UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

GUIDO BARBIERI BITTENCOURT

**Morfologia dos fotorreceptores e genética dos pigmentos visuais de
Bothrops jararaca e *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes,
Viperidae).**

São Paulo

2018

GUIDO BARBIERI BITTENCOURT

**Morfologia dos fotorreceptores e genética dos pigmentos visuais de
Bothrops jararaca e *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes,
Viperidae).**

(versão corrigida)

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientação: Dra Einat Hauzman

SÃO PAULO
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo
Dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Barbieri Bittencourt, Guido

Morfologia dos fotorreceptores e genética dos pigmentos visuais de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae). / Guido Barbieri Bittencourt; orientador Einat Hauzman. -- São Paulo, 2018.

53 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Psicologia Experimental) -- Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2018.

1. Fotorreceptores. 2. Opsinas. 3. Ecologia Visual. 4. Retina. 5. Serpentes. I. Hauzman, Einat, orient. II. Título.

APROVAÇÃO

Nome: Guido Barbieri Bittencourt

Título: “Morfologia dos fotorreceptores e genética dos pigmentos visuais de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae).”

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

Área de Concentração: Psicologia Experimental

Dissertação defendida e aprovada em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Examinador(a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

Examinador(a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

Examinador(a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

Examinador(a) _____

Instituição _____ Assinatura _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade de São Paulo e meus pais, Madeleine Lea Weyl Bloch e Françoise Suzanne Lieber, por me permitirem a melhor educação possível.

Agradeço às agências de fomento CNPq e Fapesp pelos recursos que me possibilitaram concluir com êxito esta pesquisa.

Obrigado à Dra. Einat Hauzman pelo período de cooperação e aprendizado intenso, e por me trazer seguro ao término desta jornada.

Agradeço à Profa. Dora Selma Fix Ventura pela extrema gentileza em me conceder um frutífero período de transição como um dos seus alunos, no qual participei de congresso e estágio no exterior.

Obrigado ao meu colega Kaê Leopoldo e à professora Christina Joselevitch, por me introduzirem ao laboratório de Psicofisiologia Sensorial, por toda experiência adquirida e por terem me oferecido esta oportunidade única entre seus estudantes.

Reforço meu agradecimento a todas as mulheres, professoras e colegas de nosso laboratório, que servem como modelo de exemplo e inspiração: Profa. Dora Selma Fix Ventura, Profa. Daniela Bonci, Profa. Christina Joselevitch, Dra. Einat Hauzman, Dra. Gabriela Ioshimoto, Aline Goto, Juliana Tashiro, Luíse Garcia, Maria Júlia Vilani Naman.

Felicito os colegas Dr. André Liber, Dr. Leonardo Henriques e agradeço pelo apoio imensurável, incluindo Vitor Henrique Corredor que tem me ajudado desde o início de meu treinamento no laboratório.

Dedico os resultados deste longo período a meus pais, família e amigos, a meu avô de quem não pude me despedir ou receber os cumprimentos, Sergio Barbieri (que me apelidava de “canhão velho”), aos meus colegas de laboratório e aos próximos estudantes que poderão se beneficiar desta escrita.

Meu imenso “obrigado” a todos vocês!

RESUMO

Serpentes habitam grande diversidade de habitats na maior parte do planeta. Tamanha variedade ambiental implica o desempenho de distintos nichos ecológicos e padrões comportamentais, muitas vezes relacionados a diferentes adaptações de seus sistemas visuais. Não apenas a dispersão destes animais oferece oportunidades privilegiadas de investigação, os diversos e particulares históricos evolutivos neste grupo demarcam transições ambientais convenientes para esclarecer a influência da cena visual sobre a organização de sistemas visuais, comportamentos e a filogenia. A análise comparativa da retina destes animais traz informações a respeito de adaptações comportamentais e ecológicas relativas ao ambiente e padrões circadianos de atividade. Neste trabalho foi realizada a análise dos genes de fotopigmentos visuais e da morfologia dos fotorreceptores de duas espécies de serpentes da família Viperidae, *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus*. Três indivíduos de cada espécie foram obtidos junto ao laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. O RNA total foi extraído a partir de retinas homogeneizadas e convertido em cDNA por meio da reação de transcriptase reversa. Os genes de interesse foram amplificados com uso de *primers* específicos por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR). Após purificação dos produtos de PCR foi realizado o sequenciamento dos genes de opsinas visuais expressos nas retinas das duas espécies, *lws*, *rh1* e *sws1*. Cada opsina, maximamente sensível a uma banda espectral específica e presente em diferentes populações de fotorreceptores da retina, teve o seu pico de absorção estimado com base na estrutura proteica revelada. Adicionalmente, foi conduzida análise dos tipos celulares de células fotorreceptoras da retina das duas espécies de viperídeos, por meio da técnica de imunohistoquímica, visando caracterização morfológica dos fotorreceptores em que estão compreendidas cada classe de opsina. Os resultados obtidos apontam para os mesmos grupos morfológicos de fotorreceptores e a mesma sensibilidade espectral dos respectivos pigmentos visuais, das duas espécies analisadas: cones simples e cones duplos com o fotopigmento LWS, e pico de sensibilidade espectral ($\lambda_{\max}$) estimado em ~555nm; cones simples com o fotopigmento SWS1, e $\lambda_{\max}$ estimado em ~360nm; e bastonetes, com o fotopigmento RH1, com $\lambda_{\max}$ de ~500nm. Desta forma conclui-se similaridade do nicho ecológico e do histórico natural das duas espécies, que apontam para adaptações ao habito noturno. Isto demonstra o sucesso evolutivo e a versatilidade proporcionada pela disposição de retina duplex dominada por bastonetes. Em *B. jararaca* e *C. d. terrificus*, serpentes da subfamília Crotalinae, estas características de organização do sistema visual são somadas à capacidade de detecção de comprimentos de onda infravermelhos, o que aponta para similaridades em relação a serpentes do grupo Henophidia, consideradas evolutivamente mais primitivas, e consagra novamente a vantagens obtidas na manutenção deste padrão sensorial.

Palavras-chave: Serpentes, Viperidae, retina, ecologia visual, fotorreceptores, opsinas.

ABSTRACT

Serpents inhabit a great diversity of habitats around the planet. Such environmental variability implies the performance of distinct ecological niches and behavior patterns that are related to different visual system adaptations. The diversity of environments inhabited by snakes and their evolutionary history provides a privileged investigative opportunity on the adaptive organization of the visual systems, specific behaviors and phylogeny. The comparative analysis of the retina of those animals provide many information concerning behavior and ecological adaptations related to their respective environment and circadian rhythm patterns. In this study, we performed genetic analysis of the opsin genes and morphological analysis of the photoreceptors of two snakes from the Viperidae family, *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus*. Three subjects of each species were collected at the Butantan Institute. Total RNA was extracted from homogenized retinas, and mRNA was converted to cDNA by reverse transcriptase reaction. The opsin genes *lws*, *rh1* and *sws1* were amplified by polymerase chain reactions (PCR), using specific primers. Each opsin is expressed in a different photoreceptor population and is maximally responsive to a determined spectral absorption peak ($\lambda_{\max}$) that was inferred according to the protein structure. Additionally, photoreceptor cell populations were analyzed using immunohistochemistry technique. Results point out to the same morphological cell populations and the same absorption peak in their respective opsins in the two species: double and single cones with the LWS photopigment and estimated $\lambda_{\max}$ at ~555nm; single cones with the SWS1 photopigment and $\lambda_{\max}$ at ~360nm; and rods with the rhodopsin RH1 photopigment and $\lambda_{\max}$ at ~500nm. In this way, great similarity of ecological niche and natural history was concluded for both species, which present adaptations to the nocturnal habit. This should demonstrate the great evolutionary success and versatility attained by the rod-dominated duplex retina. In *B. jararaca* and *C. d. terrificus*, snakes from the Crotalinae subfamily, those retinal features are summed to the capability of infra-red detection, which point out to similarity with snakes from the “basal” Henophidia group.

Keywords: Snakes, Viperidae, retina, visual ecology, photoreceptores, opsins.

Lista de Figuras

Figura 1. Ilustração da anatomia dos olhos dos lagartos (A) e serpentes (B) mostrando suas principais diferenças	11
Figura 2. Estrutura da retina.....	142
Figura 3. Árvore filogenética dos cinco grupos de opsinas visuais de vertebrados	186
Figura 4. Estrutura Secundária da rodopsina RH1 bovina demonstrando sítios de mutações de aminoácidos que ocorrem naturalmente e causam deslocamento significativo do pico de absorção espectral.	208
Figura 5. Serpentes <i>Bothrops jararaca</i> e <i>Crotalus durissus terrificus</i>	307
Figura 6. Alinhamento das sequências de aminoácidos dos fotopigmentos LWS, RH1 e SWS1 de <i>B. jararaca</i> e de <i>C. d. terrificus</i> , juntamente com as sequências das serpentes <i>Bitis nasicornis</i> e <i>Xenopeltis unicolor</i> , e com a rodopsina bovina	396
Figura 7. Curvas de absorção espectral das opsinas LWS, RH1 e SWS1, baseadas nos picos de absorção espectral dos pigmentos visuais obtidos a partir da sequência de aminoácidos observada para <i>B. jararaca</i> e <i>C. d. terrificus</i>	418
Figura 8. Seções transversais das retinas de <i>B. jararaca</i> (A, C, E) e <i>C. d. terrificus</i> (B, D, F), marcadas com anticorpos anti-opsina L/M (A, B), anti-opsina S (C, D) e com aglutinina WGA (E, F).	429

Lista de Tabelas

Tabela 1. *Primers* utilizados e respectivas temperaturas de anelamento.....33

Tabela 2. Aminoácidos encontrados nos sítios de deslocamento espectral da rodopsina das serpentes *B. jararaca* e *C. d. terrificus*.....37

Sumário

1. Introdução	9
1.1. <i>Visão dos Vertebrados</i>	9
1.2. <i>Olho, Retina e Visão</i>	10
1.3. <i>Genética de opsinas</i>	15
1.4. <i>Visão de serpentes, fotorreceptores e fotopigmentos visuais</i>	20
2. Justificativa	29
3. Objetivos	31
4. Materiais e Métodos.....	32
4.1. <i>Animais</i>	32
4.2. <i>Genética de Opsinas</i>	32
4.3. <i>Estimativa das curvas de absorção espectral das opsinas</i>	34
4.4. <i>Análise Morfológica de fotorreceptores em cortes histológicos radiais</i>	34
4.5. <i>Procedimentos Imunohistoquímicos</i>	35
4.6. <i>Fotomicrografias</i>	35
5. Resultados.....	36
6. Discussão	40
7. Conclusões.....	45
8. Referências.....	46
9. Anexo.....	52

1. INTRODUÇÃO

1.1. Visão dos Vertebrados

Há interesse particular em compreender o funcionamento subjacente à visão. A visão é o mais refinado e integrativo dos sentidos de que se dispõe, ora representando substratos moleculares, fisiológicos e anatômicos ausentes de outras modalidades sensoriais, ora por compreender delas os mecanismos da transdução sensorial, que se observam de forma análoga. Ademais, a disposição laminar intercalada de neurônios e plexos sinápticos da retina facilita a compreensão do funcionamento deste sistema, em comparação ao encéfalo por exemplo, figurando como organização exemplar para modelo de estudo, em que se localiza mais convenientemente os diversos tipos celulares e se identifica as respectivas funções.

A cena visual é decomposta pelo sistema visual em diversas categorias de informação a respeito de objetos no mundo físico, como a localização, tamanho, forma, cor, textura e tridimensionalidade, além de velocidade, direção e sentido, no caso de um objeto em movimento (Masland, 2011). A grande variedade de informações do ambiente exerce forte pressão seletiva sobre os sistemas sensoriais dos organismos, conduzindo-os por diferentes rumos no processo evolutivo. Apesar do grande número de homologias das estruturas visuais dos vertebrados, diversas variações relacionadas a características ecológicas das espécies podem ser observadas (Hauzman, 2014).

Como é o caso na maioria dos vertebrados, a modalidade sensorial da visão prepondera sobre as demais, e se destaca como principal fonte para extrair informação do ambiente, evitar predadores, procurar alimento e parceiros reprodutivos (Yokoyama & Yokoyama, 1996). A capacidade de detecção visual é uma poderosa aquisição evolutiva ao permitir acesso a características ambientais remotas, “encurtando” as distâncias. Funções psicológicas como mapeamento, consciência espacial e desenvolvimento da memória utilizam-se da capacidade sensorial da visão para poder originar esquemas complexos de comportamento.

