrato óptico (SO). Os dados obtidos nesses estudos comparativos sugeriram que o padrão de projeção tectal (não o número de fibras terminais) seja determinado pelo grau de relação filogenética ao invés de ser influenciada por fatores como tamanho do olho, habitat ou métodos de caça. Aparentemente, não há qualquer inter-relação entre como uma espécie é visualmente orientada e onde as fibras retinianas terminam em diferentes camadas do tecto (WINKELMANN e WINKELMANN, 1968; KISHIDA, 1979). A diferença óbvia do grau de orientação visual entre espécies relacionadas, é refletida por outros fatores, tais como número de fibras retinianas ou tamanho e espessura do tecto. Por outro lado, numerosos estudos têm mostrado que outros aspectos da projeção retinotectal estão de fato correlacionadas com habilidades visuais específicas de cada animal (BARTHELD e MEYER, 1987).

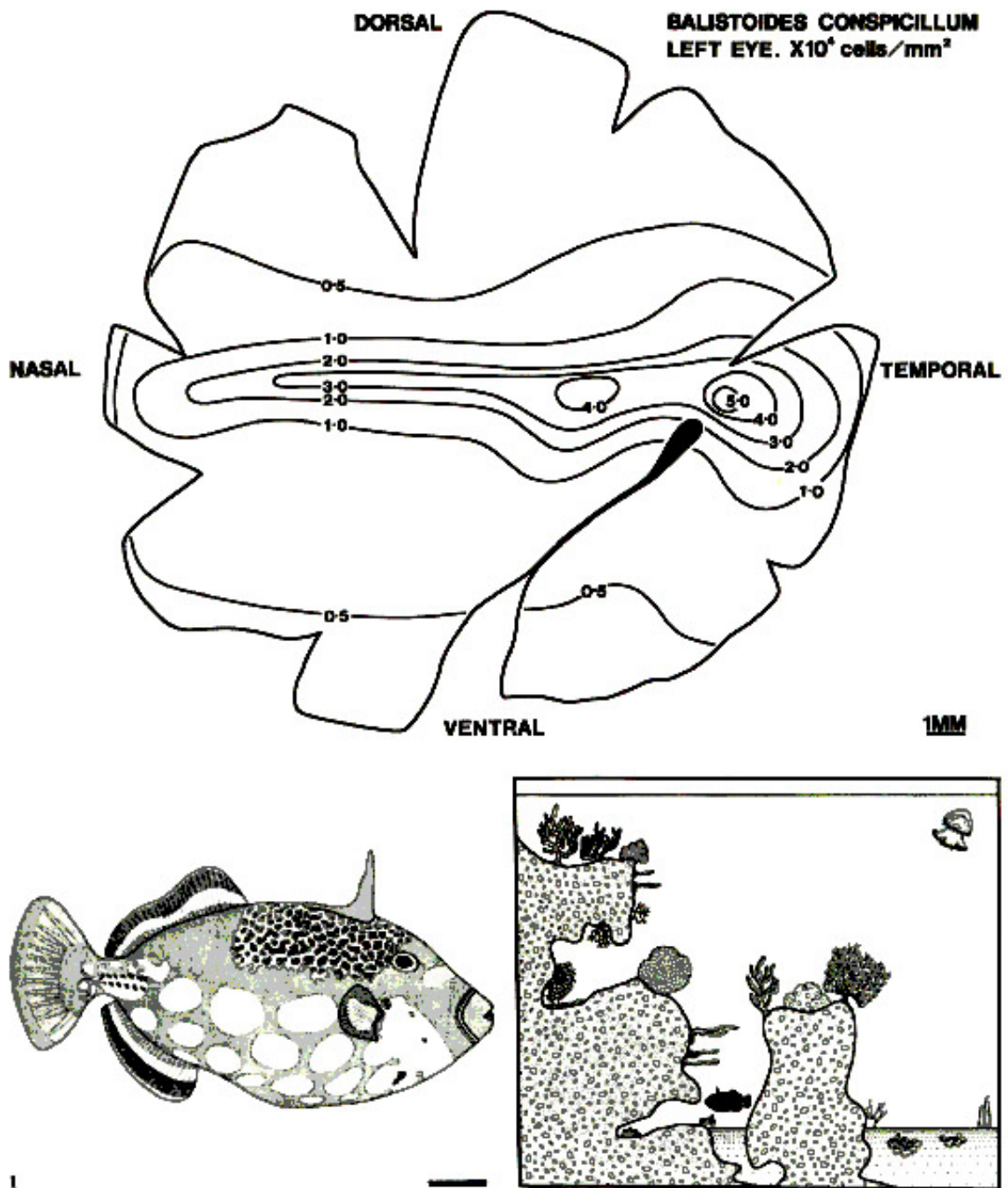


Figura 1: Distribuição topográfica da densidade de células ganglionares na retina do peixe *Balistoides conspicillum*. Observar a presença de um “Visual Streak” ao longo do meridiano horizontal da retina o que favorece uma boa acuidade ao longo da maior parte do campo visual deste animal. O quadro abaixo esquematiza o nicho ecológico onde este animal habita. Figura retirada de Collin & Pettigrew, (1988a).

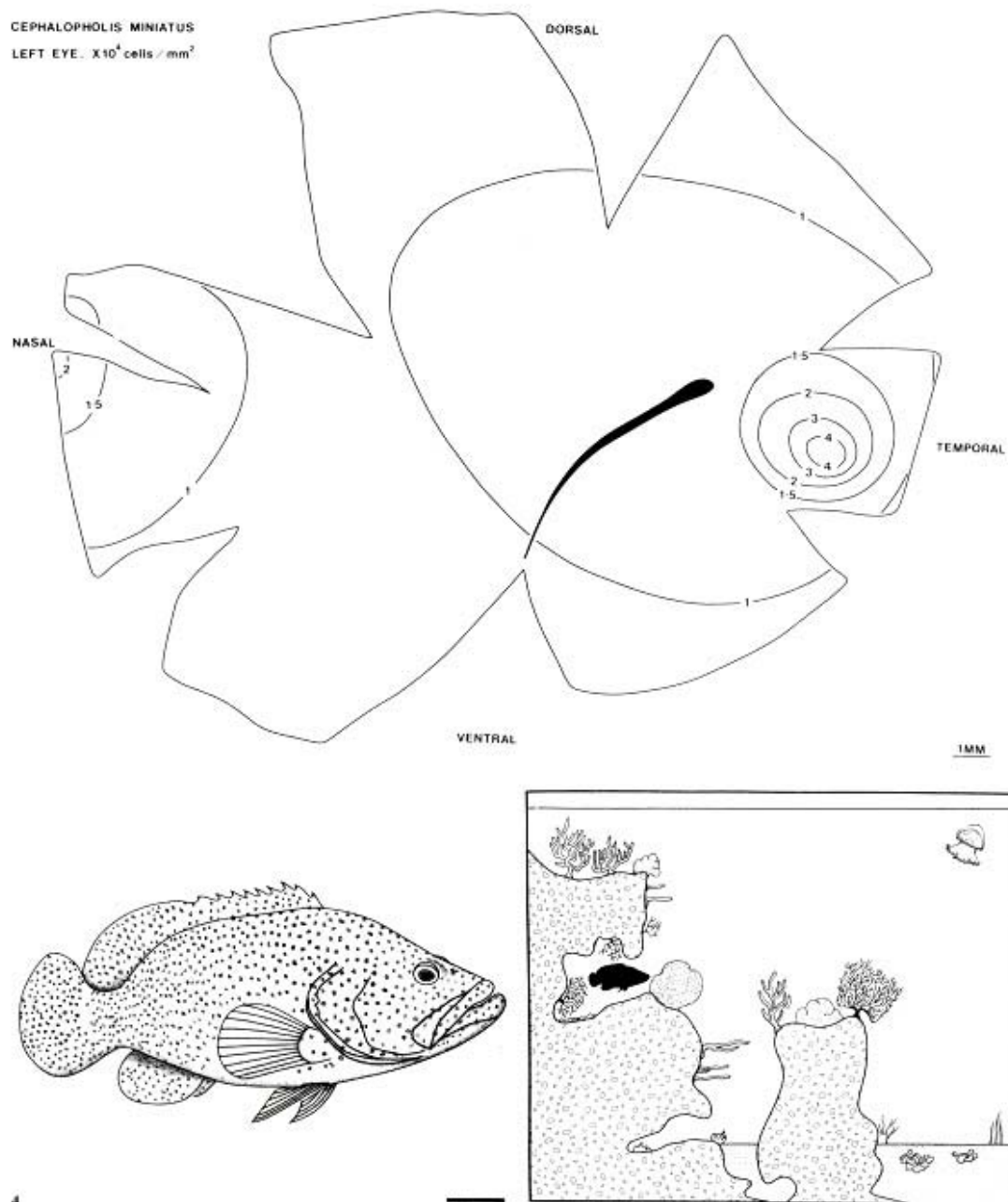


Figura 2: Distribuição topográfica da densidade de células ganglionares na retina do peixe *Cephalopholis miniatus*. Observar a presença de uma “Área central” na periferia do quadrante temporal da retina o que favorece uma maior acuidade ao longo do campo visual central deste animal. O quadro abaixo esquematiza o nicho ecológico onde este animal habita. Figura retirada de Collin e Pettigrew, (1988a).

TABELA 1

Espécies	Classe (ordem)	Habitat	Pico de densidade de células Ganglionares. (x 10 ³)	Pico de densidade de fotorrecept.or	Tipo de especialização e localização retiniana	Referencias
<i>Ichthyomyzon unicuspis</i>	Agnatha	Parasitic on fish	3.28; 2.98		AC-TD; AC-ND	Fritzsche and Collin (1990)
<i>Hydrolagus collei</i>	Chondrichthyes	Benthopelagic (O)	0.35		HS-T	Collin (1999)
<i>Heterodontus</i>	Condrihthyes	Benthopelagic (O)	0.20; 0.50		AC-T; HS-C	Peterson and Rowe (1980)
<i>Carcharhinus melanopterus</i>	Condrihthyes	Benthopelagic (O)	2.00		HS-C	Collin (1999)
<i>Hemiscyllium ocellatum</i>	Condrihthyes	Benthic scavenger	1.90		HS-C	Collin (1999)
<i>Brachaelurus waddi</i>	Chondrichthyes	Benthic feeder (O)	1.75; 1.50		AC-T; HS-N	Collin (1999)
<i>Halophryne diemensis</i>	Actinopterygii	caves or crevices	7.0 4.0		AC-T, HS-T	Collin and Pettigrew (1988a)
<i>Pomacanthus semicirculatur</i>	Actinopterygii	caves, under coral overhangs	14.0 13.0		AC-T AC-N	Collin and Pettigrew (1988a)
<i>Parapercis cylindrica</i>	Actinopterygii	Benthopelagic carnivore	40.0 34.0		AC-T AC-N	Collin and Pettigrew (1988a)
<i>Aulostoma chinensis</i>	Actinopterygii	Benthic feeder	46.0 14.0		AC-T HS	Collin and Pettigrew (1988a)
<i>Mustelus canis</i>	Chondrichthyes	Benthopelagic	1.60		HS-D	Collin (1999)
<i>Negaprion brevirostris</i>	Chondrichthyes	Pelagic	1.60	6.5 cones	HS-C	Heuter (1991)
<i>Lipistosteus platyrhincus</i>	Actinopterygii	Surface of rivers and streams (O)	9.40; 5.90		HS-V; AC-T	Collin and Northcutt (1993)
<i>Aspius aspius</i>	Actinopterygii	Pelagic carnivore	9.9	5.1 cones	AC-TV; AC-ND	Zaunreiter <i>et al.</i> (1991)
<i>Rutilus rutilus</i>	Actinopterygii	Pelagic carnivore	6,30	5.5 cones	AC-T; AC-N	Zaunreiter <i>et al.</i> (1991)
<i>Salmo trutta trutta</i>	Actinopterygii	Benthopelagic		14.8 dc	AC-TV	Ahlbert (1976)
<i>Carassius auratus</i>	Actinopterygii	Pelagic omnivore	5.96	14.0 cones	AC-T	Mednick and Springer (1988) Mednick <i>et al.</i> (1988) Collin and Pettigrew (1988c)
<i>Lienardella fasciata</i>	Actinopterygii	Open areas of coral reef (O)	7.4; 6.0		AC-TD; HS-C	Collin and Pettigrew (1988b)
<i>Plectropoma leopardus</i>	Actinopterygii	Coral caves	15.0		AC-TV	Collin (1989)
<i>Balistoides conspicillum</i>	Actinopterygii	Open areas of reef crest (O)	51; 42; 35		AC-T; AC-TC; HS-C	Collin and Pettigrew (1988b)
<i>Choerodon albigena</i>	Actinopterygii	Open areas of coral rubble (O)	83; 80; 50		AC-TD; AC-T; HS-C	Collin and Pettigrew (1988b)
<i>Lethrinus chrysostomus</i>	Actinopterygii	Open areas of reef (O)	50; 40; 35		AC-T; HS-C; AC-TD	Collin and Pettigrew (1988b)
<i>Gymnocranius bitoruatus</i>	Actinopterygii	Open areas of coral rubble (O)	63; 20		AC-TD; HS-N	Collin and Pettigrew (1988b)
<i>Amblyglyphidodon curacao</i>	Actinopterygii	Seeks protection of branches	30; 25; 23		AC-TV; AC-T; AC-ND	Collin and Pettigrew (1988a)
<i>Cephalopholis miniatus</i>	Actinopterygii	Coral caves	47; 22		AC-T; AC-N	Collin and Pettigrew (1988a)
<i>Semotilus atromculatus</i>	Actinopterygii	Crepuscular omnivore	16.6; 12.5; 11.4		AC-T; AC-N; AC-ND	Collin and Ali (1994)
<i>Limnichthyes fasciatus</i>	Actinopterygii	Benthic feeder of plankton	150.0		F-C	Collin and Collin (1988)
<i>Ictalurus punctatus</i>	Actinopterygii	Benthic forager	1.5		HS-C	Dunn-Meynell and Sharma (1987)
<i>Navodon modestus</i>	Actinopterygii	Amongst coral grottos	16.0; 16.0		AC-T; HS-NC	Ito and Murakami (1984)
<i>Sebasticus marmoratus</i>	Actinopterygii	Benthic lie-in-wait predator	16.0		HS-C	Ito and Murakami (1984)
<i>Trichiurus lepturus</i>	Actinopterygii	Pelagic with vertical orientation in water column		60.0 cones	RI-TV	Kawamura and Ohashi (1988)
<i>Wowella sherboni</i>	Actinopterygii	Benthic or benthopelagic	24.5; 21.0		F-T; VS-T	Collin (1999)
<i>Paralabrax nebulifer</i>	Actinopterygii	Cryptic amongst kelp and reef	33.4		F-T	Schwassmann (1968)

TABELA 1 (Continuação)

Espécies	Classe (ordem)	Habitat	Pico de densidade de células Ganglionares. (x 10 ³)	Pico de densidade de fotorrecept.or	Tipo de especialização e localização retiniana	Referencias
<i>Carangoides equula</i>	Actinopterygii	Reef-associated; marine; depth range 100 – 200 m	1.7 ?			Takei and Somiya (2001)
<i>Notacanthus bonapartei</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 700 - 2000 m	3.9		AC-TD;AC-V	Wagner et al.(1998)
<i>Synaphobranchus kaupi</i>	Actinopterygii	bathydemersal; marine ; depth range 400 – 4800 m	6.3	50	AC-V	Wagner et al.(1998)
<i>Omosudis lowei</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 950 – 2500 m	59.6	184.0	AC-V	Wagner et al.(1998)
<i>Sternoptyx diaphana</i>	Actinopterygii	bathypelagic; oceanodromous; marine ; depth range 300 – 1100 m	21.6		AC-V	Wagner et al.(1998)
<i>Argyropelecus aculeatus</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 100 - 600 m	50.6		AC-N	Wagner et al.(1998)
<i>Argyropelecus affinis</i>	Actinopterygii	bathypelagic; oceanodromous; marine ; depth range 300 – 600 m	34.0		AC-N	Wagner et al.(1998)
<i>Argyropelecus gigas</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 350 - 650 m	31.3		AC-N	Wagner et al.(1998)
<i>Argyropelecus sladeni</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 50 – 800 m	38.6	97	AC-CL	Wagner et al.(1998)
<i>Argyropelecus hemigymnus</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 50 - 800 m	33.0		AC-NM	Wagner et al.(1998)
<i>Opisthoproctus soleatus</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 250 - 310 m	43.6		AC-NL	Wagner et al.(1998)
<i>Opisthoproctus grimaldii</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 200 – 270 m	52.6		AC-CL	Wagner et al.(1998)
<i>Winteria telescopa</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 400 - 2500 m	17.7	429		Wagner et al.(1998)
<i>Stylephorus chordatus</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine; depth range 430 - 500	28.2		AC-CL	Wagner et al.(1998)
<i>Evermannella indica</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 500 - 800 m	23.6	534		Wagner et al.(1998)
<i>Scopelarchus michaelisarsii</i>	Actinopterygii	bathypelagic; oceanodromous; marine; depth range 256 – 500	56.1	65.2	AC-CL	Wagner et al.(1998)
<i>Howella sherborni</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 25 - 300 m	24.5		F-T	Wagner et al.(1998)
<i>Nemichthys sp.</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine; depth range 0 – 2000	19.0		AC-TD	Wagner et al.(1998)
<i>Bathylagus pacificus</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 25 - 900 m	7.0	416	UK-C	Wagner et al.(1998)
<i>Bathylagus benedicti</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 25 - 900 m	80.0	765	F-C	Wagner et al.(1998)
<i>Platyroctegen mirus</i>	Actinopterygii		7.6	70.9	F-C	Wagner et al.(1998)
<i>Searsia koefoedi</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 450 - 1500 m	23.8		F-T	Wagner et al.(1998)
<i>Platyroctes apus</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 385 – 1000 m	26.2		F-T	Wagner et al.(1998)
<i>Rouleina attrita</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 1400 - 2100 m	5.3		AC-N	Wagner et al.(1998)
<i>Xenodermichthys copei</i>	Actinopterygii	Depth range 100-1000	27.4		F-T	Wagner et al.(1998)
<i>Conocara murrayi</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 1200 - 2600 m	7.8		AC-N	Wagner et al.(1998)
<i>Conocara macroptera</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 800 - 2200 m	24.3		F-T	Wagner et al.(1998)
<i>Conocara salmonea</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 2400 - 4200 m	9.2		AC-NON-D	Wagner et al.(1998)
<i>Alepocephalus rostratus</i>	Actinopterygii	bathydemersal; marine ; depth range 300 - 3600 m	11.2		F-T	Wagner et al.(1998)
<i>Alepocephalus bairdii</i>	Actinopterygii	bathydemersal; marine ; depth range 650 - 1700 m	11.9	146	F-T	Wagner et al.(1998)
<i>Alepocephalus productus</i>	Actinopterygii	bathydemersal; marine ; depth range 2000 - 2500 m	12.6		F-T	Wagner et al.(1998)
<i>Narcetes stomias</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 1500 - 2300 m	30.6		F-T	Wagner et al.(1998)
<i>Bathytroctes microlepis</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 1100 – 2700 m	17.8		F-TV	Wagner et al.(1998)
<i>Scopelogadus beanie</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 800 - 2500 m	12.6		AC-ND	Wagner et al.(1998)
			20.2		F-T	Wagner et al.(1998)
			30.8		F-T	Wagner et al.(1998)
			7.8		RIP	Wagner et al.(1998)