A relevância da visão é mais bem representada ao constatarmos que, em primatas, aproximadamente a metade do córtex cerebral é dedicada unicamente ao processamento de informação visual (Bear et al., 2007); uma fração considerável destes neurônios é empregada unicamente para o reconhecimento de rostos e membros de animais (Spridon & Kanwisher, 2002).

1.2. Olho, Retina e Visão

O olho é a estrutura em que se inicia o processamento de estímulos visuais. Em vertebrados é composto de duas cavidades: a câmara anterior, preenchida de humor aquoso e situada entre a córnea e a íris; e a câmara posterior, preenchida pelo humor vítreo e situada entre a lente e o fundo do olho (Figura 1). A camada mais externa, também chamada túnica fibrosa, compreende dois elementos: a esclera, tecido fibroso constituído por colágeno e elastina, responsável pela acomodação e proteção mecânica do olho, e a córnea, tecido transparente e avascular que se assenta na porção anterior do olho, protegendo-o e convergindo raios de luz com grande eficiência para a entrada no sistema visual. A troca de nutrientes e fluídos é realizada através do contato com o humor aquoso, líquido produzido pelos processos ciliares entre a íris e a lente, e armazenado na câmara anterior do olho. Anteriormente à câmara anterior está a pupila, um orifício cuja abertura regula a entrada de luz para o interior do olho. Sua contração e dilatação são controladas pelos músculos da íris, a região do olho dotada de diferentes cores entre indivíduos (Walls, 1942).

Ao fundo da íris encontra-se imersa no interior do globo ocular a lente ou cristalino, uma estrutura biconvexa que permite focalizar os raios luminosos incidentes sobre a retina. Diferentes formas de acomodação da imagem são observadas em diferentes grupos de vertebrados (Figura 1). A lente é o elemento que limita as duas cavidades do olho, sendo a cavidade posterior preenchida por humor vítreo, um líquido denso e gelatinoso que preenche e sustenta sua forma (Walls, 1942). A segunda camada de tecido, chamada túnica vascular, compreende a coroide, além da íris e corpos ciliares. A coroide é uma camada altamente vascularizada, responsável pelo transporte de oxigênio e nutrientes, particularmente à retina, região de alta demanda metabólica devido à contínua conversão de estímulos luminosos em sinalização nervosa, processo de alto custo energético (Nickla & Wallman, 2010). Por fim, há a túnica interna, composta pela retina neural e pelo epitélio pigmentado. O epitélio pigmentado é localizado na região mais externa da retina, e está em contato com a coroide. A presença de grânulos de pigmentos escuros permite a absorção de fótons excedentes, melhorando a qualidade da imagem. Dentre as funções do epitélio pigmentado estão também a promoção do transporte epitelial que nutre a retina, amortecimento de perdas iônicas bruscas, a remoção de dejetos de segmentos externos que se

desprendem de fotorreceptores, e a proteção da retina contra o estresse foto-oxidativo, resultante de intensas trocas gasosas mediante incidência de luz (Strauss, 2005).

Figura 1. Ilustração da anatomia dos olhos dos lagartos (A) e serpentes (B) mostrando suas principais diferenças.

Os lagartos ajustam o foco da imagem pelo controle de músculos ciliares (bm, cm) que aletram a forma do cristalino (ln). Serpentes ajustam o foco contraindo os músculos periféricos da íris, que exercem pressão sobre o humor vítreo (vi) e desloca o cristalino (ln). Abreviações: via anterior (an), músculo ciliar de Brücke (bm), corpo ciliar (cb), coróide (ch), músculo ciliar de Crompton (cm), cônus papilar (cn), córnea (co), pálpebra (el), fóvea (fv), músculo dilatador da íris (id), músculo do esfíncter da íris (is), cristalino (ln), retina (re), vasos retiniais (rv), cartilagem da esclera (sc), esclera (sl), espectáculo (sp), humor vítreo (vi), fibras zonulares (zf). Fonte: Modificado de Caprette (2005).

A retina (Figura 2) é um tecido neural translúcido localizado no fundo do olho, onde os estímulos visuais são convertidos em sinalização neural, através de processo bioquímico denominado fototransdução. Um feixe de luz atravessa na seguinte ordem os meios oculares que antecedem a retina: córnea, humor aquoso, cristalino e o humor vítreo. Apenas ao atingir os segmentos externos dos fotorreceptores da retina que um estímulo físico luminoso é convertido em sinalização neural, e transmitido sinapticamente pelos neurônios em sentido oposto ao da passagem de luz, conduzido pelo feixe de axônios do nervo óptico até as vias corticais da visão no encéfalo (Ramon y Cajal, 1893).

De forma geral, a retina apresenta grandes atrativos para o estudo do sistema nervoso, devido à sua relativa acessibilidade e disposição organizada em duas camadas de conexão sináptica e três camadas nucleares. Como parte do sistema nervoso central, permite a observação e especulação de desdobramentos para os demais sistemas e estruturas nervosas, no que concerne a reestruturações adaptativas, plasticidade neural e modulações sinápticas presentes nestes tecidos.

Figura 2. Estrutura da retina

De acordo com a imagem disposta, a captura de um feixe de luz é sinalizada pelos fotorreceptores em sentido descendente, após ter percorrido toda a estrutura da retina em sentido ascendente. Legenda: *Outer segments*, segmentos externos dos fotorreceptores; *Inner segments*, segmentos internos dos fotorreceptores; *Outer Nuclear Layer*, Camada Nuclear Externa; *Inner Nuclear Layer*, Camada Nuclear Interna; *Inner Plexiform Layer*, Camada Plexiforme Interna; *Ganglion Cell Layer*, Camada de Células Ganglionares; *Cone*, fotorreceptor do tipo cone; *Rod*, fotorreceptor do tipo bastonete; *Horizontal cell*, célula horizontal; *Bipolar cell*, célula bipolar; *Amacrine cell*, célula amácrina; *Ganglion cell*, célula ganglionar. Fonte: Michael Freed capt. 11: The Retina in The handbook of Visual Optics, Vol 1: Fundamentals and Eye Optics.

Em todos os vertebrados a retina é formada por dez camadas de células, plexos nervosos e membranas limitantes, constituídas por prolongamentos de células de Müller (Ramon y Cajal,

1893) (Figura 2): 1. Camada do Epitélio Pigmentado (CEP), formado por células epiteliais com grânulos de pigmento; 2. Camada dos Fotorreceptores (CF), com os segmentos externos e internos de cones e bastonetes; 3. Membrana Limitante Externa (MLE), formada por prolongamentos de células de Müller; 4. Camada Nuclear Externa (CNE), formada pelos núcleos dos fotorreceptores (cones e bastonetes); 5. Camada Plexiforme Externa (CPE), onde ocorre contato sináptico entre fotorreceptores e células bipolares e horizontais; 6. Camada Nuclear Interna (CNI), com os corpos celulares de células bipolares, amácrinas e horizontais; 7. Camada Plexiforme Interna (CPI), de contato sináptico entre células bipolares e amácrinas e as células ganglionares; 8. Camada de Células Ganglionares (CCG), com os corpos celulares das células ganglionares e de células amácrinas deslocadas; 9. Camada de Fibras Nervosas (CFN), com axônios das células ganglionares; 10. Membrana Limitante Interna (MLI), formada por prolongamentos das células de Müller.

Uma das características mais notáveis do sistema visual é a ampla faixa de iluminação a que é capaz de responder: uma diferença de mais de dez unidades logarítmicas entre os limites inferior (a quantidade de luz emitida por uma única estrela numa noite de lua nova corresponde a uma intensidade de um fóton por fotorreceptor a cada hora, aproximadamente) e superior (um dia ensolarado na neve provê uma irradiação de aproximadamente cem mil fótons por segundo em cada fotorreceptor) (Rodieck, 1998). Para isto, a retina dispõe de diferentes tipos de fotorreceptores: os bastonetes que possuem maior sensibilidade, porém saturam com facilidade, e os cones, fotorreceptores inativos em condições escotópicas, mas que em função de não sofrerem saturação em resposta à luz, possibilitam a transição aos níveis mesópico e fotópico da visão (Burns & Lamb, 2003).

Os fotorreceptores são neurônios especializados, responsáveis por iniciar o processamento visual e transmitir a informação luminosa para as células da camada seguinte da retina com a liberação de neurotransmissor glutamato. Destacam-se quatro componentes principais nos fotorreceptores: segmento externo, segmento interno, o núcleo e o terminal sináptico. Os segmentos externos dos fotorreceptores são formados por discos membranosos que contém as moléculas de fotopigmentos visuais, responsáveis por iniciar o processo de fototransdução. Nos segmentos internos dos fotorreceptores estão contidas todas as organelas, incluindo o núcleo e as mitocôndrias. Os dois tipos de fotorreceptor se diferenciam

em aspecto funcional, relacionado a níveis de iluminação extremamente opostos, mas também em aspecto anatômico: a natureza delgada e cilíndrica dos bastonetes prioriza a detecção e a sensibilidade absoluta, embora deixe de pronunciar uma resposta a partir de níveis mais intensos de luz. Por outro lado, o formato e tamanho do segmento externo de cones, sugerido pelo próprio nome dado a estas células, restringe a captura de feixes de luz em intensidade e espectro luminoso inadequados. Em contrapartida, este grupo de fotorreceptores detecta com definição mais nítida e maior precisão temporal que os bastonetes. As diferenças conceituais entre cones e bastonetes serão contempladas, no entanto, para ocasião basta a ressalva de que estes dois tipos celulares demonstram grande semelhanças, em origem, configuração e atividade, e que podem ser atribuídas de maneira geral.

Em alguns grupos de vertebrados como primatas, aves e lagartos, a presença da fóvea, que correspondendo ao centro do campo visual, permite uma eficiente detecção de detalhes em alta resolução, resultado de uma alta concentração de cones e o deslocamento lateral das células das demais camadas da retina, que permite a passagem direta da luz. Este fato ilustra como a distribuição de cada população de células da retina destaca, diversamente para cada espécie, a importância da região visual em que se concentram, o que atrai interesses para o campo de ecologia visual: animais crepusculares, como o coelho, apresentam cones alinhados com a região visual correspondente ao horizonte, ao passo que o camundongo, roedor de hábito noturno, não necessita de região com maior acuidade visual; e em vez disso, a retina desta espécie prioriza a detecção de estímulos de baixa intensidade, sendo dominada por bastonetes (Masland, 2011).

Estes padrões de distribuição permitem um paralelo entre a morfologia e função. Podemos estender a outros tipos celulares da retina (e de todo sistema nervoso por consequência) o aprendizado de que, de acordo com seu formato e localização determinada, as células desempenharão diferente papel na codificação do sinal neural. Esta especialização torna-se particularmente relevante no caso de neurônios de última ordem da retina, as chamadas células ganglionares, que intermediam a transmissão resultante de todas outras camadas celulares da retina ao resto do sistema visual através do feixe de axônios do nervo óptico (Masland, 2011).

Exemplificaremos neste texto como a nomenclatura clássica, que compreende apenas dois tipos de fotorreceptores é limitada para descrever uma diversidade de elementos responsivos à luz na retina de vertebrados, baseada somente no formato de seu segmento externo. Mais recentemente na literatura foram descritas células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis (ipRGCs), contendo o fotopigmento melanopsina, e cujo processo de fototransdução é realizado também por receptores de membrana acoplado à proteína G. Esta via de estimulação está relacionada à manutenção de ciclos circadianos e não à formação de imagens visuais (Lucas et al., 1999; Berson et al., 2002). Fotorreceptores clássicos, responsáveis pela visão por sua vez, realizam o processo de fototransdução a partir das opsinas visuais, receptores de membrana da família dos receptores acoplados à proteína G. Essas proteínas de membrana são expressas por genes das famílias *lws*, *sws1*, *sws2* e *rh2*, no caso de cones, e o gene da família *rh1*, no caso de bastonetes (Yokoyama, 2002; Yokoyama & Yokoyama, 1996). Os progressos investigativos somaram novos critérios à nomenclatura dada aos fotorreceptores, como o formato de suas sinapses em pedículo e discos membranosos dos segmentos externos separados por vãos, no caso de cones; e formato das sinapses em esférula e discos membranosos contidos nos segmentos encerrados por membrana nos segmentos externos, no caso de bastonetes (Ali & Klyne, 1985). Apesar do auxílio de todas estas características, há casos que desafiam a divisão binária entre estas duas categorias, apresentando configurações intermediárias entre os dois extremos, com fotorreceptores cuja morfologia e funcionamento não obedecem a previsão estabelecida pelo gene de pigmento visual neles expressa (Simões et al., 2016a). Os primeiros indícios deste tipo intermediário de fotorreceptores foram descritas por Gordon Walls (1934, 1942) em anfíbios e répteis, segundo a Teoria da Transmutação. Este tema será melhor explorado na seção que compreende o sistema visual em serpentes.