TABELA 1 (Continuação)

Espécies	Classe (ordem)	Habitat	Pico de densidade de células Ganglionares. (x 10 ³)	Pico de densidade de fotorreceptor	Tipo de especialização e localização retiniana	Referencias
<i>Poromitra capito</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 800 - 1000 m	11.0 10.7		RIP AC-C	Wagner et al.(1998)
<i>Serrivomer beani</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 150 – 3000 m	12.5		RIP	Wagner et al.(1998)
<i>Chauliodus sloani</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 50 - 1000 m	21.2 14.1		RIP AC-C	Wagner et al.(1998)
<i>Halargyreus johnsonii</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 450 - 3000 m	13.0		RIP	Wagner et al.(1998)
<i>Melanonus zugmayeri</i>	Actinopterygii	bathypelagic; oceanodromous; marine	18.8 10.0		RIP AC-C	Wagner et al.(1998)
<i>Diaphus raphinesquei</i>	Actinopterygii	bathypelagic; oceanodromous; marine ; depth range 50 - 600 m	33.3		RIP	Wagner et al.(1998)
<i>Diaphus effulgens</i>	Actinopterygii	bathypelagic; non-migratory; marine ; depth range 40 - 650 m	16.4		RIP	Wagner et al.(1998)
<i>Myctophum punctatum</i>	Actinopterygii	bathypelagic; oceanodromous; marine ; depth range 700 - 1000 m	19.4		RIP	Wagner et al.(1998)
<i>Lobianchia gemellarii</i>	Actinopterygii	bathypelagic; oceanodromous; marine ; depth range 25 - 500 m	17.5		RIP	Wagner et al.(1998)
<i>Lampanyctus macdonaldi</i>	Actinopterygii	bathypelagic; oceanodromous; marine ; depth range 550 - 1100 m	17.1 3.6		RIP AC-C	Wagner et al.(1998)
<i>Lampanyctus festivus</i>	Actinopterygii	bathypelagic; oceanodromous; marine ; depth range 100 - 700 m	20.4 5.7		RIP AC-C	Wagner et al.(1998)
<i>Lampanyctus ater</i>	Actinopterygii	bathypelagic; marine ; depth range 110 - 930 m	26.3 7.4		RIP AC-C	Wagner et al.(1998)
<i>Lampanyctus crocodilus</i>	Actinopterygii	bathypelagic; oceanodromous; marine ; depth range 100 - 1100 m	NR	500	NR	Wagner et al.(1998)

Dados reproduzidos de COLLIN, S. P. (1999), COLLIN e PETTIGREW, (1988a); Wagner et al., (1998 a,b)
AC: Área central; F: fovea; VS: visual streak; C: central; T: temporal; TV: temporal-ventral; NL: nasal-lateral;
CL: central-lateral; NM: nasal medial; RIP: Isotropia radial periférica; V: ventral; TD: temporal dorsal.

TABELA 2

Espécies de ELASMOBRANQUIAS	<i>Galeocерdo cuvieri</i>	<i>Hemiscyllium ocellatum</i>	<i>Scyliorhinus canicula</i>	<i>Galeus melastomus</i>	<i>Isistius brasiliensis</i>	<i>Etmopterus spinax</i>	<i>Hydrolagus mirabilis</i>	<i>Raja bigelowi</i>
Família	Carcharinidae	Hemiscylliidae	Scyliorhinidae	Scyliorhinidae	Squalidae	Squalidae	Chimaeridae	Rajidae
Habitat	Pelágico	Bentônico	Bentônico	Bentopelágico	Epipelágico/ Batipelágico	Mesopelágico	Bentopelágico	Bentônico
Profundidade, m	0-140	0-50	50-400	300-2,000	400-1,600	650-2,200		650-2.200
Tamanho do peixe, TL em cm	>150.0	60	47.5	38	41.6	44.5	47	48.5
Tamanho do olho, mm	41.5	NR	15.4	17.1	NR	18.2	NR	NR
Diâmetro da lente, mm	13.7	NR	6.8	7.3	NR	8.4	NR	NR
Superfície da retina, mm ²	2.394.3	219.5	302.4	300.5	260.2	401.1	961.5	204.3
Número total de células ganglionares	1629875	165062	185279	245314	194044	148450	434251	159026
Densidade de células gangl. dentro do HS, cél. por mm ²	1.300-1.700	1.200-1.600	1.500-2.000	NA	700-800	1.000-1.300	1.300-1.500	
Posição do HS	Central	Central	Temporal	Temporal, nasal	Temporal	Central	Temporal, nasal	Temporal, nasal
Pico de densidade dentro do HS, células por mm ²	1,929	1,825	2,396	2,200; 2.514	1,553	932	1,908; 1,300	2,239; 2,239
Pico do gradiente densidade	1.9:1	2.2:1	4.8:1	3.1:1	1.9:1	1.8:1	3.8:1	2.2:1
O pico de densidade é o valor máximo de densidade celular encontrado na retina. O pico do gradiente de densidade se refere ao gradiente máximo do pico de densidade celular na área especializada para a menor densidade celular encontrada na retina. HS: horizontal streak ou faixa visual horizontal.								

Tabela reproduzida sem modificações do artigo "Retinal Ganglion Cell Topography in Elasmobranchs" BOZZANO A. & COLLIN S. P. Brain Behavior and Evolution 2000; 55:191-208.

I.3 – Características do peixe *Anableps*

Em quase todas as classes de vertebrados, é possível encontrarmos exemplos de animais que representem uma transição da água para o ar ou vice-versa, sem que sua qualidade óptica visual tenha sido afetada seriamente. Entre os peixes, um número limitado de espécies aparece com a possibilidade de manter simultaneamente, visibilidade no ar e na água (MUNK, 1969; SCHWAB *et al*, 2001). Dentre estes, o *Anableps anableps* tem atraído especial atenção. O *Anableps* é um peixe pertencente à classe *Osteichthyes*, subclasse *Actinopterygii*, infraclasse *Teleostei* ordem *Atheriniformes*, subordem *Cyprinodontoidei*, família *Anablepidae* (COSTA, 1998), que tem a capacidade incrível de visão nos sistemas aéreo e aquático simultaneamente.

O nome *Anableps* vem do Grego “ana” (grande) e “bleps” (olho). Há três espécies dentro do gênero *Anableps*: *Anableps dowi*, encontrados no México, e *Anableps anableps* e *Anableps microlepis* encontrados ao longo do Atlântico Norte e costa da América do Sul. Especificamente, o *A. anableps* tem sido documentado principalmente no delta do Rio Amazonas, na costa oeste da América do Sul (GRASSÉ, 1957).



Fig. 3 – Peixes do gênero *Anableps* vistos de lado quando totalmente submersos.

Fonte: www3.sympatico.ca/tp.bridges/home.html

Originário de água salobra, o *Anableps* nada geralmente de tal forma que a linha da água divide seu olho ao meio (Fig. 4), de maneira que a metade superior recebe uma visão do ambiente aéreo e a metade inferior do meio aquático, simultaneamente.

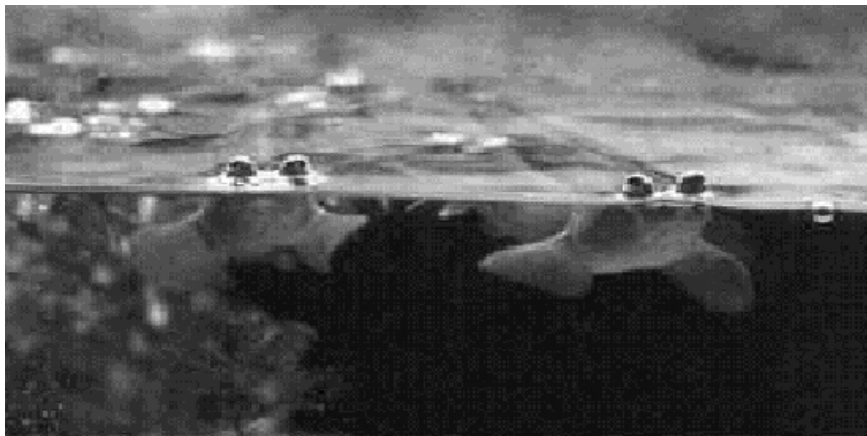


Fig.4 - Peixe *Anableps* visto de frente, com a metade superior do olho exposta ao ar e o corpo submerso.

Fonte: www.animalfact.com/article1001.html

A metade superior do olho do *Anableps* está sempre exposta ao ar. A estrutura de seus olhos lhe possibilita ver sobre e sob a água ao mesmo tempo. O olho é oval e dividido por uma faixa estreita de pigmento, a íris possui duas faixas laterais extensas denominadas íris flap (Fig. 5) que formam duas aberturas pupilares (ARRUGA, 1941; DUKE-ELDER, 1958), daí o nome “quatro olhos” ou tralhoto. A retina aparece dividida em porções dorsal e ventral.



Fig.5 – Imagem do olho do *Anableps*, dividido ao meio pelas íris-flaps.

Fonte: www.rae.org/revev5.html

A luz que vem de cima entra ao longo do eixo menor do olho e o foco é na porção ventral da retina. Reciprocamente, a luz que vem de baixo atravessa o eixo maior do olho para ser focado na porção dorsal da retina. Adicionalmente, a porção anterior da lente do *Anableps* é mais curva ventralmente do que dorsalmente (Fig. 6). Estas curvaturas diferentes do sistema de lentes capacitam o *Anableps* a focalizar acima e abaixo da água, uma vez que estes dois

meios apresentam densidades diferentes. (ARRUGA, 1941; DUKE-ELDER, 1958; SCHWASSMANN e KRUGER, 1965; SIVAK, 1976; SWAMYNATHAN *et al.*, 2003).

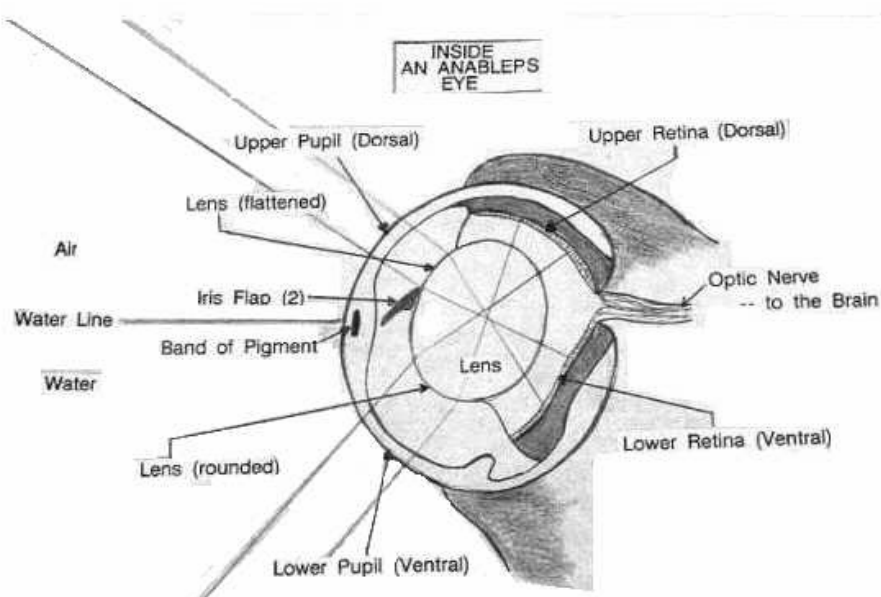


Fig. 6 – Esquema do olho do *Anableps*, mostrando as duas córneas, as duas pupilas, as duas retinas (dorsal e ventral) e a lente. Fonte: www.thatfishshop.com/...anableps2.html

Se o *Anableps* submerge, as imagens focalizadas na retina ventral (a partir da pupila superior) ficam provavelmente fora de foco. Isto se deve ao fato de o sistema óptico, constituído pela córnea e cristalino, apresentarem uma curvatura adequada à transferência da luz a partir do ar e não da água para o interior do olho, de modo que a distância focal coincida com o tecido retiniano (SWAMYNATHAN *et al.*, 2003).

Em geral este peixe normalmente só mergulha sua cabeça totalmente na água por no máximo 2 a 4 vezes por minuto, pela necessidade de manter sua córnea umidificada (SCHWASSMANN e KRUGER, 1965). Adicionalmente esta submersão pode ocorrer durante o período de acasalamento ou para defesa contra predadores aéreos. A córnea dorsal também é mais espessa do que a córnea ventral (SWAMYNATHAN *et al.*, 2003). Discute-se que a córnea dorsal relativamente achatada do *Anableps* pode ser uma adaptação morfológica para reduzir a refração na interface ar/córnea. Semelhantemente, córneas achatadas estão presentes

no peixe *Mnierpes macrocephalus* (GRAHAM e ROSENBLATT, 1970) e no peixe voador do atlântico *Cyosekyrys geteryrys* (KNOWLES *et al.*, 1967).

Swamynathan *et al.* (2003), relataram ter identificado gelsolin e G-actina como as duas proteínas hidrossolúveis mais abundantes presentes na córnea do *Anableps*. Segundo esses autores, a proporção de gelsolin encontrada na córnea dorsal do *Anableps* foi maior (38%) do que a encontrada na córnea ventral (21%). A diferença mais marcante observada por esses autores entre a córnea dorsal e ventral do *Anableps* foi a espessura do epitélio: 20 camadas de células epiteliais na córnea dorsal e 5 camadas na córnea ventral.

Vários estudos têm sido desenvolvidos ao longo do tempo, tentando elucidar a organização do sistema visual do *Anableps*, e os primeiros registros de que se tem conhecimento sobre esse peixe remontam a Harcourt (1608) *apud* Klee (1968); Artedi (1758); Soemmerring (1818); Schneider-v Orelli (1907); Arruga (1941) *apud* Duke-Elder (1958).

Sivak (1976) investigou o estado refrativo do olho de espécimens jovens (8-10 cm) do *A. anableps* através das pupilas dorsal e ventral e determinou as dimensões intraoculares ao longo do eixo das duas pupilas. Adicionalmente este autor também analisou a presença ou ausência de um poder de acomodação, descrevendo tê-la observado apenas ao longo do eixo da pupila ventral, relacionado com o ambiente aquático. Schneider-v Orelli (1907) descreveu que falta um músculo para acomodação no *A. anableps*. Contudo, Schwassmann e Kruger (1965) descreveram a presença de tal músculo em *A. microlepis*. Alguns autores (WALLS, 1942; PRINCE, 1956; DUKE-ELDER, 1958) têm considerado a natureza dual óptica do olho do *Anableps* para representar um dispositivo de acomodação estática.

De acordo com Sivak (1976), as medidas da pupila dorsal sob efeito de anestesia com MS222, revelam um estado refrativo de hipermetropia moderada com um astigmatismo significativo entre os meridianos horizontal (rostral-caudal) e vertical (dorsal-ventral). A menor hipermetropia encontrada foi ao longo do meridiano vertical indicando que este é o

meridiano de maior poder de refração. Maiores quantidades de hipermetropia foram encontradas através da pupila ventral. Notou-se que o menor diâmetro da pupila ventral, detectado por retinoscopia, dificulta descrever que o achado poderia ser exato com mais ou menos 1.0 dioptria (SIVAK, 1976).

Schneider-v Orelli (1907) relataram grau semelhante de miopia em ambas as pupilas de um *A. anableps* segundo Sivak (1976). A questão sobre se o olho deste peixe poderia ser caracterizado como sendo míope ou hipermetrope ainda não está respondida satisfatoriamente. Contudo, não há dúvida de que o olho do *A. anableps* é opticamente adaptado para visão simultânea na água e no ar (SIVAK, 1976; SWAMYNATHAN *et al.*, 2003). Nos recém-nascidos e naqueles que estão num estado de adaptação ao escuro, há uma pupila com grande abertura superior. No estado de adaptação à luz, há duas aberturas pupilares separadas e o iris-flap horizontal anterior se sobrepõe ao posterior. A íris dorsal tem uma larga extensão de movimentos enquanto a abertura ventral muda muito pouco (SCHWASSMANN e KRUGER, 1965; SCHWAB, 2001).