1.3. Genética de opsinas

Dada a relevância da visão para o organismo, sua interação com o ambiente e sua repercussão sobre o comportamento, é um fato esperado que seus substratos biológicos apresentem especializações e adaptações para as diferentes necessidades impostas pelo nicho ecológico e a cena visual característicos de cada espécie: o hábito diurno ou noturno das

espécies está muitas vezes bem representado pela proporção entre as populações de cones e bastonetes na retina, como por exemplo a ausência de cones em lagartixas noturnas, e a ausência de bastonetes em camaleões e cobras estritamente diurnos (Walls, 1942).

De maneira similar à adesão de um estilo de vida demarcadamente noturno ou diurno, mudanças mais sutis na organização do sistema visual das espécies podem ser encontradas em adaptação aos níveis de intensidade e de qualidade espectral da luz do ambiente: em peixes de água rasa, por exemplo, é possível constatar a expressão de todas famílias de genes de opsinas de vertebrados, compreendendo uma ampla banda de respostas ao espectro de luz visível gerada pela sobreposição entre as diversas classes de fotorreceptores do tipo cone. Este tipo de substrato pode demonstrar-se útil para captar repentinas mudanças de cor provocadas pela ondulação das águas rasas, e confere a estes animais o potencial para a visão de cores em quatro a sete canais separadamente (Bowmaker & Hunt, 2006). Esta capacidade só poderia ser confirmada, no entanto, caso fosse comprovada a existência de mecanismo pós-receptoral que compare a taxa de respostas de cada população de cones, como representado nas células bipolares de organismos tricromatas. Em peixes de água profunda por outro lado, onde o meio de transmissão da luz torna-se mais opaco e filtra os comprimentos de onda mais longos, se verifica deslocamento do pico de sensibilidade espectral da opsina ($\lambda_{\max}$) em direção ao azul (Bowmaker & Hunt, 2006) e até mesmo o desaparecimento completo da classe funcional de fotorreceptores do tipo cone. É conveniente citar o exemplo de como a pressão ambiental é capaz de preponderar sua influência sobre a organização do sistema visual em relação ao grau de proximidade filogenética, quando contrapostas estas duas variáveis também em espécies de peixes pertencentes a diferentes ambientes fóticos (Levine & MacNichol, 1982).

Na origem das adaptações hoje manifestadas pelos sistemas visuais das diversas espécies, estão eventos de duplicação e diversificação sobre o gene ancestral das opsinas, do qual descendem cinco linhagens parálogas de genes, já presentes no ancestral dos vertebrados, há aproximadamente 400 milhões de anos: *rh1*, *rh2*, *sws1*, *sws2* e *lws* (Figura 3).

Figura 3. Árvore filogenética dos cinco grupos de opsinas visuais de vertebrados.

Modificado de Bailes et al., 2007.

De maneira simplificada, a existência de duas cópias de um mesmo gene permite que uma delas acumule mutações até que adquira características funcionais novas, ao passo que a outra retenha a sua função original. Em mamíferos e serpentes, destaca-se a ausência dos grupos de genes *rh2* e *sws2* (Yokoyama, 2002; Bowmaker & Hunt, 2006; Davies et al., 2009; Simões et al., 2016b). No caso das serpentes, entretanto, a quantidade de variações introduzidas na funcionalidade dos genes de pigmentos visuais devido a substituições de aminoácidos apresenta um potencial inédito, e provavelmente incomparável, constituindo importante modelo sistemático para a compreensão da evolução do sistema visual de vertebrados. Quando feita comparação do número de transições morfológicas sofridas nos fotorreceptores das diferentes espécies de serpentes, desde a aquisição da classe de cones duplos, perdas de classes de cones e bastonetes e as diversas transmutações entretanto, considera-se que os pigmentos visuais ainda tenham permanecido relativamente estáveis durante o histórico evolutivo destas espécies (Simões et al., 2016b).

A primeira etapa da fototransdução consiste na incidência da luz sobre a retina, no fundo do olho. Em sua passagem, a luz se desloca através do segmento interno de um fotorreceptor em direção ao segmento externo. Nestes, compactam-se discos membranosos, dotados de inúmeras moléculas transmembrânicas de fotopigmentos visuais acoplados a proteína G, compostos de uma fração proteica (a opsina ou rodopsina), que encapsula a fração cromófora, uma molécula de retinal derivado da vitamina A (Strader et al., 1994; Yokoyama & Starmer,

1996). Mediante a incidência de um fóton de luz, a molécula de retinal isomeriza-se da forma 11-cis-retinal para a fórmula estrutural *all trans*, liberando domínios catalíticos da opsina para uma cascata sinalizatória efetuada pela proteína-G acoplada. Isto resulta no fechamento de canais iônicos da membrana do fotorreceptor, e culmina na sua hiperpolarização, o que repercute sinalização de captura do estímulo visual ao parceiro pós-sináptico do fotorreceptor, pela alteração da taxa de liberação do neurotransmissor glutamato em suas sinapses (Burns & Lamb, 2003).

A molécula de retinal liga-se por meio de uma base de Schiff protonada ao aminoácido Lisina no sítio 296 da sétima hélice transmembrânica da opsina (Wald, 1935, 1955, 1968). Quando isolada em solução, o comprimento de onda com maior probabilidade de isomerizar a molécula de retinal, também chamado de pico de absorção espectral, absorbância ou $\lambda_{\max}$, é de 440 nm (Kito et al., 1968). A composição proteica da opsina altera o pico de absorção espectral do retinal a fótons com comprimentos de onda mais curtos ou mais longos, dependendo dos aminoácidos presentes em sítios específicos da proteína, próximos ao sítio de ligação do retinal (Yokoyama, 2008). Deste modo, substituições de aminoácidos constituem passos cumulativos de deslocamento do pico espectral característico de cada classe de opsina, devido a sítios de interação entre sua estrutura proteica e a molécula cromófora (Yokoyama, 1997) (Figura 4).

Figura 4. Estrutura Secundária da rodopsina RH1 bovina demonstrando sítios de mutações de aminoácidos que ocorrem naturalmente e causam deslocamento significativo do pico de absorção espectral.

Círculos azuis, vermelhos e pretos indicam os sítios envolvidos no deslocamento dos pigmentos SWS1, LWS/MWS e RH1/RH2, respectivamente. A molécula cromófora de retinal está representada em laranja. O modelo é baseado em Palczewski et al. (2000). (Yokoyama, 2002).

Pigmentos visuais representam um dos exemplos mais característicos de como os eventos de duplicação e expressão gênica, e substituições em sequências de aminoácidos são capazes de demonstrar a influência de pressões adaptativas do ambiente e do comportamento (Simões et al., 2016b).

Tal compreensão da genética molecular de opsinas tem contribuído para o desenvolvimento da ciência visual. Este conhecimento é ampliado a partir de comparações interespecíficas, permitindo rastrear a origem e os processos de diferenciação sofridos pelos pigmentos visuais, que determinam as bases moleculares para o ajuste espectral das respectivas opsinas encontradas (Yokoyama, 2000). No esforço de compreender as correlações entre estrutura e a absorção espectral das opsinas, é necessário reconstituir seu histórico filogenético, com respeito às diferentes sequências de aminoácidos assumidas e respectivas mudanças nas propriedades de absorção espectral (Yokoyama, 1997). Dadas as adaptações evolutivas a diferentes ambientes, revelam-se nas opsinas de diferentes espécies, substituições de aminoácidos comuns à conquista de um determinado ambiente fótico e a respectiva composição espectral de cena. Comparações deste tipo, envolvendo as bases moleculares em

relação à pressão evolutiva do ambiente, tem contribuído inclusive para refinar a atual taxonomia das espécies (Yokoyama, 2000). Ainda assim, permanece o desafio de sistematizar interações entre as diversas mudanças anatômicas, fisiológicas e comportamentais a nível macroscópico e molecular (Yokoyama, 1997, 2000).

O grupo gênico *rh1* expressa rodopsinas, fotopigmentos geralmente presentes nos bastonetes. O ajuste espectral do pigmento visual *rh1* geralmente apresenta correlação com 7 resíduos de aminoácidos: 83, 122, 207, 211, 265, 292 e 295 (Yokoyama, 2000). Com $\lambda_{\max}$ próximo a 500nm (Yokoyama, 2000), tradicionalmente o fotopigmento RH1 é considerado responsável por visão exclusivamente monocromática, entretanto, esta não é uma característica própria ao bastonete ou à rodopsina: trabalhos mais recentes relatam interação deste tipo celular com fotorreceptores que expressam fotopigmento SWS1 e SWS2, estando envolvidos com a oponência cromática com comprimentos de ondas curtos na visão noturna (Joesch & Meister 2016; Yovanovich et al., 2017).

O grupo *sws1* expressa fotopigmentos com sensibilidade espectral entre 420 e 360 nm, estando associada com a absorção de comprimentos de onda curtos, entre o azul e o ultra-violeta (UV), comprimento de onda este imperceptível à visão humana. A sensibilidade ao UV desempenha em outras espécies, entretanto, o reconhecimento de padrões de iluminação celeste, incluindo possivelmente a detecção de campos magnéticos (Niessner et al., 2011); o reconhecimento de padrões de coloração em animais e plantas; traços de luz UV refletida pela urina e fezes de roedores, e feromônios de acasalamento, capazes de refletir ou absorver comprimentos de luz UV (Sillman et al., 1999). De maneira geral, o resíduo 86 da opsina SWS1 é o fator de maior relevância para o pico de absorção espectral, de forma que a presença do aminoácido fenilalanina, determina sensibilidade espectral na faixa do UV (Cowing et al., 2002; Fasick et al., 2002; Davies et al., 2009), enquanto a substituição por tirosina é capaz de deslocamento expressivo de 60nm de seu $\lambda_{\max}$ a partir do UV (360nm) em direção ao azul (420nm) (Parry et al., 2004; Hauser et al., 2014).

O grupo *lws* é evolutivamente o mais precedente e conservado dos genes de pigmentos visuais, compreendendo sensibilidade a comprimentos de onda entre 520 e 570nm, espectro de luz visível refletida pela cobertura vegetal e por consequente, a maior parte da superfície terrestre. Estudos de expressão do gene *in vitro* apontam para que os sítios responsáveis pelo seu deslocamento espectral estejam compreendidos nas posições 164, 181, 261, 269 e 292

(Yokoyama & Radlwimmer, 1999). Dados os objetivos deste trabalho, serão omitidas informações a respeito das famílias dos fotopigmentos visuais SWS2 e RH2, ausentes nas serpentes.

No início, estudos de espectro de absorbância das opsinas progrediam a partir dos registros obtidos pela técnica de microespectrofotometria (MSP) para revelar a curva de absorbância das moléculas originais de opsina, e então a curva de absorbância de opsinas modificadas em laboratório por substituições de aminoácidos de sítios candidatos (técnica de mutação sítio-direcionada). Posteriormente, foi possível averiguar que as substituições significativas (que deslocam o pico de absorção espectral da opsina) acumulam-se, aumentando o deslocamento da absorbância no mesmo sentido, ou subtraem-se, caso a substituição seja revertida (Yokoyama & Radlwimmer, 1999). Mutações em sentidos opostos, entretanto, não necessariamente deslocam os picos de absorção no sentido oposto e com o mesmo grau, como observado ao se comparar o efeito da mutação G90S no fotopigmento RH1 e da mutação S90G no fotopigmento SWS1, onde ambas reduzem o pico de absorção em 13 nm e 7 nm, respectivamente. Desta forma, as alterações promovidas em laboratório não devem ser livremente extrapoladas para hipóteses a respeito da história natural das espécies (Yokoyama, 2008). Atualmente, a técnica de MSP ainda é empregada para a observação direta das curvas de absorção espectral de pigmentos visuais. No entanto, o acúmulo de dados de MSP permitiu consolidar estimativas indiretas das curvas de absorção espectral das opsinas, baseadas somente na sequência de aminoácidos das opsinas, o que constitui uma metodologia complementar para a inferência indireta dos picos de absorção, ainda que não torne desnecessária a medição direta do espectro de absorbância por meio da técnica de MSP (Yokoyama, 2002).