A lente é em forma de pêra ou ovalada, diferentemente das lentes esféricas da maioria dos *teleósteos*. O eixo maior da lente é dirigido para a água, enquanto o eixo mais curto é dirigido para o ar. O eixo maior atua como uma lente esférica em outros peixes, e o eixo menor dá uma razoável imitação de uma lente ovóide dos animais terrestres (SCHWASSMANN, 1968; SIVAK, 1976; SCHWAB, 2001; SWAMYNATHAN *et al.*, 2003). As duas curvaturas diferentes da superfície da lente proporcionam refrações distintas. Discute-se que as extensões horizontais da íris sejam importantes para evitar a formação de uma imagem dupla a partir dos ambientes aquático e aéreo, devido à refração da luz na superfície da água, reduzindo o brilho refletido nesta superfície (SCHWASSMANN e KRUGER, 1965).

Considerando que há uma constância fundamental na ultraestrutura básica das camadas retinianas e nos fotorreceptores e ao mesmo tempo, uma diversidade notável entre eles, em relação a hábitos particulares e habitats, foram realizados alguns estudos para caracterizá-los na retina do *Anableps anableps*. Borwein e Hollenberg (1973) concluíram que os fotorreceptores desta espécie apresentam movimentos fotomecânicos e gotículas de óleo. Os bastonetes diferem dos cones em vários aspectos estruturais e sinápticos, como por exemplo: tamanho dos segmentos externos, estrutura em forma de disco e presença de uma incisura; tamanho do segmento interno, forma e superfície; os detalhes da conexão do cilium; formação de gotículas de óleo das mitocôndrias do cone; comportamento em movimentos fotomecânicos; a aparência e posição do núcleo; os terminais sinápticos e as células de Müller ao seu redor; a ausência de um segmento acessório externo; o citoplasma mais denso e mais escuro do segmento interno e terminal sináptico. No entanto, não foram observadas diferenças estruturais entre as células fotorreceptoras das retinas dorsal e ventral.

A vascularização do olho do *Anableps* foi descrita como sendo formada pela presença de uma grande glândula coroidal ocupando área considerável da parte ventral do olho, imediatamente posterior à retina ventral (ARRUGA, 1941; DUKE-ELDER, 1958). Borwein e Hollenberg (1973), a partir de secções transversais da retina, descreveram também a presença de vasos hialóides na superfície vítrea da retina. A partir de secções transversais coradas com hematoxilina-eosina (HE) e de fotografias da anatomia interna do olho, foi descrito que a hemi-retina dorsal é distinta da hemi-retina ventral, sendo esta última cerca de duas vezes mais espessa do que a retina dorsal e com um maior número de corpos celulares em todas as camadas celulares. (INOUGE e NOTO, 1962; SCHASSWANN e KRUGER, 1965; SIVAK, 1976; SCHWAB *et al.*, 2001)

A resposta optomotora (OPM) é um elemento nos *teleósteos* que faz parte do movimento optocinético. É a resposta motora que atua para manter a estabilidade visual

(HARDEN-JONES, 1963). Em diferentes espécies de peixes, esta resposta tem sido utilizada para estudar um número de parâmetros visuais, incluindo sensibilidade espectral, transferência de funções visuais, acuidade e resolução temporal (DOUGLAS e HAWRYSHYN, 1990), além de possibilitar investigar a integridade da via visual durante o desenvolvimento e após lesão visual central (SHINOZUKA e WATANABE, 2004; NEUHAUSS, 2003).

A resposta optomotora do *Anableps anableps*, foi estudada por Albensi e Powell (1998) e Saidel e Fabiane (1998), os quais procuraram relacioná-la às retinas dorsal e ventral. A motivação destes autores baseou-se nas evidências de que o seu sistema de visão aérea é capaz de detectar objetos menores a maiores distâncias com mais precisão do que no ambiente aquático (SCHWASSMANN e KRUGER 1965).

Os resultados de Albensi e Powell (1998), assim como de Saidel e Fabiane (1998), claramente mostraram que a OPM existe no *Anableps* e que a magnitude desta resposta depende do campo de visão testado, sendo a OPM mais evidente a partir da estimulação do ambiente visual aéreo. Albensi e Powell (1998) observaram também que a oclusão da pupila dorsal aumenta a OPM evocada pelo ambiente aquático, o que levou estes autores a discutirem a possibilidade de uma modulação central ao nível do tecto óptico sobre a OPM do campo visual aquático. O mapeamento dos campos receptores visuais ativados pelos campos visuais aéreo e aquático foi realizado no tecto óptico do *Anableps microlepis* por Schwassmann e Kruger (1965). De acordo com estes autores, uma maior representação retinotópica foi observada em relação à retina ventral, principalmente na região central ao longo do meridiano horizontal, alinhada com o eixo visual que coincide com a linha da água.

O sistema visual de peixes é também influenciado por um controle eferente originado de núcleos cerebrais. Alguns autores descrevem que os 12 pares de nervos cranianos clássicos têm um componente adicional, que foi reconhecido em peixes antes do início do século XX

(FRITSCH, 1887; PINKUS, 1894 *apud* MEYER, *et al.*, 1996). O “novo” nervo é localizado rostralmente ao nervo olfatório e supostamente, possui funções quimiossensoriais (DEMSKI e NORTHCUTT, 1983). Foi designado nervo terminal (LOCY, 1905 *apud* MEYER *et al.*, 1996) e um de seus componentes foi descrito para inervar a retina de *teleósteos*. Esta projeção olfato-retinal expressa um hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) (MÜNZ *et al.*, 1982), o qual segundo alguns autores é utilizado para transportar informações sobre feromônios e para ser envolvido no controle do comportamento reprodutivo (revisão em MEYER, *et al.*, 1996). De acordo com MEYER, *et al.*, (1996), a projeção retinopetal do nervo terminal encontra-se presente nas porções dorsal e ventral da retina do *Anableps anableps* sendo que a grande maioria das fibras projetam para o olho contralateral. Nas proximidades do disco óptico, as fibras se ramificam e invadem todas as regiões da retina ventral e dorsal. Em ambas regiões, número semelhante de fibras imunorreativas deslocam-se ao longo da camada plexiforme interna e a camada nuclear interna. Em todas as partes da retina, as fibras imunorreativas apresentam numerosas varicosidades. Ainda neste mesmo trabalho, não foram observadas diferenças óbvias na organização das projeções para as duas porções da retina entre machos e fêmeas, como também entre adultos e jovens.

A presença de um nervo terminal bem desenvolvido no sistema de projeção olfato-retinal do *A. anableps* (MEYER *et al.*, 1996), estimulou o interesse de Jadhao e Pinelli (2001) para estudar, através de métodos imunohistoquímicos, a localização de galanina como peptídeo no cérebro e pituitária deste peixe. Tais estudos detectaram a presença de imunorreatividade à galanina nestas estruturas e indicaram que este peptídeo pode atuar como um neuromodulador no eixo hipotálamo-hipofisário.

1.4 - JUSTIFICATIVA

A distribuição topográfica da densidade de células ganglionares, examinada através de montagens planas da retina, possibilita a identificação das várias especializações retinianas presentes num dado indivíduo ou espécie.

O peixe *Anableps*, pela capacidade incrível de visão simultânea na água e no ar, apresenta-se como um modelo bastante interessante a ser pesquisado, e os estudos até então desenvolvidos sobre o sistema visual desse animal, estão muito mais voltados para as especializações ópticas que ele apresenta, com exceção dos trabalhos de Schwassmann e Kruger (1965), que fizeram um mapeamento eletrofisiológico no seu tecto óptico, e dos pesquisadores Saidel e Fabiane (1998) e Albensi e Powel (1998), que estudaram a resposta optomotora. Análise da estrutura retiniana foi realizada apenas em secções transversais. No presente estudo, investigamos alguns parâmetros anatômicos e fisiológicos dos componentes ópticos e neurais do olho de animais adultos. Acreditamos que a identificação dos tipos de especialização retiniana, bem como a análise das populações neuronais presentes nas duas hemi-retinas, associados à caracterização do padrão de vascularização e dos limites anatômicos relacionados ao crescimento ocular, poderão contribuir para a compreensão de mecanismos funcionais relacionados a um ganho diferenciado em sensibilidade e em resolução nas hemi-retinas do *Anableps*. As análises destes parâmetros poderão servir de subsídios a futuros estudos na determinação da acuidade visual desse animal.

Uma outra expectativa do nosso trabalho é poder contribuir, dentro da linha de pesquisas em Neurofisiologia Comparada, para o conhecimento de mecanismos neurais envolvidos com a evolução do sistema visual, principalmente considerando a flexibilidade adaptativa deste sistema às demandas comportamentais, independente da posição de cada espécie na escala filogenética.

II.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as características morfo-funcionais do olho e os tipos de especializações neurais definidas pela distribuição da densidade de células ganglionares nas hemi-retinas dorsal e ventral do peixe de quatro-olhos *Anableps anableps*.

II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar parâmetros morfo-funcionais gerais do olho e das hemi-retinas dorsal e ventral;
2. Descrever o padrão de distribuição topográfica dos vasos hialóides e correlacioná-lo com as especializações retinianas
3. Investigar a presença de características oculares que permitam o ganho em sensibilidade;
4. Analisar a distribuição topográfica de densidade de neurônios presentes na camada de células ganglionares das hemi-retinas dorsal e ventral;
5. Estimar o número total de neurônios da camada de células ganglionares;
6. Analisar as populações neuronais presentes na camada de células ganglionares quanto ao espectro de tamanho dos corpos celulares em diferentes excentricidades de cada hemi-retina;
7. Investigar o grau de similaridade entre as populações neuronais observadas nas hemi-retinas dorsal e ventral.

III REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBENSI, B. C., e POWELL, J. H. The differential optomotor response of the four-eyed fish *Anableps anableps*. **Perception**, n. 27, p. 1475-1483, 1998.

ALI, M. A. Adaptations rétiniennes aux habitats, **Revue Canadienne de Biologie**, v. 40, n.1, p. 3-17, 1981.

ARIENS-KAPPERS, C. U.; HUBER, G. C. e CROSBY, E. C. **The Comparative Anatomy of the Central Nervous System of Vertebrates, Including Man**. Hafner, New York, 1936, reprinted 1960.

ARRUGA, H. O olho do quatrolhos. Barcelona, 1941, pp.1-15. Cited by Duke-Elder S. **System of Ophtalmology**,: The eye in Evolution. Kimpton, London, (1958), Volume I.

ARTEDI, P. Seba's Rerum naturalium thesauri descriptione. **Amstel.**, 3, 1758.

BARTHELD, C. S. e MEYER, D. L., Comparative neurology of the optic tectum in ray-finned fishes: patterns of lamination formed by retinotectal projections. **Brain Research**, n. 420, p. 277-288, 1987.

BORWEIN, B., e HOLLENBERG, M. J. The Photoreceptors of the "Four-eyed" Fish, *Anableps anableps* L. **Journal of Morphology**, n. 140, p. 405-442, 1973.

BOZZANO, A. e COLLIN, S. P., Retinal ganglion cell topography in elasmobranchs. **Brain, Behavior and Evolution**, n. 55, p. 191-208, 2000.

BRAVO, H., e PETTIGREW, J. D. The distribution of neurons projecting from the retina and visual cortex to the thalamus and tectum opticum of the barn owl, *Tyto alba*, and the burrowing owl, *Speotyto cunicularia*. **Journal of Comparative Neurology**. n.199, p. 419-441, 1981.

BROWN, K. T. A linear área central extending across the turtle retina and stabilized to the horizon by non-visual cues. **Vision Research**, n. 9, p. 1053-1062, 1969.

BUTCHER, E. O. The structure of the retina of *Fundulus heteroclitus* and the regions of the retina associated with the different chromatophoric responses. **Journal of Experimental Zoology**, n. 79, p. 275-293, 1938.

CHIEVITZ, J. H. Untersuchungen über die Área central retinae. **Archiv fur Anatomie und Physiologie**, p. 139-194, 1889.

_____. Über das Vorkommen der Area centralis retinae in den vier höheren Wirbelthierklassen. **Archiv fur Anatomie und Physiologie**, p. 311-333, 1891.

COLLIN, S. P. Specialisations of the teleost visual system: adaptive diversity from shallow-water to deep-sea. **Acta Physiologica Scandinavica**, n. 161, p. 5-24, 1997.

_____. Behavioural ecology and retinal cell topography. In: **Adaptive mechanisms in the ecology of vision** (ed. S. N. Archer, M. B. A. Djamgoz, E. R. Loew, J. C. Partridge, S. Vallerger), London: Kluwer Academic Publishers, pp. 509-535, 1999.

COLLIN, S. P. e NORTHCUTT, R. G. The visual system of the Florida garfish, *Lepisosteus platyrhincus* (ginglymodi): III. Retinal ganglion cells. **Brain Behavior and Evolution**, n.42: p.295-320, 1993.

COLLIN, S. P. e PETTIGREW J. D. Retinal topography in reef teleosts. I. Some species with well-developed areae but poorly-developed streaks. **Brain Behavior and Evolution**, n. 31: p. 269-282, 1988a.

_____. Retinal topography in reef teleosts. II. Some species with proeminent horizontal streaks and high-density areae. **Brain Behavior and Evolution**, n. 31, p. 283 - 295, 1988b.

_____. Retinal ganglion cell topography in teleosts: A comparison between Nissl-stained material and retrograde labelling from the optic nerve. **The Journal of comparative Neurology**, n. 276, p. 412-422, 1988.

_____. Quantitative comparison of the limits on visual spatial resolution set by the ganglion cell layer in twelve species of reef teleosts. **Brain Behavior and Evolution**, n. 34, p. 184-192, 1989.

COSTA, W. J. E. M., Phylogeny and classification of the cyprinodontiformes (Euteleostei: Atherinomorpha): a reappraisal. Reprinted from: **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Malabarba, L.R., R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M. Lucena & C.A.S. Lucena, (eds). Porto Alegre, Edipucrs, 1998. 603p.

DEMSKI, L. S. e NORTHCUTT, R. G. The terminal nerve: a new chemosensory system in vertebrates?, **Science**, n. 220, p. 435-437, 1983.

DOUGLAS, R. H., e HAWRYSHYN, C. W. Behavioural studies of fish vision: an analysis of visual capabilities. In: Douglas RH, Djamgoz MBA, editors. **The visual system of fish**. London: Chapman and Hall, p. 373-418, 1990.

DOUGLAS, R. H., COLLIN, S. P. e CORRIGAN, J., The eyes of suckermouth armoured catfish (Loricariidae, subfamily Hypostomus): pupil response, lenticular longitudinal spherical aberration and retinal topography. **The Journal of Experimental Biology**, n. 205, p. 3425-3433, 2002

DUKE-ELDER S. System of Ophtalmology. Vol. I: **The Eye in Evolution**. Kimpton, London, 1958.

EASTMAN, J. T. e LANOO, M. J. Anatomy and histology of the brain and sense organs of the Antarctic Plunderfish *Dolloidraco longedorsalis* (Perciformes: Notothenioidei: Artedidraconidae), with comments on the brain morphology of other Artedidraconids and closely related Harpagiferids. **Journal of Morphology**, n. 255, p. 358-377, 2003.

ENGSTRÖM, K. Cone types and cone arrangements in teleost retinæ. **Acta Zoological of Stockh**, n. 44: p. 179-243, 1963.

FERNALD, R. D. The evolution of eyes. **Brain Behavior and Evolution**, n. 50, n. 4, p. 253-259, 1997.

FRISEN, L., e FRISEN, M. A simple relationship between the probability distribution of visual acuity and the density of retinal output channels. **Acta Ophthalmologic**, n. 54, p. 437-443, 1976.

FRITSCH, G. Untersuchungen über den feineren bau des fischgehirns mit besonderer berücksichtigung der homologien bei anderen wirbeltierklassen, Verlag der Gutmannschen buchhndlung, Berlin, 1887.

GOODLAND, H. The ustrastructure of the inner plexiform layer of the retina of *Cottus bubalis*. **Experimental Eye Research**, n. 5, p. 198-200, 1966.

GRAHAM, J. B., e ROSENBLATT, R. H. Aerial vision: unique adaptation in na intertidal fish. **Science**, n. 168, p. 586-588, 1970.

GRASSÉ, P-P., **Traité de zoologie, anatomie, systématique, biologie**. Paris: Masson et C^{ie}, Tome XIII, fascicule I, 1957.

HARDEN-JONES F. R.: The reaction of fish to moving backgrounds. **Journal of Experimental Biology**, n. 40, p. 437-446, 1963.

HERIC, T. M., e KRUGER, L. Organisation of the visual projection upon the optic tectum of a reptile (*Alligator mississippiensis*). **Journal of Comparative Neurology**, n. 124, p. 101-111, 1965.

HUGHES, A. **The topography of vision in mammals of contrasting life style: comparative optics and retinal organisation**. Australian: National University, 1977. Vol. VII

INOUGE, K. e NOTO, S. "Structure of the retina in *Anableps* (four-eyed fish)". **Zoological Magazine**, n. 71, p. 188, 1962.

ITO, H. e MURAKAMI T. Retinal ganglion cells in two teleost species, *Sebasticus marmoratus* and *Navodon modestus*. **Journal of Comparative Neurology**, n. 229, p. 80-96, 1984.

JACOBSEN, M. The representation of the retina on the optic tectum of the frog. Correlation between retinotectal magnification factor and retinal ganglion cell count. **Journal of Experimental Physiology**, n.47, p. 170-178, 1962.

JADHAO, A. e PINELLI, C. Galanin-like immunoreactivity in the brain and pituitary of the "four-eyed" fish, *Anableps anableps*. **Cell Tissue Research**, n. 306, p. 309-318, 2001.

KAHMANN, H. Über das vorkommen eiiner fovea centralis im knochenfischeauge. **Zoologischer Anzeiger**, n.106, p. 49-55, 1934.

KAHMANN, H. Über das foveale sehen der Wirbeltiere. II Gesichtsfeld und Fovea centralis. **Sitzungsberichte der Gesellschaft Naturforschender Freunde Zur Berlin**, p. 361-376, 1935.

KISHIDA, R. Comparative study on the teleostean optic tectum. Lamination and cytoarchitecture. **Journal fur Hirnforschung**, n. 20, p. 57-67, 1979;.

KLEE, A. J. *Anableps*, the four-eyed fish. **The Aquarium**, n. 12, p. 42-48, 1968;.

KNOWLES, F., VOLLRATH, L., e NISHIOKA, R. S. Air and water vision of the atlantic flying fish, *Cypselurus heterururs*. **Nature**. London, n. 214, p. 307-309, 1967.

LEGHISSA, S. La struttura microscopica e la citoarchitettonica del tetto ottico dei pesci teleostei. **Zeitschrift fur Anatomie und Entwicklungsgeschichte**, n. 118, p. 427-463, 1995.

LOCY, W.A.: On a newly recognized nerve connected with the forebrain of selachians, **Anatomischer Anzeiger**, n. 26, p. 33-63, 1905.

MEEK, J., A Golgi-electron study of goldfish optic tectum. I. Description of afferents, cell types and synapses, **Journal of Comparative Neurology**, n. 199, p. 149-173,1981.

_____. Functional anatomy of the tectum mesencephali of the goldfish. An explorative analysis of the functional implications of the laminar structural organization of the tectum. **Brain Research**, n. 6, p. 247-297, 1983.

MELZER, P. e POWERS, M. K. Metabolic activity in optic tectum during regeneration of retina in adult goldfish. **Visual Neuroscience**, n. 18, p. 599-604, 2001.

MEYER, D. L., MALZ, C. R., e JADHAO, A. G. Nervus terminalis projection to the retina in the 'four-eyed' fish, *Anableps anableps*. **Neuroscience Letters**, n. 213, p. 87-90, 1996.

MIRTO, D. Sulla fina anatomia del tetto ottico dei pesci teleostei, Riv. Sper. Frenatria **Medicine Legale**, n. 21, p. 136-148, 1895.

MIYAZAKI, T.; IWAMI, T.; SOMIYA, H. e MEYER-ROCHOW, V. B. Retinal topography of ganglion cells and putative UV-sensitive cones in two Antarctic fishes: *Pagothenia borchgrevinki* and *Trematomus bernacchii* (Nototheniidae). **Zoological Science**, n. 19, p. 1223-1229, 2002.

MUNK, O. The eye of the "four-eyed" fish *Dialommus fuscus* (Pisces, Blennioidei, Clinidae). Vidensk. **Meddr dansk naturh. Forenh**, n. 132, p. 7-24, 1969.

MUNK, O. On the occurrence and significance of horizontal band-shaped retinal areae in teleosts. Videnki. **Meddr dansk naturh. Forenh**, n. 133, p. 85-120, 1970.

MÜNZ, H., CLAAS, B. E., STUMPF, W. E., e JENNES, L.: Centrifugal innervation of the retina by luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-immunoreactive telencephalic neurons in teleostean fishes, **Cell Tissue Research**, n. 222, p. 313-323, 1982.

NEUHAUSS, S. C. Behavioral genetic approaches to visual system development and function in zebrafish, **Journal of Neurobiology**, n. 54, p.148-60, 2003.

NORTHCUTT, R. G. Evolution of the optic tectum in ray-finned fishes. In R. E. Daves and R. G. Northcutt (Eds.), **Fish Neurobiology, Higher Brain Areas and Functions**, The University of Michigan Press, Ann Arbor, p. 1-42, 1983. Volume 2.

PINKUS, F. Über einen noch nicht beschriebenen hirnnerven des Protopterus annectens, **Anatomischer Anzlinger**, n. 9, p. 562-566, 1894.

PRINCE, J. H. **Comparative Anatomy of the Eye**. Thomas. Springfield. 1956. Volume III.

PUMPHREY, R. J. The theory of the fovea. **Journal of Experimental Biology**, n. 25, p. 299-312, 1948.

PUSHCHNIN, I. I. e KONDRASHEV, S. L. Biplexiform ganglion cells in the retina of the perciform fish *Pholidapus dybowskii* revealed by HRP labeling from the optic nerve and optic tectum. **Vision Research**, n. 43, p. 1117-1133, 2003.

RAMON, P. El lobulo optico de los pecos (teleostei). **Revta. Trimest. Microgr**, n. 4, p. 87-107, 1899.

REICHENBACK, A. e ROBINSON, S. R. Phylogenetic constraints on retinal organization and development. **Progress in Retinal and Eye Research**, n. 15, p. 139-168, 1995.

RODIECK, R. W. **The vertebrate retina: Principles of structure and function** Freeman, San Francisco, 1973.

ROLLS, E. T., e COWEY, A. Topography of the retina and striate cortex and its relationship to visual activity in rhesus monkey and squirrel monkeys. **Experimental Brain Research**, n. 10, p. 298-310, 1970.

ROWE, M. H., e STONE, J. Conduction velocity groupings among axons of cat retinal ganglion cells, and their relationship to retinal topography. **Experimental Brain Research**, n. 25, p. 339-357, 1977.

SAIDEL, W. M., e FABIANE, R. S. Optomotor response of *Anableps anableps* on the field of view. **Vision Research**, n. 38, p. 2001-2006, 1998.

SCHMATOLLA, E. Dependence of tectal neuron differentiation on optic innervation in teleost fish. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, n. 27, p. 555-576, 1972.

SCHNEIDER-V. ORELLI, M. Untersuchungen über das Auge von *Anableps tetrophtalmus*. **Mitteilungen der naturforschenden Gesellschaft in Bern**, p. 87-113, 1907.

SCHULTZE, M. Zur anatomie und physiologie der retina. **Archiv für Mikroskopische Anatomie**, n. 2, p. 175-286, 1866. (citado em Hughes, 1977).

SCHWAB, I. R.; HO, V.; ROTH, A.; BLANKENSHIP, T. N. e FITZGERALD, P. G. Evolutionary attempts at 4 eyes in vertebrates. **Transactions American Ophthalmological Society**, n. 99, p. 145-156, 2001.

SCHWASSMANN, H. O. Visual projection upon the optic tectum in foveate marine teleosts. **Vision Research**, n. 8, p. 1337-1348, 1968.

SCHWASSMANN, H. O., e KRUGER, L. Experimental analysis of the visual system of the four-eyed fish *Anableps microlepis*. **Vision Research**, n. 5, p. 269-281, 1965.

SHAND, J.; CHIN, S. M.; HARMAN, A. M. e COLLIN, S. P. The relationship between the position of the retinal area centralis and feeding behaviour in juvenile black bream *Acanthopagrus butcheri* (Sparidae: Teleostei), **Philosophical Transactions of the Royal Socociety of London**, n. 355, p. 1183-1186, 2000.

SHINOZUKA, K e WATNABE, S. Effects of telencephalic ablation on shoaling behavior in goldfish. **Physiological Behavior**, n. 81, p. 141-148, 2004.

SINGH, H. R., e KHANNA, S. S. The cytoarchitecture and the fibre connections of the optic tectum of some teleosts. **Bonner Zoologische Beiträge**, n. 16, p. 129-140, 1970.

SIVAK, J. G. Optics of the eye of the “Four-eyed fish” (*Anableps anableps*). **Vision Research**, n. 16, p. 531-534, 1976.

SLONAKER, J. R. A comparative study of the area of acute vision in vertebrates. **Journal of Morphology**, n. 13, p. 445-492, 1897.

SOEMMERRING, D. W. De oculorum hominis animaliumque Goettingen, v. 68, 1818.

SPRINGER, A. D., e MEDNICK, A. S. Retinofugal and retinopetal projection in the cichlid fish *astronotus ocellatus*. **Journal of Comparative Neurology**, n. 236, p. 179-196, 1985.

STELL, W. K. Correlated light and electron microscope observations on Golgi preparations of goldfish retina. **Journal of Cell Biology**, ano 23, v. 89, 1964

STELL, W. K. Correlation of retinal cytoarchitecture and ultrastructure in Golgi preparations. **Anatomical Record**, n. 153, p. 389-398, 1965.

_____. The structure and relationships of horizontal cells and photoreceptor-bipolar synaptic complexes in goldfish retina. **American Journal of Anatomy**, n. 121, p. 401-424, 1967.

STIEDA, L. Studien über das centrale Nervensystem der Knochenfische, Zeitschr. Wissensch. **Zool.**, n. 18, p. 1-70, 1868.

STONE, J. A quantitative analysis of the distribution of ganglion cells in the cat retina. **The Journal of Comparative Neurology**, n. 124, p. 337-352, 1965.

_____. **The Whole Mount Handbook**. Sidney: Maitland Publications Pty. Ltda, 1981 127p.

SWAMYNATHAN, S. K.; CRAWFORD, M. A.; ROBISON, W. G. Jr., KANUNGO, J. e PIATIGORSKY J. Adaptive differences in the structure and macromolecular compositions of the air and water corneas of the “four-eyed” fish (*Anableps anableps*), **The FASEB Journal**, n. 17, p. 1996-2005, 2003.

TANCRED, E. The distribution and sizes of ganglion cells in the retinas of five Australian marsupials. **Journal of Comparative Neurology**, n. 196, p. 585-603, 1981.

VANEGAS, H. Organization and physiology of the teleostean optic tectum. In R. E. Davis and R. G. Northcutt (Eds.), **Fish Neurobiology, Vol. 2, Higher Brain Areas and Functions**, The University of Michigan Press, Ann Arbor, pp. 43-90, 1983.

VANEGAS, H. e ITO, H. Morphological aspects of the teleostean visual system: a review. **Brain Research**, n. 6, p. 117-137, 1983.

VANEGAS, H., EBBESSON, S. O. E. e LAUFER, M. Morphological aspects of the teleostean optic tectum. In H. Vanegas (Ed.), **Comparative Neurology of the Optic Tectum**, Plenum, New York, pp. 93-120, 1984.

VILLEGAS, G. M. Electron microscopic study of the vertebrate retina. **Journal of General Physiology**, n. 43, p. 15-43, 1960.

_____. Comparative ultrastructure of the retina in fish, monkey and man. In: **The visual system: Neurophysiology and Psychophysics**. Springer-Verlag, Berlin, p. 3-13, 1961.

VILLEGAS, G. M., e VILLEGAS, R. Neuron-glia relationship in the bipolar cell layer of the fish retina. **Journal of Ultrastructure Research**, n. 8, p. 89-106, 1963.

WAGNER, H.-J., FRÖHLICH, E., HEGISHI, K. e COLLIN, S. P., The eyes of Deep-Sea fish II. Functional Morphology of the retina. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 17, n. 4, p. 637-685, 1998.

WALLS, G. L. **The vertebrate Eye and Its Adaptive Radiation**. New York: Hafner Press, 1942.

WÄSSLE, H. e BOYCOTT, B.B. Functional architecture of the mammalian retina. **Physiological Reviews**, n. 71, p. 447-480, 1991.

WU, S.M. Feedback connections and operation of the outer plexiform layer of the retina. **Current Opinion in Neurobiology**, n. 2, p. 462-468, 1992.

WINKELMANN, E. e WINKELMANN, L. Vergleichend histologische untersuchungen zur funktionellen morphologie des tectum opticum verschiedener teleostier. **Journal fur Hirnforschung**, n. 10, p. 1-16, 1968.

IV. MANUSCRITO A SER SUBMETIDO À REVISTA

Brain Behavior and Evolution

TOPOGRAPHIC ANALYSIS OF THE GANGLION CELL LAYER IN THE “FOUR-EYED” FISH *Anableps anableps*

Francisco Gilberto Oliveira¹, João Paulo Coimbra², Elizabeth Sumi Yamada², Luciano Fogaça de Assis Montag³, Francyllena S. Nascimento³, Valéria A. Oliveira³, Diógenes Luís da Mota⁴, Alexandre Motta Bittencourt⁵, Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa^{6*}

¹Departamento de Biologia, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Regional do Cariri, URCA, Crato, CE; ²Laboratório de Neuropatologia Experimental, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, UFPA; ³Museu Paraense Emílio Goeldi, ⁴Departamento de Histologia e Embriologia, ⁵Departamento de Anatomia, ⁶Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, PE, Brasil.

Running title: **Retinal topography in freshwater fishes**

Text pages: 25

Figures: 06

Tables: 03

Key Words: Retinal ganglion cells, Vision, Visual Streak, Choroidal Tapetum, Lens

Corresponding author:

Dr. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa

Laboratório de Neurofisiologia

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, CCB, UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária

50670901 Recife, PE, Brasil.

Phone: 55-81- 21268530 FAX: 55-81-21268350 and 21268500

E-mail: bl@ufpe.br

Abstract

The visual system represents an essential link between an animal and its surroundings with profound influence on its adaptive behaviour in diverse types of habitats. Fishes of the genus *Anableps* have eyes each containing two corneas, two pupillary apertures, an egg-shaped lens and one divided retina, which allow simultaneous aerial and aquatic sight. The present study investigated anatomical and functional parameters of optical and neural components involved in the gain in resolution and sensitivity of the *Anableps anableps* eye. Using retinal whole mount, comparative and quantitative analysis of the dorsal and ventral hemi-retinas were performed with emphasis on the types of specialisations which are defined by the topographical distribution of neuronal density in the ganglion cell layer and which classes of cell populations according to soma size are present in these hemiretinas. Measurements of the ocular and lens dimensions were performed in 08 specimens and retinal whole mounts were made from eyes of 13 animals, with corporal length ranging from 14 to 17.5 cm. The results indicated an asymmetry in the lens dimensions similar in magnitude order to that described for young animals and an asymmetric growth of the eye. A choroidal tapetum was visualised over the total extension of the eye in light-adapted animals. A prominent horizontal visual streak with peak of cell density corresponding to $18,286 \pm 3,162$ cells/mm² was detected in the central region of the ventral hemiretina. A small area with maximum density of $5,500 \pm 602$ cells/mm² was observed in some specimens in the temporal periphery of the dorsal hemiretina. The relative frequency of ganglion cell soma size suggests also that distinct cell populations are present in each retina. The data indicate that distinct retinal sampling and resolution to aerial and aquatic visual fields and support the presence of optic and retinal specialisations to optimize the feeding and behavioural strategies adopted by *Anableps* at low or high levels of luminosity.

Introduction

The information provided by vision is an important link between an animal and its surroundings and probably might be associated with adaptive behaviour and life-style. During the long process of evolution, animals may have evolved visual mechanisms that are particularly suited to specific visual tasks (reviews in Duke-Elder, 1958; Hughes, 1977; Ali, 1981; Collin, 1999). Among fishes, some species present special peculiarities in their visual system which seems to represent an evolutionary attempt towards an amphibious eye (Schwab et al., 2001). The “four-eyed” fishes of the genus *Anableps*, family Anablepidae, order Cyprinodontiformes, are native to brackish rivers and estuaries from southern Mexico to Northern South America, and actually have only two eyes. Each eye in *Anableps* is divided into upper and lower halves internally and externally with two distinct optical systems: an upper one for aerial vision and a lower one for aquatic vision, characterised by two distinct corneas and pupil apertures, an egg-shaped lens, two distinct hemi-retinae, but only one optic nerve. (Arruga, 1941; Swamynathan *et al.*, 2003). The lens and cornea specialisations compensate for the two distinct refractive optic media and permit simultaneous focus in both air and water when the fish is at the water surface (Sivak, 1976; Swamynathan *et al.*, 2003). This peculiar dual visual system allows *Anableps* to feed on insects in the air and on small fishes and invertebrates that swim below or on the water surface, or to escape from flying predators attacking from above (Zahl et al., 1977). A few studies have been developed in order to investigate physiological characteristics of this amphibious visual system. It has been described that *Anableps anableps* (Linnaeus, 1758) show a stronger optomotor response to visual stimulation from the aerial environment (Albensi and Powell, 1998; Saidel and Fabiane, 1998). It has also been demonstrated that the aerial vision system of *Anableps microlepis* (Müller & Troschell, 1844) has smaller receptive fields in the optic tectum than the

aquatic sight system and that a horizontal band above the waterline in the aerial visual field has a greatly magnified projection on this mesencephalic region. (Schwassmann and Kruger, 1965). Analysis of retinal transverse sections indicated that the ventral hemiretina has about twice as many cones and thicker inner nuclear and ganglion cell layer (GCL) than the dorsal hemiretina in both *Anableps anableps* [Inouge and Noto, 1962; Borwein and Hollenberg, 1973; Schwab et al., 2001] and *Anableps microlepis* [Schwassmann and Kruger, 1965]. Taken together, these studies suggest the existence of different retinal sampling strategies for the aerial and aquatic visual fields. Nevertheless, no quantitative analysis of the topography of neurons in the retinal GCL had been carried out so far.

The topographic distribution of neurons in the GCL reveals specialisations that indicate how the visual world is sampled by the retina, yielding valuable information on the relative contribution of vision in the animal behaviour and ecology (reviews in Hughes, 1977; Collin, 1999). Among fishes, the presence of retinal specializations, such as a fovea, a visual streak and a central area have been described in conjunction or alone in several species (review in Collin, 1997; 1999). Each one of these specializations has been associated with particular feeding strategies adopted by a species in its ecological niche and also with the development of the optic tectum, the movement perception and optomotor response (Ito and Murakami, 1984; Collin and Pettigrew, 1988a, b; Collin, 1997, 1999; von Bartheld and Meyer, 1987). Thus, the retinal specialisation in one species seems to correlate with the visual strategies important for survival and is also reflected centrally in the areas involved in visual perception.