1.4. Visão de serpentes: fotorreceptores e fotopigmentos visuais

Uma comum aceção equivocada é a de que serpentes não possuem o sentido da visão desenvolvido, ou que confiam primordialmente a outros sentidos a fonte principal de extração de informação do ambiente. Se por um lado é verdadeiro que determinados grupos de serpentes apresentam de fato a visão degenerada, enquanto outras combinam modalidades sensoriais divergentes da tricromacia convencional de primatas, como visão de comprimentos de onda UV

ou a sensibilidade ao infra-vermelho, além da quimorrecepção (Davies et al., 2009); por outro lado há grupos de serpentes que confiam a procura de presas a uma visão binocular aguçada, com a retina provida de fóvea (Walls, 1942; Simões et al., 2016b). Em todo caso, o que deve prevalecer em evidência para a ecologia visual não se trata de como o sistema visual das serpentes pode ser particularmente poderoso ou incipiente em determinada espécie, mas sim como demonstra vasta adaptabilidade, ao acompanhar os diferentes estilos de vida das mais de 3.500 espécies catalogadas, incluindo as de hábito noturno, diurno ou crepuscular, e as de habitat fossorial, arbóreo, terrestre e aquático, tratando-se de um dos grupos mais diversos e notáveis de variação adaptativa do sistema visual de vertebrados (Simões et al., 2016b). As variações dos padrões de atividade (diurna ou noturna) e uso de habitat parecem ser fatores de forte influência sobre as características do sistema visual, como a sensibilidade espectral dos pigmentos visuais, a densidade e distribuição de neurônios nas retinas e o poder de resolução espacial do olho (Hauzman, 2014).

Apesar de serpentes apresentarem estrutura ocular relativamente conservada entre suas inúmeras famílias, há riqueza de vestígios evolutivos na organização da retina. Particularmente em seus fotorreceptores, que em algumas espécies podem apresentar modalidades transicionais entre cones e bastonetes, como sustenta a Teoria da Transmutação (Walls, 1942), acompanha-se uma vasta diversidade ambiental e ecológica destes animais, proporcionando no estudo deles, oportunidade única de aprofundamento dos estudos de ecologia visual pela interface entre os dois polos: de nicho ecológico, e organização do sistema visual (Simões et al., 2016b).

Alguns exemplos mais marcantes da complexidade da categorização dos fotorreceptores em serpentes incluem (1) fotorreceptores de segmento externo alongado porém de formato cônico no caso da serpente noturna da família Colubridae, *Telescopus fallax*, apontando para a existência de cones transmutados em bastonetes; (2) fotopigmentos visuais com pico de absorção espectral típica de cones na retina da serpente colubrídea noturna *Hypsiglena* sp, antes considerada como possuidora de apenas bastonetes; (3) cones diminutos com segmentos externos semelhantes ao de bastonetes e expressando o gene *rh1* em colubrídeo *Tamnophis proximus*; (4) fotopigmentos visuais com pico de absorção típico de bastonetes (~500nm) na retina de serpentes marinhas com fotorreceptores cujo segmento externo apresenta morfologia típica de cones (Simões et al., 2016a).

A enorme plasticidade da retina dos ofídios é fascinante, compreendendo mudanças nos padrões de fotorreceptores, incluindo os tipos intermediários de fotorreceptores identificados pela teoria da transmutação (Walls, 1942) em eventos recorrentes, distribuídos mesmo em linhagens distantemente relacionadas. Walls (1942) sustenta um período evolutivo em que separam-se conjuntamente da linhagem ancestral de lagartos, o ancestral comum das serpentes e de lagartos de hábitos fossoriais, devido ao grau de dedicação à fossorialidade estrita, com base nas mudanças morfológicas demonstradas pelo corpo, como o desaparecimento dos membros, ouvido e olho parietal, e a anatomia característica de seus olhos, como a presença de espectáculo, formato de pupila em fenda, o aparato de acomodação do cristalino, e o desaparecimento das gotículas de óleo dos fotorreceptores, que apenas um mero hábito noturno superficial não foi capaz de requerer em lagartos (Walls, 1942). A suposição inicial de Walls sustentava um estilo de vida mais distante do hábito diurno e terrestre superficial, e progressivamente mais dedicado à conquista do hábito noturno, e eventualmente da fossorialidade estrita, pelo ancestral comum das serpentes, que teria adquirido a mesma configuração do sistema visual degenerado de serpentes escolecofídeas (Walls, 1942). Uma consequência radical proveniente desta hipótese seria a de que, sendo todos outros grupos de serpentes posteriores aos escolecofídeos, eles teriam, após um retorno gradual aos inúmeros outros ambientes e nichos ecológicos que ocupam atualmente, reconstruído e redesenvolverido seu sistema visual a partir do estado degenerado, incluindo o reaparecimento das classes funcionais de cones, prosseguida de uma fase adaptativa ao hábito diurno, com o desaparecimento de bastonetes, então revertida pela adoção de estilo de vida noturno em certas espécies cuja retina é povoada inteiramente por bastonetes e cones transmutados em bastonetes. Este exemplo de adaptabilidade extrema é improvável, ao antagonizar esta suposta configuração original degenerada. Tamanho feito inigualado é contestado em ampla medida, pelo fato de as serpentes escolecofídeas terem perdido os genes de pigmentos visuais *lws* e *sws1* e classes funcionais de cones, que por outro lado são expressos em todas outras famílias de serpentes e mesmo nas espécies de lagartos de hábito fossorial (Simões et al., 2015). Isto aponta para uma contraposição à teoria inicial de Walls pela sugestão de que escolecofídeos em realidade, representam uma forma extrema de adaptação ao hábito fossorial dedicado, cujas características provavelmente não foram compartilhadas pelo ancestral comum das serpentes e por serpentes mais avançadas, que retiveram a configuração original da retina em vez de reconstituí-la (Simões et al., 2015). Está em discussão ainda a hipótese de que a serpente

ancestral teria divergido de lagartos por conta da conquista do ambiente aquático, como sustentado pelo mecanismo de acomodação do foco de incidência da luz sobre a retina, que desloca o posicionamento do cristalino, como visto em peixes, em vez do controle de seu formato pelos músculos ciliares, como visto em lagartos (Caprette, 2003).

Na riqueza de configurações morfológicas da retina na ordem Squamata (lagartos, serpentes e anfisbenídeos), é possível rastrear curiosos casos de adaptações anatômicas e das opsinas em seu sistema visual, acompanhando as diversas mudanças de ambiente evolutivo. Notável é a averiguação de que certos tipos morfológicos de cones na retina de serpentes estritamente diurnas expressam a rodopsina (Simões et al., 2016a), pigmento visual presente geralmente nos bastonetes, e consistem, portanto, em uma adaptação anatômica e fisiológica para a mudança de hábito e de cena visual referida pela teoria da transmutação de Walls (1942). Ademais, certas serpentes de hábito noturno apresentam além de bastonetes, tipos morfológicos de fotorreceptores alongados que expressam pigmentos visuais relacionados a cones, evidenciando a natureza biunívoca da teoria da transmutação (Simões et al., 2016a).

Estudos mais recentes em serpentes visam a estrutura genética e o espectro de absorbância das opsinas; a configuração morfológica de fotorreceptores e aspectos da dinâmica eletrofisiológica dos fotorreceptores em que estão contidas, e ademais a caracterização proteica das transducinas, proteínas G cuja ativação leva ao fechamento de canais iônicos nestes tipos celulares, como forma de revelar no histórico evolutivo, qual a verdadeira origem das conformações que se apresentam em suas retinas (Schott et al., 2016).

Walls (1942) também inferiu erroneamente a taxonomia de serpentes diurnas e noturnas, induzido pela especulação espúria de que o pigmento visual rodopsina expresso pelo fotorreceptor fosse a característica determinante para definí-lo como próprio da visão escotópica, desconsiderando outros fatores. A omissão da presença da rodopsina em retinas compostas inteiramente de fotorreceptores com semblantes de cones ou bastonetes, respectivamente em serpentes diurnas e noturnas, o levou à falsa conclusão de que estas teriam se derivado evolutivamente daquelas, em uma tentativa de reconquista do período noturno (Simões et al., 2016a). Investigações posteriores com base em dados anatômicos levam a concluir que em todas as serpentes estudadas em que se acreditavam estar ausentes os bastonetes, em realidade expressam o gene para pigmento visual *rh1* e que este pode estar cumprindo funções de tricromacia em níveis mesópicos; ao passo que em todas as serpentes estudadas em que acreditavam estar ausentes

os cones, em realidade expressam os pigmentos visuais *sws1* e *lws* típicos de cones, refinando a teoria da transmutação para um novo patamar, seja ele: que a transmutação de cones com funcionamento e morfologia de bastonetes é provavelmente um evento independente e especializado a partir do formato original da retina ancestral, análogo mas não oriundo, do formato de retina dominada por cones, como sustentado por Walls (1942) ao analisar a retina de colubrídeos diurnos. Pelo que se sabe, a existência de bastonetes que se assemelham a cones evolui em pelo menos duas linhagens independentes de serpentes, em colubrídeos e em elapídeos, também o mesmo número de eventos em que surgem evolutivamente cones transmutados, com aspecto de bastonete. Desta forma que o ancestral comum de serpentes provavelmente já expressava os três fotopigmentos *rhl*, *sws1* e *lws* em fotorreceptores do tipo bastonetes e cones típicos (Davies et al., 2009; Simões et al., 2016a).

Os estudos de Gordon Walls (1942) sublinham a proximidade filogenética entre lagartos e serpentes, cuja similaridade é imprevista por outras comparações interespecíficas. Entretanto, demarcando uma clara distinção entre ambos, a presença de espectáculo, uma escama transparente que reveste o globo ocular de serpentes, ausente, entretanto, em lagartos, indica o surgimento evolutivo deste órgão em serpentes, em associação à atividade de seu ancestral comum, de hábito provavelmente fossorial, aparato de que seus descendentes diurnos não foram capazes de substituir pela presença de pálpebras móveis, como visto em lagartos. A perda de gotículas de óleo nos fotorreceptores, e no caso de algumas serpentes diurnas, o aparecimento de cristalino amarelado, responsável por filtrar comprimentos de onda de luz UV (Simões et al., 2016b), são outras duas características demarcantes para a hipótese de que o ancestral das serpentes procurava evitar a luz intensa, pois são ambas ausentes em espécies de lagarto meramente noturnas. Sugere-se a partir disso que as serpentes tenham se diferenciado a partir de um ancestral comum compartilhado por lagartos fossoriais, hábito, entretanto, mantido ainda por certas famílias de lagartos e de serpentes, e que explicaria a adaptação para o formato de corpo alongado, a ausência de membros, e o desaparecimento do ouvido externo (Walls, 1942).

Serpentes podem ser subdivididas em três principais superfamílias: Scolecophidia inclui as cobras-cegas e serpentes de hábito estritamente fossorial, dotadas de sistema visual degenerado, incluindo olhos pequenos e atrofiados, com apenas bastonetes e ausência de cones, em que se constata inclusive, perda da expressão de genes relacionados a cones e visão diurna (Simões et al., 2015). O representante mais antigo deste clado é um fóssil de 65 milhões de anos, o mesmo

período do fóssil mais antigo de lagartos fossoriais (Standhart, 1986). Henophidia, segundo grupo parafilético de serpentes, apresenta a superfamília das maiores serpentes do mundo, incluindo boídeos e pítons que surgem evolutivamente há aproximadamente 65 milhões de anos (Rage, 1987). Neste grupo intermediário é possível observar a presença de retina duplex, compreendendo uma vasta maioria de bastonetes, em proporções de aproximadamente 90% aliada a uma minoria de cones, que pode explicar sua adaptabilidade a hábitos diurnos e crepusculares apesar de sua prevalência em hábito noturno (Sillman et al., 1999). A terceira superfamília Caenophidia (serpentes “avançadas”) compreende o maior número e a maior diversidade de espécies de serpentes, incluindo viperídeos, elapídeos e colubrídeos diurnos e noturnos. Entre colubrídeos diurnos e elapídeos é possível constatar uma variedade de tipos de cones e a ausência de bastonetes, ao passo que colubrídeos noturnos apresentam retinas compostas inteiramente de tipos morfológicos semelhantes a bastonetes (Walls, 1942.). Viperídeos, que possuem natureza reconhecidamente noturna surgem evolutivamente há aproximadamente 20 milhões de anos (Rage, 1987) e aparentemente retiveram o padrão ancestral de retina duplex, com predominância de bastonetes, como observado em henofídeos, porém introduzindo nesta organização a presença de cones duplos, dotados de dois segmentos externos apesar de ainda menos contemplados pela literatura (Solis, 2017).