The present study investigated anatomical and functional parameters of the optic and neural components involved in the resolution and sensitivity gain of the *Anableps anableps* eye. By using retinal whole mount preparations, a comparative and quantitative analysis of the dorsal and ventral hemiretina was performed. The emphasis was focused on which types of

retinal specialisations are revealed by the topographical distribution of neuronal density in the GLC. Moreover, we described the variation in neuronal soma size in central and peripheral eccentricities. Considering the anatomical design of the eye, the orientation of the visual axes along the dorsal and ventral pupils and the feeding strategies adopted by *Anableps anableps*, it was hypothesised that the regions with highest neuronal density in dorsal and ventral hemiretinae could be distinct and have a differential representation along the central and peripheral eccentricities of their respective visual fields.

Materials and Methods

Animals

Twenty two adult specimens of *Anableps anableps*, 12 males (14.5-17 cm in standard body length, SL) and 10 females (14-20.5 cm in SL) were used in this study. The animals were captured in the Maracanã River of an Amazonian estuary 168 km far Belém, Brazil. Taxonomic identification was performed at the Museu Emílio Goeldi, Belém. Most of the fishes were captured during the day and some at night. After capture they were immediately transferred to containers where body morphometric parameters were analyzed. After standard body length (SL) measurements were taken, (distance between the snout and caudal peduncle) the fishes were freshly euthanized by decapitation. The heads were fixed by immersion in paraformaldehyde 4% (in phosphate buffer 0.1 M) for 3 hours. Other segments of the body were used for experiments unrelated to this study, where no anesthesia could be used for to sacrificing the animals. All experiments were performed in accordance with the principles regarding the care and use of animals adopted by the Institutional Animal Care and Use Committee of the *Centro de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Pernambuco*.

Morphometric Analysis of the Eye, Lens and Preparation of Retinal Whole mounts for Nissl Staining

After the fixation period, the heads were rinsed in phosphate buffer (PB) 0.1 M. The eyes were enucleated and their equatorial and axial diameters were measured ($n = 22$). The lenses were removed and their diameters along the dorsal and ventral pupillary axes were measured in 08 specimens (4 with 15.5-17.5 cm and 4 with 18.5-20.5 cm in SL). All these measurements were made under a stereoscopic microscope (D. F. Vasconcelos; São Paulo, Brazil) with the aid of a calliper. The iris flaps separating the two pupillary apertures were used as external reference to establish orientation along naso-temporal and dorso-ventral axes of the eye. In fifteen animals (6 males and 9 females) retinal whole mount preparations were performed according to the procedure described by Stone (1981). In two males and one female both eyes were analysed in order to compare the inter-eye variability in morphometric the parameters. During this preparation, the retinal orientation was confirmed considering some peculiarities that distinguish the dorsal and the ventral portions of the retina (e.g. choroidal gland behind ventral hemiretina). After the removal of the retinal pigment epithelium, peripheral slits were made to allow the retina, GLC uppermost, to be flatted onto gelatinized microscope slides. Immediately after this step, the whole mounts were digitized. The retinae were dried by exposure to hot (60° C) formaldehyde vapours for 2 h and then were stained for 5 minutes in 0.5 % cresyl violet at room temperature, dehydrated, cleared and coverslipped. After this, the whole mounts were again scanned for posterior area measurement used to estimate the areal shrinkage. Only those retinae with shrinkage inferior to 10% were analysed. The area measurements were carried out by using the software Scion Image for Windows, Release Beta: 4.0.2 (NIH-USA, 2000).

In six animals the eyes were fixed in Bouin's fixative (24 h), dehydrated in ethyl alcohol solutions in crescent order (70 – 100%) and embedded in paraffin. Transverse sections were cut at 5 μm thickness on a Jung AG Heidelberg (German) microtome. Sections were stained with Gomori trichrome, or Hematoxylin-Eosin.

Analysis of Retinal Whole Mounts (Nissl Staining)

The outline of each retinal whole mount preparation was recorded on 1 cm^2 grid paper at a magnification of 20 in order to define areas for counting at an overall magnification of 2,000. A light microscope Olympus BX50, coupled to a Samsung digital camera (model SHC410NAD), was used to obtain digitized images of the GCL at 0.5 mm intervals throughout the retina. In areas of higher cell density the images were obtained every 0.25 mm on the retina.

Cell counts were performed using the software Ulead PhotoImpact 3.0 Special Version, and a painting tool was employed to mark each counted cell. Cell counts were not undertaken where shrinkage was localised, such as near the retinal margins and along the edges of the radial cuts. All data were transferred to the maps and converted to cells per mm^2 . Between 259 and 375 areas per retina were sampled. Isodensity contours were constructed by interpolation between the values of cell density. All recognizable neurons within the GCL were counted according to the criteria described by Stone [1981] to distinguish presumed ganglion cells and amacrine cells from neuroglia in Nissl-stained retinae. The total number of neurons within the GCL was obtained after the sum of the neuronal number within each isodensity contour. The latter was estimated by multiplying the area of the contour by its average cell density.

The soma size of Nissl-stained neurons within the GCL was analysed at central and peripheral eccentricities along the dorsal and ventral hemiretinae. At least 100 cells were measured from digitized images of each selected region. Cell soma perimeters were outlined

and area and diameter calculations were generated for each cell using Scion® Image for Windows software, Release Beta: 4.0.2 (NIH-USA, 2000).

The approach adopted in the present study assumed that retinal specialisations defined by the topographic distribution of all putative neurons in the GCL of several fishes are equivalent in shape and position to the ones based on ganglion cell counts by retrograde labeling [Ito and Murakami, 1984, Collin and Pettigrew, 1988a, b; Collin and Pettigrew, 1989; Collin and Northcutt, 1993; Shand *et al.*, 2000]. For this reason, the regional cell densities and the total number of neurons herein obtained should be considered as upper limits on the visual capabilities and future studies by using retrograde labeling are necessary to verify the percentage of displaced amacrine cells present in our quantitative analysis.

Statistical analysis of data was carried out using Shapiro Wilk's W test, Student's *t*-test, and ANOVA, followed by *post hoc* Tukey test when indicated. Statistical significance was accepted at the 95% confidence level ($\alpha = 0.05$).

Results

Animal Size, Ocular and Retinal Dimensions

The body size, ocular and retinal dimensions obtained in 12-22 animals are expressed in **Table 1**. As can be seen, the axial length of the eye is smaller than its equatorial diameter both in animals with 14-17.5 cm (about 9%) and with 18.5-20.5 of SL (about 18 %). No significant difference in these ocular parameters was observed between males ($n = 16$) and females ($n = 6$). The entire retinal surface area measured from whole mount preparations did not differ according to gender and ranged from 58.65 to 86.90 mm² in animals with 15.5-17.5 cm of SL ($n=12$), and from 71.76 to 94.98 mm² in animals with 18.5-20.5 cm SL ($n = 6$). The intraocular measurements showed a similar range on asymmetry in the lens dimensions in

animals with 15.5-17.5 cm or with 18.5-20.5 cm in SL. The ratio between the lens diameter along the dorsal pupil axis (water) and ventral pupil axis (air) was on the average 1:1.16 (range: 1:1.13-1:1.21). The average values of the lens diameter along the dorsal pupil axis and ventral pupil axis are showed in **table 1**.

Anatomical Limits and Features of Dorsal and Ventral Retinae

The anatomical limits of dorsal and ventral hemiretinae were estimated considering distinctive features observed in the outer and innermost surface of the retina. In light-adapted eyes, a tapetum was visualised outside the neural retina-retinal epithelial complex towards the scleral side of the eye overall the extension of the dorsal and ventral regions. The appearance of this reflective layer was silvery. In some specimens was better visualised along the ventral region (**fig 1A**) whereas in the dorsal region the tapetum had a more golden appearance. In dark-adapted eyes an expressive silver-shine eye was detected through the dorsal and ventral pupils (not shown), but not from the scleral side (**fig. 1B**).

In all retinae there was a horizontal band along the midline across the optic papilla, characterised by an expressive thickening of the optic fiber layer (OFL) and a reduced number of neurons in the GCL. This band extended about 2-3 mm from the optic papilla towards the nasal and temporal retinal regions. The centre of this band coincides with the limit between dorsal and ventral portions of the retina **Figures 2** illustrates 6 μ m-thickness transverse sections stained by Gomori trichrome showing the thickening of the OFL and the reduction in the number of neurons in the GCL at the proximity of the optic nerve (**2A**) and at 2 mm of eccentricity from the optic papilla (**2B**). A hyaloid artery was observed entering the retina via the optic nerve head (arrows in **fig. 2C**).

Low power photography of a representative Nissl-stained whole mount shows the limits of the dorsal and ventral hemiretinae, coincident with the band-shaped thickening of the

OFL, crossing the optic papilla (**fig. 3A**). Digitized image in high magnification shows a row of glial cells in this region (**fig. 3B**). The topography of the vitreal blood vessels were analysed in 6 retinae. In all of them, was observed that the main hyaloid artery gives two main branches toward the far peripheral eccentricities of temporal and nasal regions (small arrows in **fig. 3A**). Parallel vitreal blood vessels running towards the periphery were seen with a similar topographic organization overlying the dorsal and ventral regions in most of the retinae. In some of them, the vitreal vessels where retained in the whole mount preparation only overlying the ventral or the dorsal hemiretina. At midperipheral eccentricities, most of the individual vessels exhibit a dichotomous pattern of branching. **Figures 3A** is a representative retina where the vitreal vessels where retained only in the ventral hemiretina. **Figure 3C** shows in other retina the hyaloid artery and parallel branches running towards the dorsal and ventral hemiretinae at peripheral eccentricities of the nasal region. **Figure 3D** illustrates in medium power photography, the topographic organization of the vessels at the proximity of the optic papilla in the retina illustrated in **fig. 3A**. **Figures 3E** and **3F** show the orientation of the vessels and their branching points in relation to the rows of neurons in the ganglion cell layer.

The average areas of dorsal and ventral hemiretinae are showed in **table 2**. Observe that the surface area of the ventral region is about 1.6 times larger than that occupied by the dorsal region. Compared with data showed in **table 1**, the average area of dorsal and ventral hemiretinae corresponds to about 38 and 62% of the entire retinal surface, respectively.

Topography of Cell Density within the Ganglion Cell Layer of the Dorsal and Ventral Retinae

The distribution pattern of the density of neurons (presumed ganglion cells and displaced amacrine cells) within the GCL was non-uniform along the dorsal and ventral

portions of the retina. Isodensity contour map shown in **figure 4C** depicts a prominent horizontal visual streak just below the optic papilla in the ventral hemiretina and a small area of higher density in the peripheral temporal region of dorsal hemiretina. Along the horizontal visual streak, the region containing the highest cell densities (with about 0.5 mm wide) occupied a large extension of the naso-temporal distance. The cell density peak was localized in the temporal region within the visual streak at about 2.5 mm of eccentricity from the optic disc.

In the dorsal hemiretina, the centralmost isodensity line corresponded to a cell density of about 4,000-4,500 cells/mm². In retinæ of four animals we observed a slight increase in cell density (5,500-6,500 cells/mm²) at a small area localised within 3-3.5 mm of eccentricity in the peripheral region of the temporal quadrant. Nevertheless, in retinæ of other two animals this area was not detected, even increasing the number of sampling windows for cell counting in that region. The average peak and minimum cell densities estimated in both hemiretinæ are shown in **table 2**. As can be seen in this table, the centre-peripheral gradient of cell density was about 2.0:1 and 5.4:1 in dorsal and ventral hemiretina respectively. The total number of neurons within the GCL ranged from 244,905 to 372,958 cells in the ventral hemiretina and was estimated as about 3 times higher than the values obtained in the dorsal hemiretina (60,880 to 105,910 cells). **Table 2** shows the average values estimated in six retinæ of animals with 14.5-17 cm of SL.

Analysis of Neuronal Soma Size

Table 3 summarises the soma areas and diameters obtained in 100 cells / sampling area of 4 retinæ. The analysis was performed in regions of maximum and minimum cell density, i.e. 5,500-6,500 or 16,000-19,000 cells/mm² at central regions and 2,500 or 3,500 cells/mm² at peripheral eccentricities of dorsal and ventral hemiretinæ, respectively. The

histograms of soma area or mean diameter versus frequency of the population of neurons in the GCL revealed a normal distribution (Shapiro Wilk's W test, $p < 0.2$) either at central or peripheral regions in both hemiretinae. The average soma size of neurons within the GCL differ significantly between central and peripheral eccentricities in both hemiretinae (Student t -test, $p < 0.01$), consistent with the higher degree of cell packing in areas of increased density. There was also an expressive difference between dorsal and ventral hemiretinae regarding the average neuronal soma size in either central or peripheral eccentricities (table 3). **Figure 5** illustrates high power photomicrographs of cells within the GCL in central and peripheral regions of both hemiretinae. **Figure 6** illustrates, in a representative retina, the distinct normal distribution (Shapiro Wilk's test, $p < 0.2$) of soma mean diameter in ventral and dorsal hemiretinae in regions of maximum (6A) and minimum (6B) cell density respectively. In this representative retina, for example, analysis of soma area within the visual streak revealed a distribution with a predominant peak of cells between 12 and 16 μm^2 (mean = $13.63 \pm 3.82 \mu\text{m}^2$). These data contrast with the soma area found in the periphery of ventral hemiretina which ranged between 12 and 42 μm^2 (mean = $25.82 \pm 7.10 \mu\text{m}^2$) and with the classes found at peripheral regions of dorsal hemiretina that ranged in size between 16.5 and 58 μm^2 (mean = $35.07 \pm 9.05 \mu\text{m}^2$).

Discussion

General Aspects of Optic System in Adult Anableps anableps

The qualitative aspects of the optical design of the *Anableps* eye had been well documented since earlier studies (e.g. Arruga, 1941, Duke-elder, 1958). A quantitative analysis made by Sivak (1976) in *Anableps anableps* reported an axial length of the eye of about 6 mm and the lens diameters along the dorsal and ventral pupil axes of about 2.45 and

and 2.70 mm respectively in 03 juvenile animals with 8.5-9.5 cm in SL. In the present study, a comparison of the two lens diameters in adult animals with 15.5-17.5 cm or 18.5-20.5 cm of SL yields a ratio ranging from 1:1.13 to 1:1.21 (mean = 1:1.16). In spite of the differences in the methodology adopted to obtain the lens dimensions, the results herein obtained are close to those described in juvenile specimens of *Anableps anableps* by Sivak (1976) and Swamynathan et al. (2003) (1:1.19 and 1:1.30 respectively) and by Schwassmann and Kruger (1965) for adult specimens of *Anableps microlepis* (1:1.20) with body length ranging from 15-20 cm. Taken together our data suggest that the lens adult *Anableps anableps* could maintain a similar level of asymmetry as compared to juvenile specimens and presumably a comparable refractive index along the dorsal and ventral axes.

An asymmetric growth of the *Anableps* eye is also suggested by the present study, with a more expressive increase in its equatorial diameter as compared to its axial length. The percentage of increase in the eye axial and equatorial diameters in animals with 18.5-20.5 cm as compared to those with 14-16.5 cm in SL was about 6% and 18% respectively, being the latter similar in magnitude order to the increase in the retinal area (about 12%). These data seem to be consistent with the presence of two distinct and orthogonal visual axes, suggesting that a potential increase in the focal length of the lens could be accompanied by a larger distance between the dorsal and ventral corneas and the respective hemiretinae activated by the aerial and aquatic visual fields. In addition, compared to the values of lens diameters reported by Sivak (1976) and Swamynathan et al., (2003) in juvenile animals, the absolute dimensions of the lens in our adult animals are about 42-44% higher, while the average axial diameter is at most 25% higher. These results suggest that the development of *Anableps anableps* eye may be distinct to that described for other freshwater and marine teleostei where the rate of increase of the eye axial length is higher than of the lens diameter (Shand et al. 1997, 2000).

Functional Segregation of Dorsal and Ventral Hemiretinae and Implications of a Choroidal Tapetum in *Anableps anableps*

In the present study, the quantitative analysis performed in retinal whole mounts of *Anableps anableps* reinforces the differential organization and structure of the dorsal and ventral portions of the retina. A reduction on the ganglion cell concentration as the retina approaches the division between the ventral and dorsal regions was described by Schwab et al., [2001] in retinal transverse sections. The results herein obtained also indicate that this feature is coincident with a horizontal band (0.5 wide) characterized by an expressive thickening of the OFL within the central limits of the retina just above the horizontal visual streak in the ventral portion. It is conceivable to suppose that these anatomical features may contribute for the prevention of a double-image processing, especially in the meniscus where the water level bisects the eye. While the iris flap must be effective in reducing the glare of sunlight reflected off the water surface (Schwassmann and Kruger (1965), a horizontal band with a reduced number of ganglion cells could enhance the physiological limits of the dorsal and ventral portions, favoring the functional activation of the most specialised region of the retina in the aerial visual field.

We detected a tapetum lucidum in the *Anableps anableps* eye that was not reported in neither earlier nor more recent studies using light or electronic microscopy [Inouge and Noto, 1962; Duke-Elder, 1958; Borwein and Hollenberg, 1973; Schwab *et al.*, 2001]. The molecular composition of this tapetum was not investigated in the present study. The silvery appearance and its localization in the scleral surface of light-adapted eyes, suggests that it may be a choroidal tapetum [Schwab *et al.*, 2002]. A tapetum lucidum is known as a catoptric ocular device found in many invertebrates and vertebrates involved in the sensitivity gain in low light conditions. A comparative analysis among the species suggests that choroidal and retinal tapeta have evolved several times and represent convergent evolution of function [Schwab *et*

al., 2002]. Among fishes this ocular adaptation was described in both teleost and cartilaginous species [Walls, 1942; Heath and Hindman, 1988; Brackevelt, 1991; Takei and Somiya, 2001, Schwab *et al.*, 2002], but to our knowledge, no report about the presence of a tapetum had been made in cyprinodontiformes. Although the fishes of genus *Anableps* can be considered as diurnal species, remaining most of their time at the water surface, behavioural studies have indicated that several feeding strategies adopted by the species *A. anableps*, *A. microlepis* and *A. dowi*, occur at night or during dim light. Although these species differ as to morphology and biogeographical distribution, their ophthalmic morphology is quite similar [Schwab *et al.*, 2001]. All of them, but especially *Anableps dowi*, were seen at night as active hunters, leaping into the air, attracted by hovering or low-flying nocturnal insects [Zahl *et al.*, 1977]. *Anableps anableps* also catches insects in the air [Oliveira *et al.*, 2002] and recent evidence obtained in the Amazonian Maracanã River indicates that in this region, this species feeds predominantly on the tidal flats, sifting through the mud and acts as an excellent crustacean predator [Oliveira *et al.*, 2003]. Potential predators of *Anableps* are aquatic and terrestrial animals [Zahl *et al.*, 1977; Miller, 1979; Schwab, 2001] and some of them act at night. In Marajó Island [Pará, Brazil] for example, bats as *Noctilio leporinus* (Noctilionidae) were observed capturing these fishes at night (L.F.A. Montag, personal communication). Thus, the presence of a tapetum over the ventral and dorsal portion of the *Anableps* eye could enhance the sensitivity gain at dim light for feeding above the water surface, at the water surface and in the water column, in rivers or estuarine media with high and variable levels of turbidity, but could be used especially for protection.

Ecophysiological Implications of Retinal Specializations

The topographical distribution of neurons in the GCL identified within the dorsal and ventral hemiretinae supports the remarkable specialisation and versatility of the *Anableps*

anableps eye to maintain a suited vision on the marginal niche of the aquatic environment. The presence of a visual streak in the ventral hemiretina of this species, its localization and the high cell density coincides with the horizontal band of high retino-tectal magnification and with the small receptive fields detected in the optic tectum of *Anableps microlepis* [Schwassmann and Kruger, 1965]. The cell density observed in the visual streak of *Anableps anableps* is superior to what was described in other freshwater species such as the channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, 1818 (Ictaluridae) [1,500 cells/mm²; Dunn-Meynell and Sharma, 1987] and in the garfish *Lepisosteus platyrhincus* DeKay, 1842 (Lepisosteidae) (about 9,400 cells / mm²) across the ventral meridian of the eye which also subtends the surface of the turbid waters in which this latter species inhabits [Collin and Northcutt, 1993]. It has been speculated that a cell density peak within a visual streak may be used behaviourally [Collin, 1999]. The presence of a density peak in the temporal retina of *Anableps anableps* could enhance the discrimination of inputs from frontal visual space and may aid in the detection of insects into the air or of small micro-organisms that slowly drift past in the mud. A similar cell density peak of 16,000 cells / mm² was described in the nasal region of the visual streak in the open sea fish *Navodon modestus* (at present, *Thamnaconus modestus* Günther, 1877; Monacanthidae) [Ito and Murakami, 1984]. In this case, it was suggested that the behavioural importance could be to maneuver backward successfully which it often does using its pectoral fins [Ito and Murakami, 1984].

Among cyprinodontiformes, the life in intertidal margins and the feeding strategies to prey insects adopted by different species, may be favored the development of a visual streak as a common retinal specialisation, independent of the evolutionary attempts towards an amphibious eye. In the species *Fundulus heteroclitus* Linnaeus, 1766 (Fundulidae); *Aplocheilichthys lineatus* Valenciennes, 1846 and *Epiplatys grahami* Boulenger, 1911 (Aplocheilichthysidae), one or two band-shaped increase in retinal thickness across the retinal

horizontal meridian, suggested the presence of this retinal specialisation [Butcher, 1938; Munk 1970]. In these two latter species, it was speculated that the upper band is able to view an insect above the water by surface refraction and the lower band is able to visualize the same insect from below the water [Munk 1970]. In the perciform fishes *Boleophthalmus* and *Periophthalmus* (Gobiidae) that inhabit brackish waters of estuaries and freshwater tidal zone, and adopt feeding strategies for paste in the mud, Munk [1970] also described a band-shaped increase in retinal thickness across the horizontal meridian.

In *Anableps anableps* the expressive optomotor response induced by stimulus in the aerial visual field [Albensi and Powell, 1998; Saidel and Fabiane, 1998] reinforces the importance of its visual streak in the ability to respond quickly and appropriately to moving objects. Considering that this species is a fast swimming fish, the high cell density in the visual streak appears to be fundamental for its schooling behaviour in the moving stream of water and for its postural stabilization in their leaps in almost flying–fish fashion. This latter behavioural strategy is important for catch insects in the air and for survival when they are disturbed by a passing river boat or other aversive stimulus [Zahl et al., 1977].

The presence of a well-defined neural specialisation was not detected in the dorsal hemiretina. Nevertheless, the minimum cell density observed in this hemiretina is higher and the maximum cell density is similar to that described in other freshwater fishes that act as predators and that were analysed by Nissl staining. For example, peak densities of about 5,960, 5,300 and 6,300 cells/mm² were estimated in the central area of the goldfish *Carassius auratus* Linnaeus, 1758 (Cyprinidae) [Mednick and Springer, 1988], garfish *Lepisosteus platyrhincus* (Lepisosteidae) [Collin and Northcutt, 1993] and *Rutilus rutilus* Linnaeus, 1758 (Cyprinidae) [Zaunreiter et al., 1991] respectively. Thus, even though the absence of a visual streak or a central area could represent a disadvantageous condition to optimize sampling of an image in the aquatic environment, appears to be interesting to investigate whether the retinal

resolving power along the dorsal hemiretina could be higher than that reached in other species of similar eye sizes. An increase in the optomotor response as a result of visual stimulation from the aquatic environment was detected in *Anableps anableps* when the dorsal pupil was occluded. This finding suggested that a higher-level processing center or mechanism regulates this response in the aquatic sight when this species is using the aerial visual field [Albensi and Powell, 1998]. Considering that when these fishes dive, the image focused on the ventral region of the retina is blurred, especially by the lens curvature along the dorsal visual axis [Sivak, 1976; Swamynathan *et al.*, 2003], it is conceivable to suppose that in this condition, better movement detection could be provided by the dorsal hemiretina. This suggestion appears to be in agreement with behavioural observations where specimens of *Anableps* were seen abruptly diving in order to successfully pursue free swimming *Artemia* [Zahl, 1977]. The discrepancy in the cell density and average soma size detected between the hemiretinae suggests that their representations in the optic tectum could have distinct magnification factor and/or receptive fields of different sizes as was observed in *Anableps microlepis* [Schwassmann and Kruger, 1965].

In spite of the dissimilar neuronal density in the GCL of each hemiretina, the intraocular vascularization given by the system of vitreal blood vessels shows a similar topographic distribution. Although no region overlying the retina was found to be devoid of vessels, the main arterial vessel is located superior to the visual streak and only finest vessels overlap regions of highest ganglion cell density. Most of these vessels shows a slight increase in their diameters in midperipheral regions, where they bifurcate. In the ventral hemiretina, the main difference was the association of the vitreal vascularization with an external choroidal gland. This feature appears to be sufficient to maintain adequate oxygen tension to the relatively high total population of cells within the GCL. In this aspect, *Anableps anableps* can be compared with other cyprinodontiform, *Fundulus grandis* (Fundulidae), where a

similar conjunction of vitreal vessels and a choroidal gland occurs in ventral region of higher cell density [Copeland, 1976].

In conclusion, the data presented here provide additional information into processes of visual perception at the air-water interface, characterizing novel features of the amphibious *Anableps* eye. These include an asymmetric growth in the eye dimensions, the presence of an ocular adaptation for sensitivity gain in low-light conditions, and the topographic organization of the vitreal vessels and presumed ganglion cells. The results reinforce a distinct sampling grain between the dorsal and ventral hemiretinae and the relative importance of the aerial vision system for these animals. Nevertheless, it is hoped that further work incorporating optical measurements and electrophysiological responses will elucidate the resolution power of each hemiretina. The data also support that independent of their position on the phylogenetic scale, the specializations observed in the *Anableps* eye reflect the adaptive flexibility of the visual system in convergent evolution of functions (Collin, 1999; Schwab et al., 2001).

Acknowledgements

The authors are grateful to Z. C. Xavier, for technical assistance; to Dr. Jan Nora Hokoç and John David Bousfield for helpful comments on the manuscript and for reviewing the English version of the paper. The collaborations of Museum Emilio Goeldi and Departamento de Anatomia – Postgraduation in Morphology-UFPE for the use of the image acquisition system are gratefully appreciated. Some reagents used in this work were partially supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) to B.L.S.A.C. This work was partially presented at the I International Symposium of Neuroscience of Natal, RN, Brazil, March 03-07, 2004, and is part of the Master's thesis presented by F.G.O. to the Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFPE, Recife, Brazil.

References

- Albensi, B.C. and J.H. Powell (1998) The differential optomotor response of the four-eyed fish *Anableps anableps*. *Perception*, 27: 1475-1483.
- Ali, M.A. (1981) Adaptations rétinienne aux habitats. *Rev. Can. Biol.*, 40: 3 –17.
- Arruga, H. (1941) O olho do quatrolhos. Barcelona, pp.1-15.
- Bartheld, C.S. von and D.L. Meyer (1987) Comparative neurology of the optic tectum in ray-finned fishes: patterns of lamination formed by retinotectal projections. *Brain Res.*, 420: 277-288.
- Borwein, B. and M.J. Hollenberg (1973) The Photoreceptors of the “Four-eyed” Fish, *Anableps anableps* L. *J. Morphol.*, 140: 405-42.
- Brackeveld, C. R. (1991) Electron microscopic study of the occlusible tapetum lucidum of the southern fiddler ray (*Trygonorhina fasciata*). *Histol. Histopathol.*, 6: 509-514.
- Butcher, E.O (1938) The structure of the retina of *Fundulus heteroclitis* and the regions of the retina associated with the different chromatophoric responses. *J. Exp. Zool.*, 79: 275-293.
- Collin S.P. and Northcutt, R.G. (1993) The visual system of the Florida garfish, *Lepisosteus platyrhincus* (ginglymodi): III. Retinal ganglion cells. *Brain Behav. Evol.*, 42: 295-320.
- Collin, S.P. (1997) Specializations of the teleost visual system: Adaptive diversity from shallow-water to deep-sea. *Acta Physiol. Scandinavica*, 161 (supplement): 5-24.
- Collin, S.P. (1999) Behavioural Ecology and Retinal Cell Topography. *In* Adaptive mechanisms in the ecology of vision (ed. by S. N. Archer, M. B. A. Djamgoz, E. R. Loew, J. C. Partridge and S. Vallergera), Kluwer Academic Publishers, London, pp. 509-535.
- Collin, S.P. and J.D. Pettigrew (1988a) Retinal topography in reef teleosts I.: Some species with well-developed areae but poorly-developed streaks. *Brain Behav. Evol.*, 31: 269-282.

- Collin, S.P. and J.D. Pettigrew (1988b) Retinal topography in reef teleosts II. Some species with prominent horizontal streak and high-density areas. *Brain Behav. Evol.*, *31*: 283-295.
- Collin, S.P. and J.D. Pettigrew (1989) Quantitative comparison of the limits on visual spatial resolution set by the ganglion cell layer in twelve species of reef teleosts. *Brain Behav. Evol.*, *34*: 184-192.
- Coopeland, D.E. (1976). The anatomy and fine structure of the eye of teleost. IV. The choriocapillaris and the dual vascularization of the area centralis in *Fundulus grandis*. *Exp. Eye Res.*, *22*: 169-179.
- Dunn-Meynell, A.A. and S.C. Sharma (1987) Visual system of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*): II. The morphology associated with the multiple optic papillae and retinal ganglion cell distribution. *J. Comp. Neurol.*, *257*: 166-175.
- Heath, A.R. and H.M. Hindman (1988) The role of cyclic AMP in the control of elasmobranch ocular tapetum lucidum pigment granule migration. *Vision Res.*, *28*: 1277-1285.
- Hughes, A. (1977) The Topography of Vision in Mammals of Contrasting Life style: Comparative Optics and Retinal Organization. In: *Handbook of Sensory Physiology*, Vol. VII/5, F. Crescitelli (Ed.), Springer-Verlag, Berlin.
- Inouge, K. and S. Noto (1962) "Structure of the retina in *Anableps* (four-eyed fish)". *Zool. Magazine*, *71*: 188-191.
- Ito, H. and T. Murakami (1984) Retinal ganglion cells in two teleost species, *Sebasticus marmoratus* and *Navodon modestus*. *J. Comp. Neurol.*, *229*: 80-96.
- Mednick, A.S. and A.D. Springer (1988) Asymmetric distribution of retinal ganglion cells in goldfish. *J. Comp. Neurol.*, *268*: 49-59.

- Miller, R.R. (1979) Ecology, habits and relationships of the Middle American Cuatro Ojos, *Anableps dowi*. Copeia, 1: 82-91.
- Munk, O. (1970) On the occurrence and significance of horizontal band-shaped retinal areae in teleosts. Videnki. Meddr dansk naturh. Foren., 133: 85-120.
- Oliveira, V.A., R.B. Barthem and L.F.A. Montag (2002) Ecologia alimentar do tralhoto *A. anableps* e *A. microlepis* (Anablepidae: Cyprinodontiformes) no rio Paracauari (00° 43'S e 48° 31'W) – Ilha de Marajó, PA. In: Livro de Resumos do X Seminário de Iniciação Científica do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará, Brazil, p. 82.
- Oliveira, V.A., R.B. Barthem and L.F.A. Montag (2003) Biologia alimentar de *A. anableps* no rio Maracanã, Pará (Brasil). In: Livro de Resumos do XI Seminário de Iniciação Científica do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará, Brazil, p. 82.
- Saidel, W. M., and R.S. Fabiane (1998) Optomotor response of *Anableps anableps* on the field of view. Vision Res., 38: 2001-2006.
- Shand, J., S.M. Chin, A.M. Harman, and S.P. Collin (2000) The relationship between the position of the retinal area centralis and feeding behaviour in juvenile black bream *Acanthopagrus butcheri* (Sparidae: Teleotei), Phil. Trans. R. Soc. Land. 355: 1183-1186.
- Schwab, I.R., V. Ho, A. Roth, T.N. Blankenship, and P.G. Fitzgerald (2001) Evolutionary attempts at 4 eyes in vertebrates. Trans. Am. Ophthalmol. Soc., 99: 145-156.
- Schwab, I.R., K.Y. Carlton, C.B. Nedim, N.B. Thomas and P.G. Fitzgerald (2002) Evolution of the tapetum. Trans. Am. Ophthalmol. Soc., 100: 187-200.
- Schwassmann, H.O. and L. Kruger (1965) Experimental analysis of the visual system of the four-eyed fish *Anableps microlepis*. Vision Res., 5: 269-281.
- Sivak, J.G. (1976) Optics of the eye of the “Four-eyed fish” (*Anableps anableps*). Vision Res., 16: 531–534.

- Stone, J. (1965) A quantitative analysis of the distribution of ganglion cells in the cat's retina. *J. Comp. Neurol.*, *124*: 337-352.
- Stone, J. (1981) *The Whole mount Handbook*. Maitland Publications Pty. Ltda, Sidney, Australian.
- Swamynathan, S.K., M.A. Crawford, W.G. Jr. Robinson, J. Kanungo, and J. Piatigorsky (2003) Adaptive differences in the structure and macromolecular compositions of the air and water corneas of the "four-eyed" fish (*Anableps anableps*). *FASEB Journal*, *17*: 1996-2005.
- Takei, S. and H. Somiya (2002) Guanine-type retinal tapetum and ganglion cell topography in the retina of a carangid fish, *Kaiwarinus equula*. *Proc. R. Soc. Lond. B* *269*: 75-82.
- Walls, G.L. (1942) *The vertebrate Eye and Its Adaptive Radiation* (New York: Hafner Press).
- Zahl P.A., McLaughlin and R.J. Gompreeht. (1977) Visual versatility and feeding of the four-eyed fish *Anableps*. *Copeia*, *79*:793.
- Zaunreiter, M., H. Junger, and K. Kotrschal (1991) Retinal morphology of cyprinid fishes: a quantitative histological study of ontogenetic changes and interspecific variation. *Vision Res.*, *31*: 383-394.

Figure Legends

FIGURE 1: Low power photography of the eye posterior view of light-adapted (A) and dark-adapted (B) specimens of *Anableps anableps*. The presence of a silvery choroidal tapetum lucidum can be visualized externally, in the scleral side of light-adapted eye, especially over the ventral region, but not over the dark-adapted eye. (*) represents the region of optic papilla, separating the dorsal and ventral hemiretinae; and (+) the region of the optic nerve emergence in the sclera of the eye. Scale bar = 5 mm.

FIGURE 2: Digitized images of transverse sections (6 μm) of *Anableps anableps* eye at level of optic nerve (A) and at 2 mm of eccentricity from this nerve (B), stained with hematoxylin-eosin. Note the thickening of the optic fiber layer in the midportion, along of dorsal and ventral hemiretinae and the decrease in the number of cells near the midline that limits each hemi-retina (arrows). (C) Note the hyaloid artery at the midportion of the optic nerve (arrows). Scale bar: 250 μm .