A organização típica do sistema sensorial de serpentes da família Viperidae é chamativa ao manter, à exceção da introdução de cones duplos (Walls, 1942), a mesma configuração daquela de henofídeos, incluindo a projecção do sentido de comprimentos de onda infravermelhos aos centros visuais (Newman & Hartline, 1982) e a retina duplex, com duas classes de fotorreceptores do tipo cone em meio a uma prevalência absoluta de bastonetes. Estudos de MSP com as opsinas de henofídeos *Python regius* (Sillman et al., 1999) e *Boa constrictor imperator* (Sillman et al., 2001) revelam picos de absorção similares, em 550nm e 360nm, ao passo que as rodopsinas aparecem com pico em aproximadamente 495nm. Este parece ser um modelo robusto e versátil, que explicaria o sucesso evolutivo da flexibilidade de um hábito não estritamente noturno em ambos grupos, viperídeos e henofídeos, coincidindo com o de presas crepusculares como roedores, insetos e anelídeos (Davies et al., 2012).

Mais notavelmente, o modelo de retina apresentado por estes dois grupos replica evolutivamente a mesma configuração demonstrada pela retina de mamíferos, cujos fotorreceptores são desprovidos de gotículas de óleo e dominadas pela presença de bastonetes,

além da perda de expressão dos genes *rh2* e *sws2* como demonstrativos de uma pressão evolutiva no sentido da noturnidade compartilhada pelos mamíferos (Davies et al., 2012).

A baixa representatividade de viperídeos em estudos de ecologia visual ainda traz dúvidas a respeito da identidade de seus fotorreceptores, catalogados pela morfologia, porém ainda desconhecidos segundo os seus genes de expressão. Progressos neste sentido levariam a concluir se o grau de proximidade adaptativa estaria de alguma forma representada também por possíveis transmutações dos fotorreceptores que levaram a uma convergência adaptativa na disposição de suas retinas.

Família Viperidae

Em vista da diversidade da família de viperídeos, sugerere-se o interesse em comparar diferenças entre habitantes de floresta e espécies de habitat aberto, examinando divergências e similaridades dentre espécies em possível relação a respectiva ecologia (Sazima, 1992). A subfamília Crotalinae possui como sinapomorfia a presença de fosseta loreal, par de orifícios localizados entre as narinas e os olhos, responsável pela detecção de estímulos térmicos. Crotalíneos possuem grande diversidade biológica, representando cerca de 75% das espécies de viperídeos e 6% das espécies de serpentes. Ocupam uma diversidade de biomas e habitats em três continentes e predam desde insetos e ovos de aves, a mamíferos (Greene, 1992). Serpentes crotalíneas possuem refinada sensibilidade a variações térmicas, sistema este utilizado para localização de presas, dentre outras funções. Os receptores dos terminais da fosseta loreal projetam para o colículo superior, de forma que as espécies desta subfamília possivelmente sejam capazes de formar uma imagem resultante da integração entre imagens visuais e a percepção no espectro infra-vermelho (Newman & Hartline, 1982).

Dois gêneros de serpentes crotalíneas são altamente abundantes no Brasil e responsáveis pelo maior número de acidentes ofídicos registrados, o gênero *Bothrops* que compreende as jararacas, jararacuços e cotiaras, e o gênero *Crotalus*, com as serpentes conhecidas popularmente como cascaveis. Serpentes do gênero *Bothrops* estão presentes em todas Américas e com a maioria das espécies no Brasil. Atraem grande relevância de estudo do ponto de vista médico, já que são responsáveis por cerca de 80-90% dos 20.000 acidentes ofídicos registrados anualmente no Brasil (Amaral et al., 2001). Responsável pelos maiores

índices de morbidade nas Américas, há cerca de 45 espécies de serpentes do gênero *Bothrops* (Uetz & Hosek, 2018). A maioria das espécies é terrestre embora muitas possuam capacidade para escalar árvores, e o façam com frequência (Campbell & Lamar, 1989). Habitam ambientes úmidos como a mata e áreas de cultivo, ou ainda onde roedores proliferam-se, como zonas rurais e periferias de grandes cidades. Exibem hábito noturno e crepuscular como os da presa, geralmente roedores. Serpentes do gênero *Crotalus*, por sua vez, são facilmente identificadas pela presença de cauda com chocalho. Cerca de 30 espécies de populações isoladas de cascavéis habitam principalmente desertos e cerrados por através do continente americano (Campbell & Lamar, 1989). Cascavéis costumam ser noturnas e tendem a evitar o dia durante as épocas de maior calor, porém expõem-se mais frequentemente à insolação entre o outono e a primavera quando as temperaturas são mais amenas. Apesar do peso relativamente elevado e da adaptação ao ambiente terrestre, há inúmeros registros de indivíduos que escalam moitas e árvores. Espécies deste gênero geralmente predam pequenos vertebrados como lagartos, roedores, aves, anfíbios e outras serpentes (Campbell & Lamar, 2004).

Duas espécies destes dois gêneros de serpente se destacam pela alta frequência na região sudeste do Brasil, e grande número de acidentes, *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* (Figura 5).

Figura 5. Serpentes *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus*.

À esquerda, fotografia de espécime de *Bothrops jararaca* (imagem: Renato Augusto Martins). À direita, fotografia de espécime de *Crotalus durissus terrificus* (imagem: Pedro H. Martins).

A espécie *Bothrops jararaca* é a mais abundante das espécies de *Bothrops* na região sudeste do Brasil, e apresenta ampla distribuição geográfica, desde a Bahia até o Rio Grande do

Sul. Possuem preferência por florestas e no Sudeste brasileiro coincide com o ecossistema da Mata Atlântica. Demonstram grande resistência a perturbações ecológicas, ocupando descampados e áreas próximas à cobertura vegetal, incluindo áreas de cultura, como por exemplo a soja e a cana de açúcar. Notavelmente, são capazes de habitar o interior e imediações de grandes cidades, como São Paulo, onde foi registrada sua ocorrência em concentrações de “áreas verdes”, áreas remanescentes de degradação florestal como parques, e também terrenos baldios (Sazima, 1992).

Terrestre e de grande porte, *C. durissus* tem ampla distribuição geográfica, do México e América Central, até a América do Sul. A espécie é encontrada em regiões do semiárido, incluindo a caatinga (Campbell & Lamar, 2004), o cerrado, florestas tropicais secas, descampados relativamente secos dentro das florestas tropicais, florestas caducifólias, florestas de coníferas e pradarias (Campbell & Lamar, 1989).

Já se despertava interesse investigativo ao destacar a insuficiência de estudos que comparassem, dentre o diverso grupo de viperídeos, habitantes de mata fechada com habitantes de descampados, revelando divergências e similaridades entre espécies em relação a suas ecologias e relações presumidas, e o pontencial da influência adaptativa deste fator ambiental (Henderson et al., 1987; Greene, 1992; Sazima, 1992; Shine, 1989). Para este estudo também se torna conveniente a constatação de que a presença de cobertura vegetal densa é capaz de interferir na qualidade espectral da cena ao incrementar a presença de comprimentos de onda mais longos (Veilleux & Cummings, 2012). Comparar o sistema visual destas duas espécies de viperídeos de uma mesma subfamília oferece uma oportunidade privilegiada de avaliar a influência adaptativa deste fator (Solis, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

Ferimentos e óbitos devido a acidentes com cobras ocorrem nos cinco continentes, especialmente nos trópicos, onde representam um grande problema de saúde pública (OMS, 1981). Dados do Ministério da Saúde estimam média total de 20.000 casos anuais de acidentes ofídicos no Brasil, com procedência maior na região Sudeste, onde há concentração populacional expressiva e melhor organização dos serviços de saúde e informação (Amaral et al., 2001). No Brasil e na América do Sul, os principais gêneros de serpentes peçonhentas são viperídeos do gênero *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*; e elapídeos do gênero *Micrurus*, cujos acidentes ofídicos constituem quadro epidemiológico relevante devido a frequência e gravidade (Amaral et al., 2001). Atividades econômicas do setor primário são uma importante causa de aproximação entre o ser humano e animais considerados perigosos: a urbanização e o desflorestamento são processos contíguos à implementação da agricultura e pecuária, que possuem impacto significativo no Brasil. As zonas onde ambos estes processos geográficos convergem originam as áreas de maior risco de acidentes ofídicos envolvendo seres humanos (Lima et al., 2009).

Na região central e sul do Brasil, os principais responsáveis por acidentes ofídicos são as espécies *Bothrops jararaca*, e em menor escala, acidentes envolvendo *Crotalus durissus* (Campbell & Lamar, 1989). O desenvolvimento de áreas de cultivo (cana-de-açúcar e fruticultura, entre outros) e a urbanização são processos pertinentes ao desenvolvimento econômico, e aumentam as probabilidades de contato entre o homem e as serpentes, considerando tanto incursões em seu *habitat* natural, como o contato em áreas recém-ocupadas por novas moradias (Lima et al., 2009).

O crescimento urbano ocasiona a ocupação de áreas íngremes, onde haveria preservação de cobertura vegetal, geralmente sem o acompanhamento de condições básicas de saneamento e infra-estrutura. Observa-se o acúmulo de detrito nestas áreas, ocasionando roedores e pragas domésticas que atraem o aparecimento de serpentes. No caso de serpentes com hábito noturno, o quadro pode ser subestimado pois não há coincidência com os horários de atividade humana. O acidente ofídico torna-se progressivamente uma realidade urbana, para além de sua incidência rural (Cardoso et al., 2003). Dados mais recentes de coleta de indivíduos no Instituto Butantan apontam para o fato de que o desmatamento de florestas no Sudeste brasileiro encolhe a quantidade de habitats adequados para *B. jararaca* ao passo que a

quantidade de habitats propícia para *C. durissus* aumenta (Sazima, 1992). Estes fatos, apontam para a grande importância da ampliação dos conhecimentos acerca da biologia e comportamento destas espécies de serpentes, incluindo características de seus sistemas sensoriais.

A subordem das serpentes atrai interesse investigativo como consequência da dispersão nos diversos continentes, pela variedade de hábitos, comportamentos e desempenho de nicho ecológico, perdurando controversa quanto à taxonomia e a origem em relação a um ancestral comum. As distintas pressões seletivas do ambiente selecionam características particulares, investigadas por meio de estudos da morfologia, ecologia e comportamento das espécies, ainda pouco aprofundados no caso das serpentes.

O estudo morfológico da retina promove a interface entre as áreas citadas enriquecendo o campo da neurobiologia comparativa e da ecologia visual. Beneficia-se de uma quantidade significativa de informação a relativo baixo custo: a anatomia da retina é a mais acessível do sistema nervoso central de vertebrados e investigada com maior facilidade devido à disposição laminar de seus neurônios e sinapses. Privilegiadamente, é possível enriquecer questões conceituais por meio de estudos comparativos entre as espécies.

3. OBJETIVOS

- Comparar, por meio de análise genética, as sequências de nucleotídeos dos genes de opsinas expressos nas retinas de duas espécies de serpentes Viperidae, *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus*.
- Estimar o pico de absorção espectral de cada opsina, a partir da sequência de aminoácidos encontrada.
- Comparar a morfologia dos tipos de fotorreceptores que contém as diferentes opsinas expressas nas duas espécies.
- Verificar possíveis influências do uso de habitat sobre a evolução do sistema visual.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados para este projeto 3 animais de cada espécie *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus*. As serpentes capturadas e entregues por fornecedores do Instituto Butantan, São Paulo, foram obtidas junto à Recepção de Serpentes do Laboratório de Herpetologia. Os animais foram acondicionados em caixas plásticas, com água, em ambiente próprio para sua manutenção. A eutanásia foi promovida com dose letal do anestésico Thionembutal (princípio ativo tiobarbiturato etil sódico, dosagem 100 mg/kg). Após a enucleação dos olhos e dissecação das retinas, os exemplares foram fixados para inclusão na coleção herpetológica Alphonse Richard Hoge, do Instituto Butantan. Os procedimentos com os animais estão de acordo com os princípios éticos de manejo e experimentações com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este projeto teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (CEUA no 1805090417 – Anexo 1).