FIGURE 3: A- Retinal wholemount of a right eye of *Anableps anableps* showing the limits of the dorsal and ventral hemiretinae coincident with a band-shaped thickening crossing the optic papilla. Note the orientation of the hyaloid artery along the midline and the topography of the vitreal blood vessels overlying the ventral hemi-retina, in this case. B- Digitized image in high power magnification from the band-shaped thickening of the optic fiber layer showing a row of glial cells in this region. C, D: Digitized images in medium power magnification showing the parallel orientation of the vitreal vessels originated from the central artery towards the dorsal and ventral regions (C) and in one retina where the hyaloid vessels were retained in the whole mount preparation only in ventral hemiretina. E and F: Digitized images in medium and high power magnification, respectively, show the parallel orientation of the

vessels and their branching points with regard to the radial distribution of neurons in midperipheral eccentricities of the ganglion cell layer. Scale bars: B = 5 μm ; C, D, E = 3 mm; F = 1 mm.

FIGURE 4: **A, B** are schematic drawings reproduced without modification from www.ac-nancy-Metz.fr/enseign/svt/ressourc/regional/MAN/ecostropicaqua/mangroves.htm.

A: The position of an *Anableps* fish swimming in the air-water interface and the orientation of the aerial and aquatic visual axes. **B:** Schematic drawing of the eye showing the visual axes towards the dorsal and ventral hemiretinae. **C:** Isodensity contour map of the distribution of Nissl-stained cells within the retinal ganglion cell layer in a representative left eye of the four-eyed fish *Anableps anableps*. Note the expressive difference between the cell densities present at central and peripheral eccentricities of the dorsal and ventral hemiretinae. A prominent visual streak can be seen below the optic papilla in the ventral hemiretina while a small region of higher cell density was observed in the temporal region of the dorsal hemi-retina in some of the specimens analyzed. Values represent cells/mm² $\times 10^3$. The dotted line represents the central limits of each hemiretina and the circle the optic nerve head.

FIGURE 5: Digitized images in high power magnification of Nissl-stained cells within the retinal ganglion cell layer at center and peripheral regions of dorsal (A and B) and ventral (C and D) hemiretinae. Note the variation in cell soma size as a function of the cell density and eccentricity. Cell density in A, B, C and D corresponds to 5,500; 2,500; 16,000 and 3,500 cells/mm² respectively. Scale bar: 20 μm .

FIGURE 6: Comparative histograms of mean diameter (μm) versus frequency of cells within the retinal ganglion cell layer at central (A) and peripheral (B) eccentricities of dorsal and ventral hemiretinae. Note the distinct distribution of cell soma size between the hemiretinae,

perhaps reflecting, the distinct cell density observed in each one either at central or peripheral eccentricities.

TABLE 1
MORPHOMETRIC DIMENSIONS OF BODY, EYE
AND RETINA
(Mean $\pm$ SD)

Body size range	Average SL (cm)
SL = 14-17.5 cm	16.03 $\pm$ 0.98 (<i>n</i> = 18)
SL = 18.5-20.5 cm	19.30 $\pm$ 0.90 (<i>n</i> = 04)
Axial lenght of the eye (mm)	
SL = 14.0 - 17.5 cm	7.1 $\pm$ 0.6 (<i>n</i> = 18)
SL = 18.5 - 20.5 cm	7.6 $\pm$ 0.2 (<i>n</i> = 06)
Equatorial diameter of the eye (mm)	
SL = 14.0 - 17.5 cm	7.8 $\pm$ 0.5 (<i>n</i> = 18)
SL = 18.5 – 20.5 cm	9.5 $\pm$ 0.4 (<i>n</i> = 06)
Lens diameter (shorter axis) (mm)	
SL = 15.5 - 17.5 cm	4.05 $\pm$ 0.34 (<i>n</i> = 06)
SL = 18.5 – 20.5 cm	[#] 4.20 $\pm$ 0.24 (<i>n</i> = 06)
Lens diameter (longer axis) (mm)	
SL = 15.5 - 17.5 cm	4.67 $\pm$ 0.31 (<i>n</i> = 06)
SL = 18.5 – 20.5 cm	[#] 4.92 $\pm$ 0.09 (<i>n</i> = 06)
Total retinal surface area (mm ²)	
SL = 14.5 - 17.5 cm	71.21 $\pm$ 9.83 (<i>n</i> = 12)
SL = 18.5 – 20.5 cm	[#] 81.31 $\pm$ 7.95 (<i>n</i> = 06)

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. (#) represents significant difference among the groups according to body size.

TABLE 2
COMPARATIVE ANALYSIS OF DORSAL AND VENTRAL
HEMIRETINAE

	Dorsal retina	Ventral retinal
Retinal surface area (mm ²) SL = 14.5 - 17 cm (<i>n</i> = 12)	26.91 ± 5.05	44.32 ± 5.70
Peak cell density (cells/mm ²) (<i>n</i> = 6)	5,555 ± 602	18,286 ± 3,162
Minimal cell density (cells/mm ²) (<i>n</i> = 6)	2,740 ± 302	3,555 ± 350
Total number of neurons (<i>n</i> = 6)	84,164 ± 13,612	304,324 ± 49,724
Centre-peripheral gradient (<i>n</i> = 6)	2.0 ± 0.36	5.45 ± 0.92

Data are expressed as mean ± standard deviation.

TABLE 3
SOMA SIZE OF NEURONS IN THE GANGLION CELL LAYER

CENTRE		PERIPHERY		
	Mean Diameter ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	Area ($\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$)	Mean Diameter ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)	Area ($\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$)
Dorsal hemi-retina				
R1	^{#*} 3.96 – 8.54 (6.08 $\pm$ 0.99)	^{#*} 12.23 – 54.81 (28.66 $\pm$ 8.96)	4.39 – 8.71 (6.71 $\pm$ 0.89)	16.50 – 57.86 (35.07 $\pm$ 9.05)
R2	^{#*} 4.12 – 8.31 (5.86 $\pm$ 0.78)	^{#*} 13.77 – 52.48 (26.51 $\pm$ 6.94)	5.14 – 7.75 (6.42 $\pm$ 0.63)	19.94 – 46.95 (31.74 $\pm$ 6.28)
R3	^{#*} 4.12 – 8.12 (6.08 $\pm$ 0.80)	^{#*} 13.67 – 48.89 (28.55 $\pm$ 7.35)	4.91 – 8.56 (6.65 $\pm$ 0.81)	17.18 – 53.05 (34.44 $\pm$ 8.43)
R4	^{#*} 4.47 – 8.08 (5.88 $\pm$ 0.62)	^{#*} 14.35 – 51.22 (26.73 $\pm$ 5.65)	4.85 – 10.80 (6.14 $\pm$ 1.15)	9.90 – 62.59 (29.74 $\pm$ 11.48)
Ventral hemi-retina				
R1	^{#*} 2.70 – 5.37 (4.19 $\pm$ 0.61)	^{#*} 6.82 – 20.98 (13.63 $\pm$ 3.82)	3.91 – 7.67 (5.75 $\pm$ 0.83)	11.91 – 42.18 (25.82 $\pm$ 7.10)
R2	^{#*} 3.41 – 6.00 (4.69 $\pm$ 0.54)	^{#*} 9.08 – 28.23 (17.13 $\pm$ 3.92)	4.10 – 7.73 (5.85 $\pm$ 0.78)	13.20 – 47.85 (27.02 $\pm$ 7.26)
R3	^{#*} 3.32 – 5.69 (4.49 $\pm$ 0.50)	^{#*} 8.61 – 25.29 (15.50 $\pm$ 3.39)	3.17 – 7.23 (5.23 $\pm$ 0.69)	7.75 – 40.71 (21.41 $\pm$ 5.68)
R4	^{#*} 2.81 – 5.30 (4.14 $\pm$ 0.51)	^{#*} 6.10 – 21.81 (13.30 $\pm$ 3.22)	3.70 – 10.25 (6.22 $\pm$ 0.88)	10.73 – 82.14 (30.34 $\pm$ 9.18)

Data within the parenthesis are expressed as mean $\pm$ Standard Deviation. # represents significant difference between central and peripheral eccentricities in the same hemiretina. * represents significant difference between hemiretinae in central or peripheral eccentricities (*t*-test. *p* < 0.01)

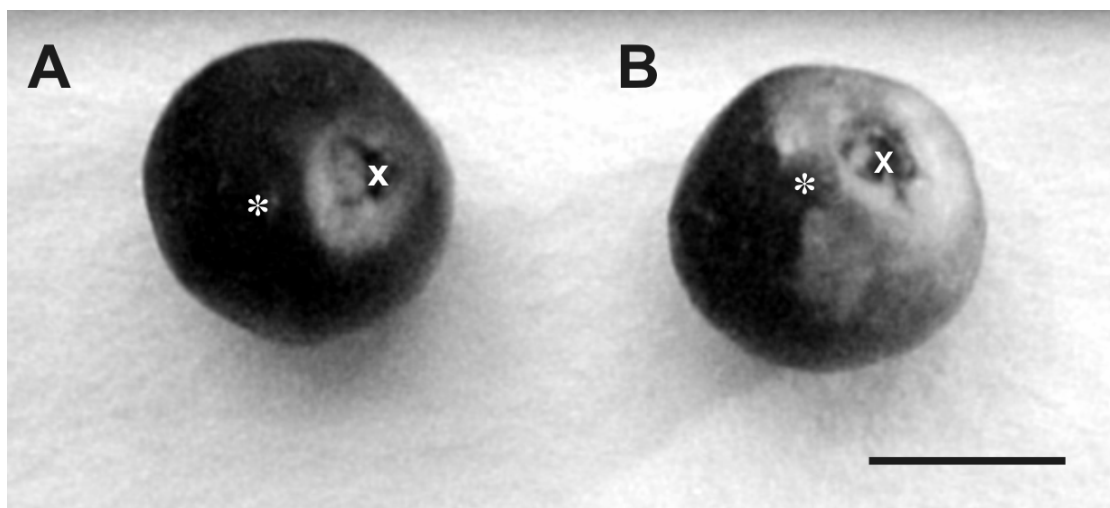
FIGURA 1

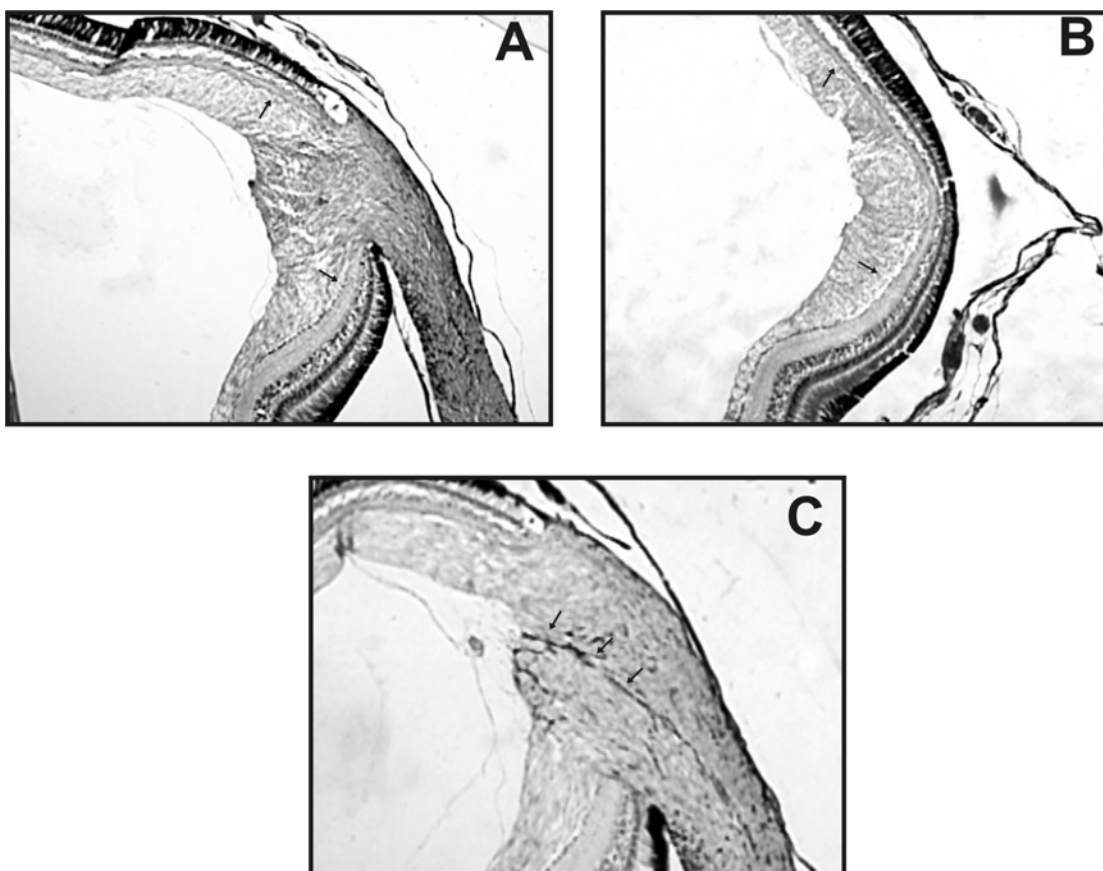
FIGURA 2

FIGURA 3

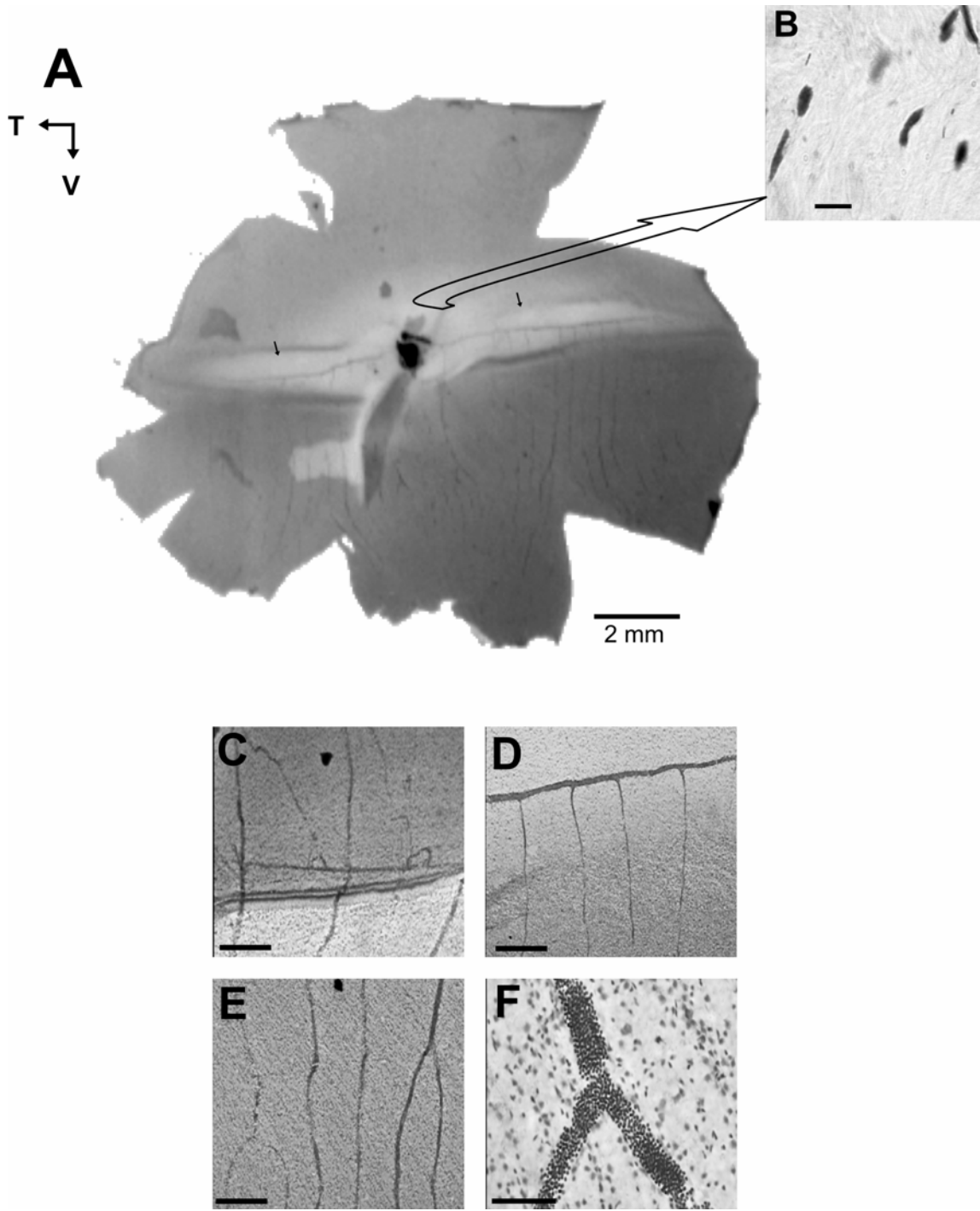


FIGURA 4

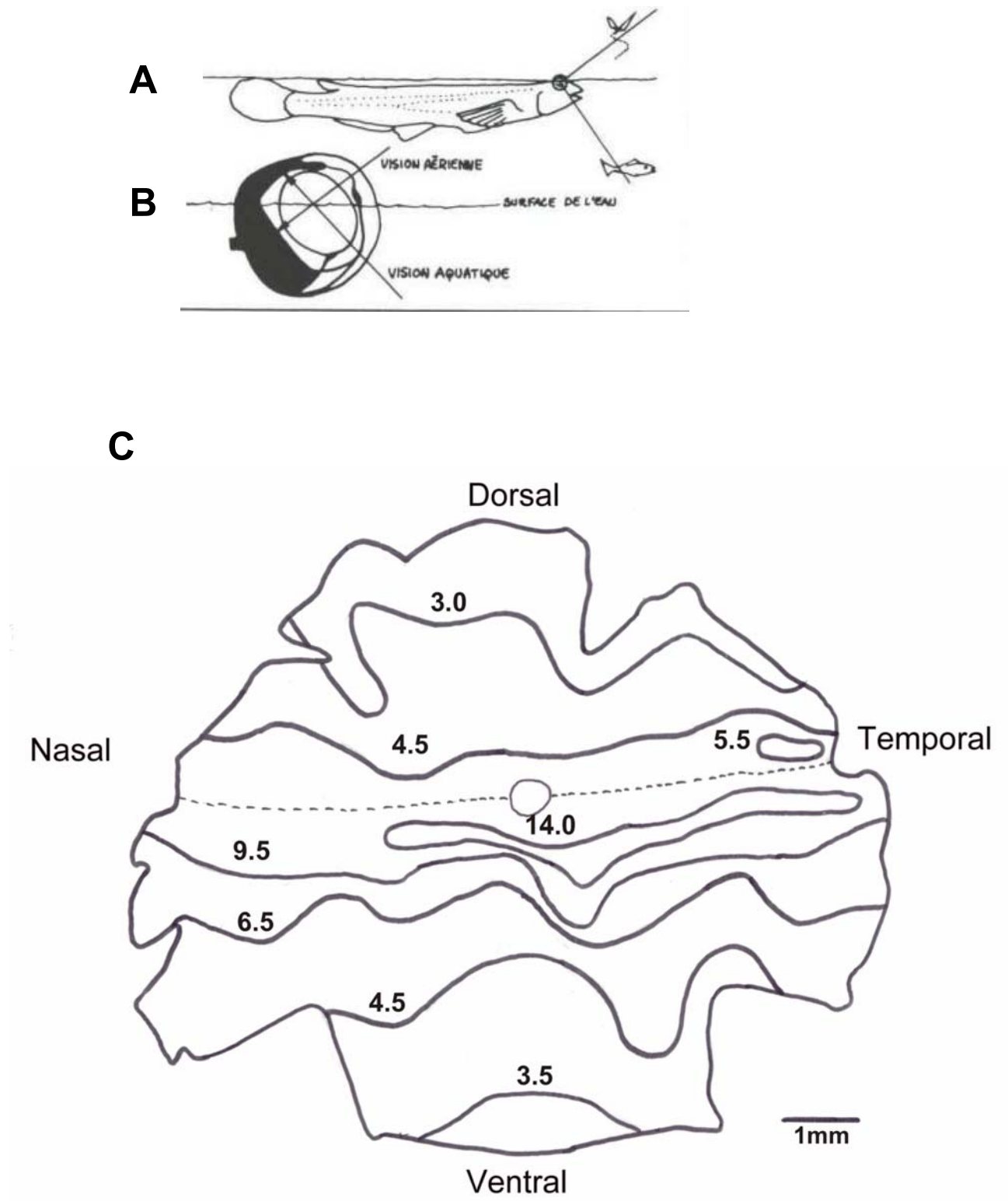


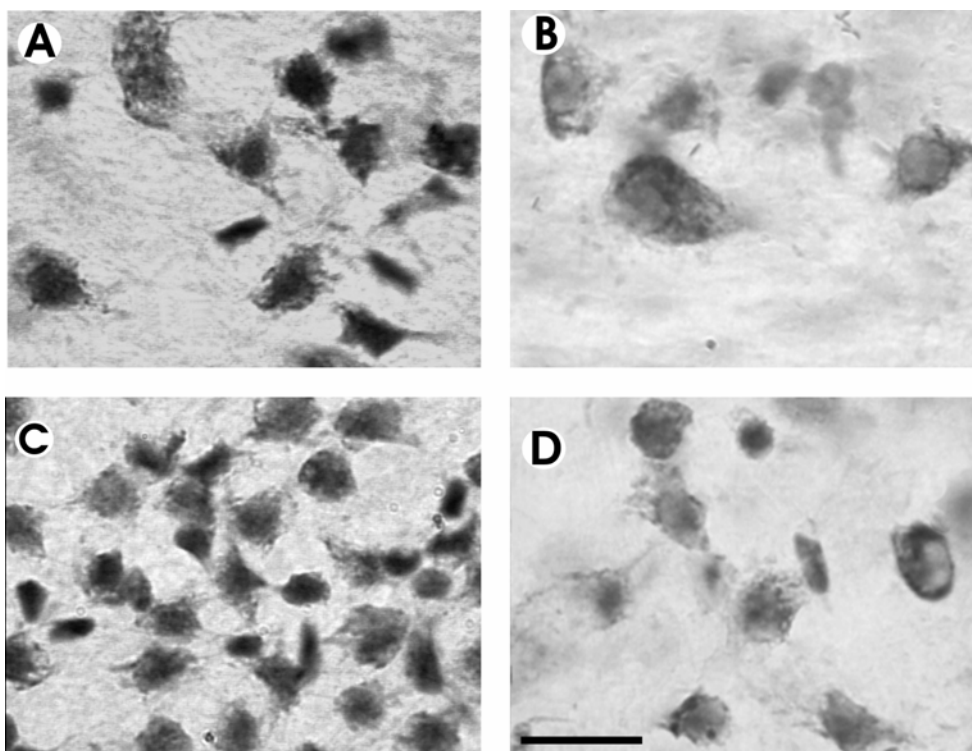
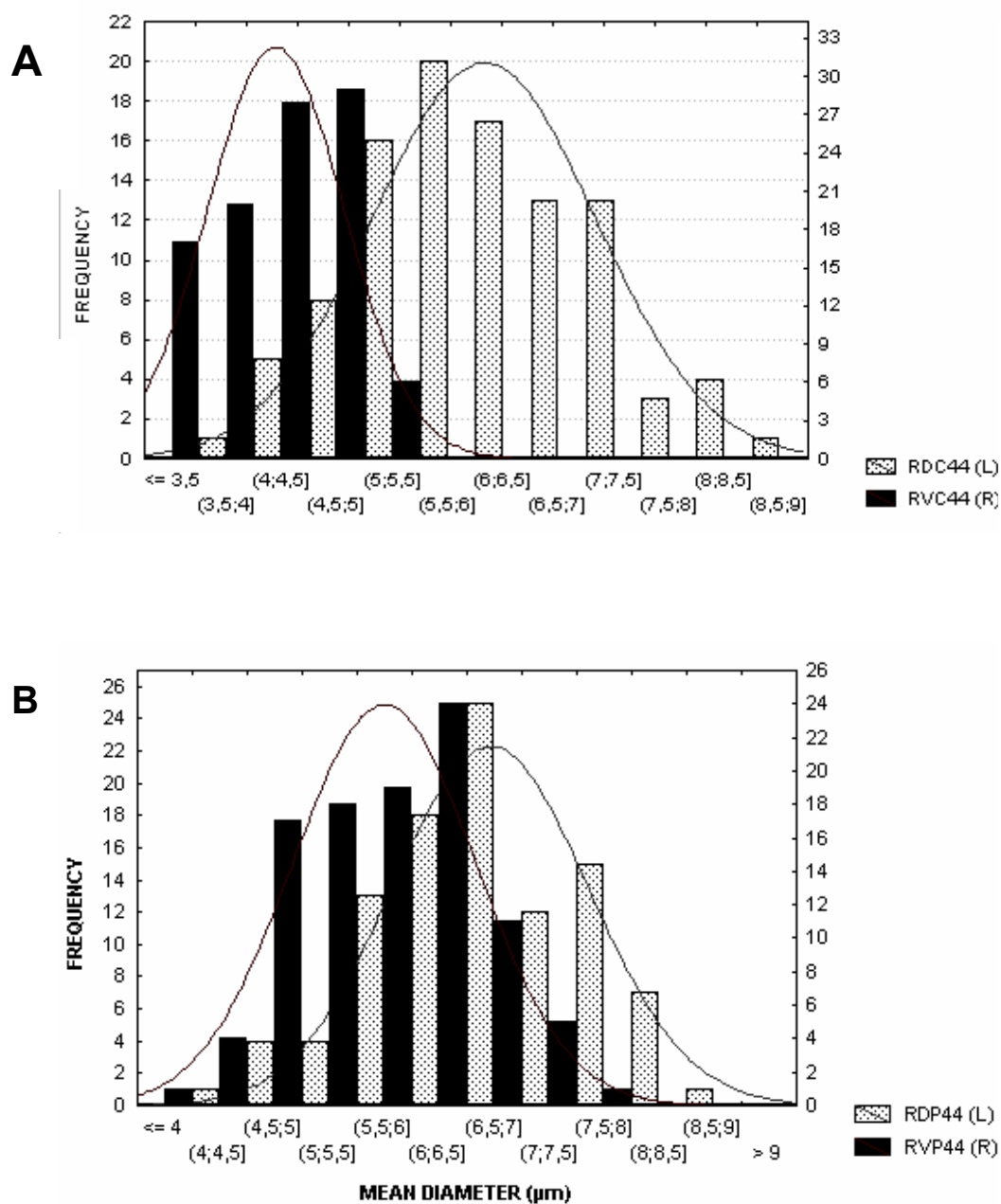
FIGURA 5

FIGURA 6

SOMA SIZE OF NEURONS IN THE GANGLION CELL LAYER



IV CONCLUSÕES

1. Um pronunciado “visual streak” ou faixa visual horizontal é a especialização neuronal definida pela distribuição topográfica das células ganglionares na hemi-retina ventral do *Anableps anableps*.
2. Na hemi-retina dorsal, uma pequena área de densidade máxima foi observada na extrema periferia temporal de quatro das seis retinas analisadas.
3. O gradiente centro-periférico e o número total de neurônios presentes na camada de células ganglionares da hemi-retina ventral é cerca de duas e três vezes maior, respectivamente, do que o estimado na hemi-retina dorsal.
4. A frequência relativa do tamanho das células ganglionares sugere que existem diferentes populações celulares nas duas hemi-retinas.
5. Animais adultos apresentam uma assimetria nas dimensões da lente de magnitude similar ao descrito para animais jovens e um crescimento assimétrico do olho.
6. Um tapetum lucidum coroidal recobre toda a extensão do olho do *Anableps* em animais adaptados ao claro.
7. A distribuição topográfica dos vasos hialóides é similar nas hemi-retinas dorsal e ventral. A localização da artéria hialóide principal coincide com a linha média que limita as duas hemi-retinas, acima da região de maior densidade de células ganglionares na faixa visual horizontal. Apenas os vasos mais finos que se ramificam a partir da artéria principal estão superpostos a região da faixa visual horizontal. A distribuição destes vasos ocorre de forma paralela em direção à periferia, onde se bifurcam e se tornam um pouco mais calibrosos.

V ANEXOS

Anexo A) MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Vinte e dois espécimens de *Anableps anableps* – 12 machos e 10 fêmeas foram usados no presente trabalho. Os animais foram divididos em dois grupos: Um com comprimento corpóreo (comprimento padrão) variando de 14 a 17,5 cm, (12 machos e 06 fêmeas) e outro de 18,5 a 20,5 cm (04 fêmeas). Os animais foram capturados no Rio Maracanã, próximo à cidade do mesmo nome, distante 168 Km de Belém (Pa). Logo após a captura os peixes foram acondicionados em recipientes onde foram realizadas as medidas do comprimento corpóreo (distância entre a ponta da cabeça ao pedúnculo caudal) a identificação taxonômica e de sexo. Imediatamente após estes procedimentos, os peixes foram decapitados, e as cabeças foram fixadas por imersão em paraformaldeído 4% em tampão fostato 0,1M por um período 3 a 4 horas, sendo em seguida lavadas e mantidas em tampão fosfato 0,1 M. As cabeças assim fixadas foram levadas para o Laboratório de Neurofisiologia da UFPE em Recife, onde se realizaram todos os demais procedimentos.

Preparação da montagem plana para marcação de Nissl.

Imediatamente após o período de fixação, as cabeças foram lavadas em tampão fosfato (PB) 0,1 M e acondicionadas para viagem com destino ao laboratório de Neurofisiologia em Recife, onde se procedeu a medida dos demais parâmetros morfométricos, como a distância entre os olhos e distância entre pupilas. Após a obtenção desses dados os olhos foram removidos e medidos o diâmetro equatorial e axial de cada olho. Seis olhos de 05 animais foram utilizados para a montagem plana e marcação de Nissl.

As extensões laterais da íris denominadas íris flap, que separam as duas aberturas pupilares, foram usadas como referência para estabilizar a orientação ao longo dos eixos naso-

temporal e dorso-ventral. O procedimento descrito por Stone, (1981) foi adaptado para preparação da montagem plana das retinas. Durante esta preparação, a orientação das retinas foi confirmada considerando algumas peculiaridades que diferenciam as hemi-retinas dorsal e ventral (como por exemplo a glândula coroidal por trás da retina ventral e o menor tamanho da retina dorsal). Foi particularmente difícil a retirada de pigmento do epitélio, sendo necessário usar um protocolo adicional, deixando as retinas numa solução de Peróxido de hidrogênio 10% em PBS, por um período de 24 horas, quando então a camada de pigmento dissolveu por completo, sem provocar danos ao tecido retiniano. Em seguida foram feitos cortes radiais e a montagem plana das retinas em lâminas gelatinizadas(0,5 – 1%). As lâminas foram mantidas a temperatura ambiente ($22^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C) e as células ganglionares coradas com cresil violeta a 0,1 – 0,25%, para evidenciar os corpúsculos de Nissl, segundo protocolo descrito por Stone (1981). De modo a avaliar a retração da retina devido à fixação, em alguns dos animais, uma das retinas foi dissecada a fresco e montada após enucleação para posterior mensuração e a outra foi fixada por imersão seguindo o protocolo acima citado. Para a maioria das retinas, fez-se uma estimativa da área de retração antes e após o procedimento de coloração e desidratação e foram analisadas somente aquelas cuja retração era inferior a 10%. As medidas de área foram feitas através do software Scion Image for Windows.

Preparação das lâminas gelatinizadas .

Foram dissolvidos 1,25g de gelatina da Sigma e 0,16g de Sulfato cromo potássio em 250 ml de água destilada aquecida a uma temperatura de 70° C e logo após a homogeneização a solução foi filtrada. As lâminas foram lavadas em álcool 70% e após secagem na estufa foram mergulhadas na gelatina aquecida no banho maria a 40° C. A secagem das lâminas gelatinizadas foi feita na estufa a uma temperatura de 40 – 45° C.

Protocolo para a marcação de Nissl.

Após a montagem plana das retinas em lâminas gelatinizadas, as lâminas foram colocadas em vapor de formol no banho maria (60⁰ C) por um período de duas horas. Em seguida foram escaneadas para mensuração do controle de retração e então submetidas aos procedimentos abaixo descritos, de acordo com o (Protocolo de Kluver Barrera).:

Reidratação:

Etanol 90 %	}	5 minutos cada
Etanol 70 %		
Etanol 50 %		

95 ml de água destilada e 5 ml de ácido acético – 5 minutos;

Coloração:

Violeta de cresila 0,1 % durante 15 minutos a temperatura ambiente;

Diferenciação e desidratação

Água destilada	}	15 a 30 segundos cada;
Etanol 70 %		
Etanol 90 % + 3 gotas de ácido acético		

Etanol 100 % (I)	}	3 minutos cada
Etanol 100 % (II)		
Butanol		
Etanol – Xileno (1 : 1)		
Xileno 100 % (I)		
Xileno 100 % (II)		

Em seguida colocou-se Entelan sobre a superfície da retina e lamínula previamente limpa em álcool 70% e xilol.

As lâminas foram novamente escaneadas para se proceder a novas medidas e checagem final do controle de retração.

Análise das lâminas ao microscópio

As lâminas foram escaneadas e impressas em papel milimetrado com ampliação de 20 vezes, para tornar possível o mapeamento das células ganglionares e sua disposição através da retina. Foi usado um microscópio Olympus BX50, objetiva planacromática 40 x 1,25, acoplado a uma câmera Samsung digital sight inside mod. SHC410NAD, e capturadas imagens a cada 0,5 mm ao longo da periferia e 0,25 mm na região central, tanto da retina dorsal quanto da ventral. Essas imagens capturadas foram salvas em JPEG 24 bits ou BMP 24 bits e gravadas em CD para posterior contagem das células e análise de diâmetro.

As células foram contadas através do software Ulead PhotoImpact 3.0 Special Version, sendo utilizada uma ferramenta de pintura para marcar com o mouse cada célula contada. À medida que se processava essa contagem, os valores encontrados eram transferidos para uma planilha previamente confeccionada com as coordenadas de cada retina. Uma vez concluída a contagem, esses valores foram transportados para os respectivos mapas, onde se procedeu a marcação das linhas de isodensidade. Concluída a marcação das linhas de isodensidade, os mapas foram então escaneados e feitas medidas de todas as áreas através do software Scion Image – Release Beta 4.0.2, possibilitando assim estimar o número total de neurônios presente em cada retina.

Análise das populações neuronais

Através do software Scion Image – Release Beta 4.0.2, foram medidas a área e o diâmetro dos neurônios presentes na camada de células ganglionares em excentricidades centrais e periféricas tanto na hemi-retina dorsal quanto na ventral, sendo adotado o seguinte

procedimento: Imagens digitalizadas das regiões selecionadas foram obtidas em cada hemi-retina. As medidas foram realizadas em no mínimo 100 células por região selecionada de acordo com a densidade celular, a partir dos mapas de distribuição topográfica.

Dados estatísticos

Para análise estatística dos dados utilizou-se o teste Shapiro Wilk's W, teste *t* de Student e ANOVA, seguidos pelo *post hoc* Tukey test quando indicado. Diferença estatística significativa foi considerada quando $p < 0.05$.