4.2 Genética de opsinas

4.2.1 Isolamento de RNA total e síntese de DNA complementar

Para estudo da expressão dos genes de opsinas, os olhos de um indivíduo de cada espécie foram enucleados e preservados em RNA later (Ambion) e mantidos a 4°C. O RNA total foi extraído com uso do RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), conforme protocolo do fabricante. Uma diluição de 1 em 10 de RNA das retinas foi preparada com 500 ng de primer oligo-dT (12-mer) e convertido para fita simples de DNA complementar (cDNA) usando a enzima transcriptase reversa MultiScribe™ MuLV (Applied Biosystems™, Foster City, California, USA), seguindo o protocolo do fabricante.

4.2.2 Amplificação do cDNA por reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento

Reações de PCR foram realizadas para amplificar a sequência de nucleotídeos dos genes de opsinas. Conjuntos de *primers* específicos para opsinas de serpentes foram obtidos a partir de estudo anterior (Hauzman, 2014; Hauzman et al., 2017), ou desenhados com uso do programa Primer 3 (v.0.4.0) (Untergrasser et al., 2012) (Tabela 1). O kit utilizado para as reações de PCR

foi o Taq Platinum (Life Technologies, California, USA) e as condições para cada par de *primer* foram: desnaturação inicial a 94°C por 1 min; 37 ciclos a 94°C por 15 seg, temperatura de *annealing* variada, por 30 seg, temperatura de extensão de 72°C por 30 seg; e extensão final a 72°C, por 10 min.

Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% e mantidos a -20°C até a purificação. A purificação foi feita com o Kit *Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Os sequenciamentos foram feitos diretamente com o kit *Big Dye Terminator* (Applied Biosystems), em sequenciador 3500 da Applied Biosystems, do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa do Hospital Albert Einstein. As sequências foram analisadas com o programa BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999).

Para estimativa do pico de sensibilidade espectral das opsinas, foram identificados aminoácidos presentes em sítios reconhecidamente influentes no deslocamento espectral de cada pigmento visual, previamente descritos pela literatura.

Tabela 1: *Primers* utilizados e respectivas temperaturas de anelamento.

Primer	Opsina	T. anelamento	Sequência de Nucleotídeos do <i>Primer</i>
LWS DegFw	LWS	62,4	5' GRYCCTTTTGAAGGYCCAAAYTAYC 3'
LWS DegRv	LWS	62,8	5' GTTGTAATGGTKGCGCTTTTGT 3'
LWS F1	LWS	59,5	5' ATGACAGAGGCCTGGAATGT 3'
LWS R2	LWS	60,0	5' CCTTGCTGGCATTCTCTTCT 3'
LWS LpoeFw	LWS	62,5	5' GTGTATTTGCTTACACCAATAGCAACA 3'
LWS LpoeRv	LWS	63,4	5' AAAATGTATATGGTCCCCAGCAGAC 3'
LWS TdorFw	LWS	61,6	5' TTTACTTACACCAACAGCAACAATACC 3'
LWS TdorRv	LWS	61,5	5' TTCATGAAGACATAGATAATTGGGTTG 3'
SWS1 F1	SWS1	55,6	5' CCTCTTTGAAAACATCTCCTC 3'
SWS1 R2	SWS1	59,8	5' GTCCTCCTGTCAAGTCAGCC 3'
SWS1 TdorFw	SWS1	63,7	5' CTTTCCACTTCCAAACCATCTTCAT 3'
SWS1 TdorRv	SWS1	63,4	5' TTCTGAGAAGTCACATCAGAGTCGT 3'
SWS1 XenFw	SWS1	60	5' ACGGTCCCCAGTATCACAT 3'
SWS1 XenRv	SWS1	60	5' CTGACTTGACAGGAGGACAC 3'
Rh1 BitisFw*	Rh1	59,3	5' TGGAAATATTCTGCCTTGAGTGC 3'
Rh1 BitisRv*	Rh1	58,6	5' TCACTGGATTGTAGATTGAAGAGC 3'
Rh1 CausFw*	Rh1	58,9	5' ATTCTGCCTTGAGTGCGTATATG 3'
Rh1 CausRv*	Rh1	59,6	5' GGTGATCATAAGTTGCGGAAC 3'
Rh1 OxyFw	Rh1	64,5	5' GTCACCATCCAACACAAGAACTCA 3'
Rh1 OxyRv	Rh1	64	5' AAATCACTGGGTTGTAGATTGAAGAGC 3'
Rh1 SmikFw	Rh1	65,8	5' TATTTGGCAGATCCATGGAAATATTCTG3'
Rh1 SmikRv	Rh1	66,1	5' GGGGAAACCTTACTTGTGGAGACTGTAG3'
Rh1 Tdor2Fw	Rh1	60	5' CAAGAACTCAGAACACCTCTGAA 3'
Rh1 Tdor2Rv	Rh1	60	5' CGGAAGTGTGTTTCATTACGATA 3'
Rh1 Tdor3Fw	Rh1	60	5' GTTCTTCTGATTCTGCTTGGAT 3'

4.3. Estimativa das curvas de absorção espectral das opsinas

Aminoácidos em sítios específicos envolvidos no deslocamento espectral de cada um dos genes sequenciados, Rh1, LWS e SWS1, foram considerados para a inferência do pico de absorbância espectral das opsinas das diferentes espécies de serpentes. As sequências de aminoácidos das três opsinas foram alinhadas e as posições dos aminoácidos foram determinadas com base na sequência da rodopsina bovina (número de acesso no GenBank NM001014890).

As curvas de sensibilidade espectral foram estimadas a partir do método descrito por Stockman & Sharpe (2000), adaptado pelo Dr. Balázs Vince Nagy, de acordo com a fórmula:

$$\log_{10} [t_{OD}(x)] = a + b x^2 + c x^4 + d x^6 + e x^8 + f x^{10} + g x^{12} + h x^{14}$$

onde, $x = \log_{10} (\lambda) - \log_{10} (\lambda_{\max}/558)$, sendo λ o comprimento de onda e $\lambda_{\max}$ o pico de sensibilidade espectral do fotopigmento, $a = -188862.970810906644$, $b = 90228.966712600282$, $c = -2483.531554344362$, $d = -6675.007923501414$, $e = 1813.525992411163$, $f = -215.177888526334$, $g = 12.487558618387$ e $h = -0.289541500599$.

4.4. Análise morfológica de fotorreceptores em cortes histológicos radiais

As retinas de dois animais de cada espécie foram utilizadas para testar anticorpos anti-opsinas em variadas concentrações. Após enucleação dos olhos, a córnea e o cristalino foram removidos para obtenção de cuias ópticas. Estes procedimentos foram realizados com auxílio de lupa estereomicroscópica (Nikon SMZ800). Cada cuia óptica coletada foi fixada em paraformaldeído (PFA) 4%, diluído em tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4, durante 3 horas e em seguida lavada em PB 0,1 M. Depois de crioprotegidas com solução de sacarose 30%, diluída em PB 0,1 M por 24 horas, cada cuia óptica foi submersa em Tissue-Tek OCT (Sakura Finetechnical Co. Tokyo, Japan), congelada, e crio-seccionada a 12 μ m de espessura. Os cortes foram feitos a -25° C em criostato de bancada Leica CM1100 (Nussloch, Alemanha), coletados em lâminas histológicas gelatinizadas, secos a 37°C por 1 hora e congelados a -20°C até o momento de uso.

4.5. Procedimentos imunohistoquímicos

Para a marcação das opsinas, cortes radiais foram pré-incubados durante 1 hora em soro normal de cabra 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluído em PB a 0,1 M com Triton X-100 a 0,3%, para bloqueio dos sítios inespecíficos. Os cortes foram então incubados com anticorpo primário diluído em PB 0,1 M com Triton X-100 a 0,3%, *overnight* a 4°C. Os anticorpos utilizados para marcar cones L/M e cones S foram anti-opsina L/M e anti-opsina S feitos em coelho (Millipore, AB 5405 e AB 5407), ambos em concentração 1:500 em *B. jararaca* e 1:300 em *C.d.terrificus*. Após este período os cortes foram lavados em PB 0,1 M com Triton X-100 a 0,3% (três lavagens de 10 minutos), antes de serem incubados com o anticorpo secundário feito em cabra contra soro de coelho, acoplado a moléculas fluorescentes FITC (Jackson Immunoresearch Laboratories), diluído em PB 0,1 M com Triton 0,3 %, em concentração de 1:200, por período de 2 horas. Após a incubação com o anticorpo secundário, foram feitas novamente três lavagens de 10 minutos em PB 0,1 M. As lâminas foram montadas com meio de montagem para fluorescência Vectashield com marcador DAPI (Vector Laboratories Inc, California, USA). Para a marcação de bastonetes foi utilizada aglutinina de germen de trigo (WGA, Vector labs), em concentração 1:6000. A especificidade dos anticorpos secundários foi avaliada por incubação de cortes radiais em solução tampão com a omissão dos anticorpos primários.

4.6.Fotomicrografias

As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (DRMXE, Leica Microsystems GmbH, Alemanha) com objetiva de 40x, com um conjunto de filtros para os fluoróforos DAPI (excitação violeta , emissão azul) ou para FITC (excitação azul, emissão verde) equipado com câmera digital (DSR1, NIKON, Japão) acoplada a um computador. A aquisição de imagens foi realizada através do programa NIS Elements AR (NIKON, Japão). Em cada campo fotografado, os canais de emissão foram capturados separadamente, e então sobrepostos em uma única fotografia com o auxílio do programa Photoshop CS6 (Adobe Systems).

		5	15	25	35	45	55	
Bovine rhodopsin	NGNTEGPTG	VPFNSKNTGV	RSDFEAPQNY	LAEPQWFSML	AAAYMLFLML	GGPINFILTYL		
X.unicolor SW1S1	NNDDGDTTS	VYFYVSSNT	RDYDDTTS	IAPRWVNYLT	SLMVFVVVLA	SVFTNGLVLV		
B. nauticornis LWS				IAPRWVNYLT	SLMVFVVVLA	SVFTNGLVLV		
B. jararaca LWS	XXDDDETTR	VFAFYNSNT	RDPFEGNHYL	IAPRWVNYLT	SLMVFVVVLA	SVFTNGLVLV		
C. d. durissus LWS	DDDDTTRT	VFAFYNSNT	RDPFEGNHYL	IAPRWVNYLT	SLMVFVVVLA	SVFTNGLVLV		
X.unicolor RH1	NGNTEGLNF	VPM5KNKTGV	RSDFEAPQNY	LADPWKYSAL	AAAYMLFLML	GGPINFILTYL		
B. nauticornis RH1			RSDFEAPQNY	LADPWKYSAL	AAAYMLFLML	GGPINFILTYL		
B. jararaca RH1			RSDFEAPQNY	LADPWKYSAL	AAAYMLFLML	GGPINFILTYL		
C. d. durissus RH1			RSDFEAPQNY	LADPWKYSAL	AAAYMLFLML	GGPINFILTYL		
X.unicolor SW1S1	~MSGEE	DFYLFENISS	VGFQWGFQYH	IAPMWAFFQY	TAFMLGVFA	GTPNLNAILTL		
B. nauticornis SW1S1				IAPMWAFFQY	TAFMLGVFA	GTPNLNAILTL		
B. jararaca SW1S1				IAPMWAFFQY	TAFMLGVFA	GTPNLNAILTL		
C. d. durissus SW1S1				IAPMWAFFQY	TAFMLGVFA	GTPNLNAILTL		
	65	75	85	95	105	115		
Bovine rhodopsin	VTATQKKRLR	PLNYLLNLNA	VAIDLFMVTA	FTTTLITSLH	GVEYFGPTGC	NEGFFVATLG		
X.unicolor SW1S1	ATTKFKKRLR	PLNWLNLNA	IAIDLGVTVIA	STISVINQFF	GVEYLGHMPC	VEGTYGTVSC		
B. nauticornis LWS	PLATKFKLRH	PLNWLNLNA	IAIDLGVTVIA	STISVINQFF	GVEYLGHMPC	VEGTYGTVSC		
B. jararaca LWS	ATATAKFKLRH	PLNWLNLNA	IAIDLGVTVIA	STISVINQFF	GVEYLGHMPC	VEGTYGTVSC		
C. d. durissus LWS	ATATAKFKLRH	PLNWLNLNA	IAIDLGVTVIA	STISVINQFF	GVEYLGHMPC	VEGTYGTVSC		
X.unicolor RH1	VTATQKKRLR	PLNYLLNLNA	VAIDLFMVTA	FTTTLITSLH	GVEYFGPTGC	NEGFFVATLG		
B. nauticornis RH1	VTATQKKRLR	PLNYLLNLNA	VAIDLFMVTA	FTTTLITSLH	GVEYFGPTGC	NEGFFVATLG		
B. jararaca RH1	VTATQKKRLR	PLNYLLNLNA	VAIDLFMVTA	FTTTLITSLH	GVEYFGPTGC	NEGFFVATLG		
C. d. durissus RH1	VTATQKKRLR	PLNYLLNLNA	VAIDLFMVTA	FTTTLITSLH	GVEYFGPTGC	NEGFFVATLG		
X.unicolor SW1S1	VTETKYKLRQ	PLNYLLNLNA	FAGLIFVIFA	FTFTVFLASSQ	GVEYFGHVC	ALFAELGSAVA		
B. nauticornis SW1S1	PLETKYKLRQ	PLNYLLNLNA	FAGLIFVIFA	FTFTVFLASSQ	GVEYFGHVC	ALFAELGSAVA		
B. jararaca SW1S1	VTETKYKLRQ	PLNYLLNLNA	LAGLIFVIFA	FTFTVFLASSQ	GVEYFGHVC	ALFAELGSAVA		
C. d. durissus SW1S1	VTETKYKLRQ	PLNYLLNLNA	LAGLIFVIFA	FTFTVFLASSQ	GVEYFGHVC	ALFAELGSAVA		
	125	135	145	155	165	175		
Bovine rhodopsin	GETALWSLW	LAIERYVVVC	KPM5NFNRTE	NAHMGVATGP	WMALACATAP	PLVGWSRYPT		
X.unicolor SW1S1	GLTGLWSLW	ISIEWRWVVC	KPM5NFNRTE	KNALGGIFFS	WMALACATAP	PLVGWSRYPT		
B. nauticornis LWS	GLTGLWSLW	ISIEWRWVVC	KPM5NFNRTE	KNALGGIFFS	WMALACATAP	PLVGWSRYPT		
B. jararaca LWS	GITGLWSLW	ISIEWRWVVC	KPM5NFNRTE	KNALGGIFFS	WMALACATAP	PLVGWSRYPT		
C. d. durissus LWS	GITGLWSLW	ISIEWRWVVC	KPM5NFNRTE	KNALGGIFFS	WMALACATAP	PLVGWSRYPT		
X.unicolor RH1	GLTGLWSLW	LAIERYVVVC	KPM5NFNRTE	THAIMGALFT	WMALACATAP	PLVGWSRYPT		
B. nauticornis RH1	GLTGLWSLW	LAIERYVVVC	KPM5NFNRTE	THAIMGALFT	WMALACATAP	PLVGWSRYPT		
B. jararaca RH1	GLTGLWSLW	LAIERYVVVC	KPM5NFNRTE	THAIMGALFT	WMALACATAP	PLVGWSRYPT		
C. d. durissus RH1	GLTGLWSLW	LAIERYVVVC	KPM5NFNRTE	THAIMGALFT	WMALACATAP	PLVGWSRYPT		
X.unicolor SW1S1	GLVTLWSLAF	LAERYFYVVC	KPLGNFRFNT	KHALIVVAAT	WMALACATAP	PLVGWSRYPT		
B. nauticornis SW1S1	GLVTLWSLAF	LAERYFYVVC	KPLGNFRFNT	KHALIVVAAT	WMALACATAP	PLVGWSRYPT		
B. jararaca SW1S1	GLVTLWSLAF	LAERYFYVVC	KPLGNFRFNT	KHALIVVAAT	WMALACATAP	PLVGWSRYPT		
C. d. durissus SW1S1	GLVTLWSLAF	LAERYFYVVC	KPLGNFRFNT	KHALIVVAAT	WMALACATAP	PLVGWSRYPT		
	215	225	235	245	255	265	275	
Bovine rhodopsin	ELGQKSCGVD	YTPPHEETNG	ESFVIMFVVL	HFIIPLITLV	FCYGLVQLVT	KEAAAQQGE		
X.unicolor LWS	ELGQKSCGVD	YTPPHEETNG	ESFVIMFVVL	HFIIPLITLV	FCYGLVQLVT	KEAAAQQGE		
B. nauticornis LWS	ELGQKSCGVD	YTPPHEETNG	ESFVIMFVVL	HFIIPLITLV	FCYGLVQLVT	KEAAAQQGE		
B. jararaca LWS	ELGQKSCGVD	YTPPHEETNG	ESFVIMFVVL	HFIIPLITLV	FCYGLVQLVT	KEAAAQQGE		
C. d. durissus LWS	ELGQKSCGVD	YTPPHEETNG	ESFVIMFVVL	HFIIPLITLV	FCYGLVQLVT	KEAAAQQGE		
X.unicolor RH1	ELGQKSCGVD	YTPPHEETNG	ESFVIMFVVL	HFIIPLITLV	FCYGLVQLVT	KEAAAQQGE		
B. nauticornis RH1	ELGQKSCGVD	YTPPHEETNG	ESFVIMFVVL	HFIIPLITLV	FCYGLVQLVT	KEAAAQQGE		
B. jararaca RH1	ELGQKSCGVD	YTPPHEETNG	ESFVIMFVVL	HFIIPLITLV	FCYGLVQLVT	KEAAAQQGE		
C. d. durissus RH1	ELGQKSCGVD	YTPPHEETNG	ESFVIMFVVL	HFIIPLITLV	FCYGLVQLVT	KEAAAQQGE		
X.unicolor SW1S1	ELGQKSCGVD	YTPPHEETNG	ESFVIMFVVL	HFIIPLITLV	FCYGLVQLVT	KEAAAQQGE		
B. nauticornis SW1S1	ELGQKSCGVD	YTPPHEETNG	ESFVIMFVVL	HFIIPLITLV	FCYGLVQLVT	KEAAAQQGE		
B. jararaca SW1S1	ELGQKSCGVD	YTPPHEETNG	ESFVIMFVVL	HFIIPLITLV	FCYGLVQLVT	KEAAAQQGE		
C. d. durissus SW1S1	ELGQKSCGVD	YTPPHEETNG	ESFVIMFVVL	HFIIPLITLV	FCYGLVQLVT	KEAAAQQGE		
	285	295						
Bovine rhodopsin	ATTTQAKAEV	TRMVIIMVIA	FLVCLMPYAS	VAFYFIHTHG	SDGFPGMFTI	PAFFAKSSATI		
X.unicolor LWS	ESTQAKAEV	SRMVVMILIA	FLVCLWGPPI	FACFAANPAG	YAFHMPATST	PAFFAKSSATI		
B. nauticornis LWS	ESTQAKAEV	SRMVVMILIA	FLVCLWGPPI	FACFAANPAG	YAFHMPATST	PAFFAKSSATI		
B. jararaca LWS	ESTQAKAEV	SRMVVMILIA	FLVCLWGPPI	FACFAANPAG	YAFHMPATST	PAFFAKSSATI		
C. d. durissus LWS	ESTQAKAEV	SRMVVMILIA	FLVCLWGPPI	FACFAANPAG	YAFHMPATST	PAFFAKSSATI		
X.unicolor RH1	ATTTQAKAEV	TRMVIIMVIA	FLVCLMPYAS	VAFYFIHTHG	SDGFPGMFTI	PAFFAKSSATI		
B. nauticornis RH1	ATTTQAKAEV	TRMVIIMVIA	FLVCLMPYAS	VAFYFIHTHG	SDGFPGMFTI	PAFFAKSSATI		
B. jararaca RH1	ATTTQAKAEV	TRMVIIMVIA	FLVCLMPYAS	VAFYFIHTHG	SDGFPGMFTI	PAFFAKSSATI		
C. d. durissus RH1	ATTTQAKAEV	TRMVIIMVIA	FLVCLMPYAS	VAFYFIHTHG	SDGFPGMFTI	PAFFAKSSATI		
X.unicolor SW1S1	ATTTQAKAEV	TRMVIIMVIA	FLVCLMPYAS	VAFYFIHTHG	SDGFPGMFTI	PAFFAKSSATI		
B. nauticornis SW1S1	ATTTQAKAEV	TRMVIIMVIA	FLVCLMPYAS	VAFYFIHTHG	SDGFPGMFTI	PAFFAKSSATI		
B. jararaca SW1S1	ATTTQAKAEV	TRMVIIMVIA	FLVCLMPYAS	VAFYFIHTHG	SDGFPGMFTI	PAFFAKSSATI		
C. d. durissus SW1S1	ATTTQAKAEV	TRMVIIMVIA	FLVCLMPYAS	VAFYFIHTHG	SDGFPGMFTI	PAFFAKSSATI		
	325	335						
Bovine rhodopsin	PNVPYIYIMN	QRKNCIMMIT	LCCGNKNPLAE	DEASTYTGAT	ETSQVAPGA			
X.unicolor LWS	PNVPYIYIMN	QRKNCIMMIT	LCCGNKNPLAE	DEASTYTGAT	ETSQVAPGA			
B. nauticornis LWS	PNVPYIYIMN	QRKNCIMMIT	LCCGNKNPLAE	DEASTYTGAT	ETSQVAPGA			
B. jararaca LWS	PNVPYIYIMN	QRKNCIMMIT	LCCGNKNPLAE	DEASTYTGAT	ETSQVAPGA			
C. d. durissus LWS	PNVPYIYIMN	QRKNCIMMIT	LCCGNKNPLAE	DEASTYTGAT	ETSQVAPGA			
X.unicolor RH1	PNVPYIYIMN	QRKNCIMMIT	LCCGNKNPLAE	DEASTYTGAT	ETSQVAPGA			
B. nauticornis RH1	PNVPYIYIMN	QRKNCIMMIT	LCCGNKNPLAE	DEASTYTGAT	ETSQVAPGA			
B. jararaca RH1	PNVPYIYIMN	QRKNCIMMIT	LCCGNKNPLAE	DEASTYTGAT	ETSQVAPGA			
C. d. durissus RH1	PNVPYIYIMN	QRKNCIMMIT	LCCGNKNPLAE	DEASTYTGAT	ETSQVAPGA			
X.unicolor SW1S1	PNVPYIYIMN	QRKNCIMMIT	LCCGNKNPLAE	DEASTYTGAT	ETSQVAPGA			
B. nauticornis SW1S1	PNVPYIYIMN	QRKNCIMMIT	LCCGNKNPLAE	DEASTYTGAT	ETSQVAPGA			
B. jararaca SW1S1	PNVPYIYIMN	QRKNCIMMIT	LCCGNKNPLAE	DEASTYTGAT	ETSQVAPGA			
C. d. durissus SW1S1	PNVPYIYIMN	QRKNCIMMIT	LCCGNKNPLAE	DEASTYTGAT	ETSQVAPGA			

Caixas em verde assinalam os sítios de deslocamento espectral do fotopigmento RH1; em vermelho, os sítios de deslocamento do fotopigmento LWS, e em azul, do fotopigmento SWS1. Números de acesso das sequências no GenBank: KX237785.1, KX237873.1, KX237880.1, FJ497235.1, FJ497233.1, FJ497234.1 e NM_001014890.2.

Fotopigmento RH1

Para estimar o pico de sensibilidade espectral do fotopigmento RH1 foram analisados 7 sítios descritos na literatura como importantes para o deslocamento espectral da rodopsina (Tabela 2) (Yokoyama, 2000). Dentre os sítios analisados, nenhuma diferença foi observada entre as duas espécies. O $\lambda_{\max}$ foi estimado em ~500nm para *B. jararaca* e *C. d. terrificus* devido aos aminoácidos encontrados (Figura 7).

Tabela 2. Aminoácidos encontrados nos sítios de deslocamento espectral da rodopsina das serpentes *B. jararaca* e *C. d. terrificus*.

Espécies	83	122	207	211	265	292	295	$\lambda_{\max}$
<i>B. jararaca</i>	D	E	M	W	H	A	A	500
<i>C. d. terrificus</i>	D	E	M	W	H	A	A	500

Fotopigmento LWS

Para a opsina LWS, cinco principais sítios foram analisados para estimar a máxima sensibilidade espectral na população de cones que os expressam: 164, 181, 261, 269 e 292 (Yokoyama & Radlwimmer, 1999). A presença dos aminoácidos alanina, histidina, tirosina, treonina, e alanina (AHYTA) nestas cinco posições, encontrados em ambas espécies, ocasiona um $\lambda_{\max}$ estimado em ~555 nm (Figura 7).

Fotopigmento SWS1

A partir da presença do resíduo Fenilalanina no sítio 86 da opsina SWS1 em ambas espécies, é possível estimar um pico de absorção espectral na região do ultravioleta, em ~360 nm (Figura 7) (Cowing et al., 2002).

Figura 7. Curvas de absorção espectral das opsinas LWS, RH1 e SWS1, baseadas nos picos de absorção espectral dos pigmentos visuais obtidos a partir da sequência de aminoácidos observada para *B. jararaca* e *C. d. terrificus*.

5.2 Análises morfológicas

Os experimentos realizados permitiram identificar a estrutura das retinas das duas espécies de serpentes Viperidae, bem como as populações de fotorreceptores em que se expressam os fotorreceptores visuais abordados neste estudo (Figura 8).

As análises dos cortes transversais das retinas mostraram uma população de bastonetes marcados com aglutinina de gérmen de trigo (WGA). Cones sensíveis a comprimentos de onda longos e sensíveis a comprimentos de onda curtos, foram identificados por meio de imunohistoquímica com anticorpos anti-opsina L/M e anti-opsina S, respectivamente. O marcador DAPI foi empregado conjuntamente, para evidenciar núcleos celulares, e assim localizar a disposição das populações de fotorreceptores relativamente a camadas celulares

retinianas. Fotomicrografias foram obtidas separadamente nos canais azul e verde, para que posteriormente as imagens fossem sobrepostas (Figura 8).

Figura 8. Seções transversais das retinas de *B. jararaca* (A, C, E) e *C. d. terrificus* (B, D, F), marcadas com anticorpos anti-opsina L/M (A, B), anti-opsina S (C, D) e com aglutinina WGA (E, F).

A, B: população de cones destacada por anticorpo anti-opsina L/M, em verde (setas pequenas: cones simples; seta espessa: cones duplos). C, D: população de cones destacadas pelo anticorpo anti-opsina S,

em verde (setas); E, F: população de bastonetes destacadas pela aglutinina WGA, em verde. Núcleos celulares destacados por DAPI, em azul. SE, segmentos externos dos fotorreceptores; CNE, camada nuclear externa; CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CCG, camada de células ganglionares. Barras de escala: 20 μ m.

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos caracterizam propriedades da retina externa das espécies estudadas, que representa os mecanismos iniciais do sistema visual, responsáveis pela captura e transdução de estímulos luminosos, cuja organização contém muito a respeito da cena visual compreendida pelas espécies estudadas, como buscam os estudos de ecologia visual.

A vasta diversidade e adaptabilidade do ainda pouco explorado sistema visual de serpentes abre uma oportunidade de preenchimento de lacunas nos estudos de ecologia visual. À exemplo do ancestral comum de serpentes, as espécies visadas por este estudo perderam a expressão de dois genes de pigmentos visuais, restando apenas os pigmentos RH1, LWS e SWS1. Esta perda acredita-se estar relacionada à adoção de um estilo de vida noturno e fossorial do ancestral comum das serpentes, assim como muitas espécies atuais (Davies et al., 2009). Os resultados de nosso estudo morfológico compactuam com prévias descrições da retina dos viperídeos *Causus rhombeatus* e *Bitis arietans*, com características típicas de adaptação ao hábito noturno, como a preponderância da população de bastonetes (Walls, 1942), e a existência de uma população de cones sensíveis a comprimentos de onda curtos, na faixa do ultravioleta, como já relatado para outras espécies de serpentes noturnas (Sillman et al., 1999, 2001; Davies et al., 2009; Simões et al., 2016) e de mamíferos noturnos (Joesch & Meister, 2016; Veilleux & Cummings, 2012). Este tipo de configuração da retina, comum a roedores e serpentes, demonstra ser um modelo robusto e versátil de convergência adaptativa. Considera-se nestes dois grupos recorrentes transições entre longos períodos de adaptação ao hábito noturno e diurno em sua história natural, a que se alega alternância e sucessivas reversões e que, portanto, impediram mais provavelmente pelo benefício, a adoção de um substrato orientado a um nicho ecológico mais exclusivo, possibilitando a estes animais a conquista de períodos circadianos coincidentes ao hábito de suas presas e não-coincidentes ao hábito de seus predadores diurnos (Davies et al., 2012).

A carência de estudos comportamentais ou eletrofisiológicos em serpentes, no entanto, ainda mantém dúvidas sobre a potencial dicromacia da visão destes animais, proporcionada pela comparação entre a atividade de suas duas populações de cones, como é convencional na maioria das espécies de mamíferos. Uma especulação particularmente interessante se apresentaria ao generalizar para este e outros grupos de animais a oponência pós-receptoral entre o sinal de cones e bastonetes capacitando visão de cores em baixos níveis de iluminação, como já

demonstrado em roedores (Joesch & Meister, 2016). Isto consolidaria a já conhecida versatilidade da retina duplex, que por si só já capacita a visão a definir estímulos em níveis mesópicos, além dos níveis extremos de iluminação fotópica e escotópica (Boynton, 1979)

A fase do período da história natural que leva os mamíferos a se refugiar de predadores por meio da adoção do hábito noturno, há aproximadamente 150 a 200 milhões de anos, e a que se propõe a principal influência para a aquisição de retina dominada por bastonetes, referida como “gargalo noturno”, é desta forma proposta que seja chamada “gargalo mesópico” por estudiosos de ecologia visual (Davies et al., 2012), e poderia estar contemplada de forma análoga na transição de hábito que origina a organização da retina de serpentes “basais” do grupo Henophidia e serpentes “avançadas” do grupo Caenophidia, o qual faz parte a família Viperidae. Esta hipótese torna-se ainda mais tentadora ao constatar, de maneira equivalente entre ambos, que a distância entre os picos de absorção espectral dos pigmentos visuais em seus cones gera uma ampla banda espectral da visão de baixa atividade nestas duas populações de fotorreceptores, incapazes de gerar uma resposta significativa e que, portanto, o sistema de bastonetes poderia auxiliar a constituir uma tricromacia condicionada a níveis mesópicos, ao preencher justamente este vão de inatividade mútua (Sillman et al., 1999).

Também é possível que o $\lambda_{\max}$ do sistema de bastonetes em ~500nm esteja preenchendo o vão entre os dois picos de absorbância de seu sistema de cones; desta forma pode haver especial interesse em averiguar se há uma natureza transmutada em seus bastonetes, que poderiam fazer as vezes de um cone, em níveis mesópicos, ou de um bastonete altamente sensível em níveis escotópicos, aos comprimentos de onda médios, mesmo que não defina a discriminação de cores (Sillman et al., 2001). Em todo caso, a partir dos dados encontrados, tanto em morfologia, como no espectro da absorbância e o respectivo pigmento visual, nenhum foi capaz de apontar para qualquer prova de transmutação nos fotorreceptores como proposto por Walls (1942), de modo que o hábito noturno/crepuscular aparenta ser o estado ancestral dos viperídeos estudados. O uso de microscopia eletrônica poderia oferecer mais pistas morfológicas a respeito da identidade dos bastonetes das duas espécies de viperídeos presentes neste estudo, como o formato do terminal sináptico, as proporções de seus segmentos externos e a presença de membrana que encerra os discos membranosos que contém pigmentos visuais, oferecendo complemento de dados a respeito de seu funcionamento.

De maneira geral, as estimativas encontradas para $\lambda_{\max}$ do pigmento visual dos bastonetes das duas espécies em ~500nm compactuam com medições de MSP do $\lambda_{\max}$ da rodopsina em *Crotalus viridis helieri* em 500nm (Crescitelli, 1956), e próximas às estimativas da rodopsina dos viperídeos *Bitis nasicornis*, *Echis ocellatus* e *Causus rhombeatus*, entre 491nm e 496nm (Simões et al., 2016a), que apresentam o resíduo N83. A literatura descreve que substituição D83N, é responsável por deslocar o pico de sensibilidade espectral da rodopsina RH1 em aproximadamente 6nm para comprimentos de onda mais curtos (Yokoyama, 2000), o que levou à estimativa do pico espectral entre 491 e 496nm, nas três espécies de serpentes Viperidae analisadas por Simões e colaboradores (2016a), todas pertencentes à subfamília Viperinae. Contudo, nas espécies de Crotalinae analisadas neste estudo, *B. jararaca* e *C. durissus terrificus*, bem como na serpente *Bothrops atrox* (Solis, 2017), a presença do resíduo D83, junto com os demais aminoácidos observados, indica uma faixa de $\lambda_{\max}$ entre ~503-505nm (Solis, 2017).

Quanto aos pigmentos visuais presentes em cones, as estimativas de $\lambda_{\max}$ para o pigmento LWS em 555nm, e para o pigmento SWS1 em 360nm na região espectral de luz UV, também há unanimidade em relação às estimativas de outros vertebrados noturnos (Simões et al., 2016b), e as estimativas para o viperídeo *B. atrox* (Solis, 2017). Mais notavelmente, as estimativas que apresentamos aqui estão muito próximas das medições diretas realizadas por MSP para as serpentes henofídeas *Python regius* (Sillman et al., 1999) e *Boa constrictor* (Sillman et al., 2001), com $\lambda_{\max}$ medido em 494nm e 493-497 para o pigmento visual RH1, 551nm e 548-550nm para o pigmento LWS e 360 e 355-359nm para o pigmento SWS1, respectivamente.

Uma vez que a luz UV pode ser prejudicial ao tecido da retina, é esperado que a sensibilidade conferida a eles nas espécies estudadas desempenhe papel relevante para seu senso visual (Sillman et al., 2001), mais notavelmente pela ausência de mecanismos de filtragem como a coloração do cristalino em algumas serpentes de hábitos diurnos (Simões et al., 2016b). Uma alternativa tentadora seria supor que, novamente a exemplo de suas presas coabitantes, a refletância de vestígios de urina dos roedores poderia estar sendo explorada como vantagem para detectar a presença deles. Outra hipótese seria a de que esta sensibilidade facilitaria a detecção de ferormônios de acasalamento, complementando a capacidade da quimiocepção de uma substância pouco volátil por uma capacidade de orientação mais remota e espacial proporcionada pelo senso visual. Como nenhuma destas capacidades requereria a localização de uma imagem visual extraordinariamente nítida, é possível que as serpentes estejam plenamente aptas a realizar

estas tarefas visuais com suas populações pouco numerosas de cones UV (Sillman et al., 1997). Ainda que estas serpentes exibam hábitos predatórios noturnos, em condições de iluminação onde seu sistema de cones estaria inativo, é possível que esta capacidade de discriminação esteja sendo utilizada durante o dia para localizar posicionamento coincidente com os rastros deixados pela presa e aumentar a eficiência em sua caça (Sillman et al., 2001).

Uma categoria sensorial distinguível das espécies contempladas aqui inclui a sensibilidade a comprimentos de onda infravermelho, projetada às áreas visuais do encéfalo, enriquecendo a percepção da cena visual (Newman & Hartline, 1982). Esta capacidade, compartilhada com serpentes do grupo Henophidia, sustenta a já presente especulação de proximidade de histórico natural com estes exemplares, haja visto que compartilham do hábito predatório noturno de roedores e as características morfológicas e espectrais encontradas na organização de sua retina. Entre os representantes destes dois grupos, henofídeos e crotalíneos, a presença de cones duplos contendo o fotopigmento LWS em viperídeos, é a característica que diferencia suas retinas (Walls, 1942; Sillman et al., 1999). Cones duplos compõem um mecanismo receptoral atribuído à detecção de polarização na luz, porém cuja contribuição ao comportamento ainda é pouco elucidada (Cameron & Pugh, 1991).

Já entre as duas espécies contempladas por este estudo, nenhuma diferença foi capaz de ser atribuída à organização de seus sistemas visuais, quando levado em conta a morfologia da retina, tipos de fotorreceptores, o aspecto estrutural de suas opsinas e a predição de $\lambda_{\max}$ determinada pela composição de aminoácidos em sítios de deslocamento do pico de absorção das opsinas. Estes resultados contrariam a hipótese de encontrar adaptações funcionais das opsinas relacionadas ao uso do ambiente, uma vez que já fora relatada a irradiação de comprimentos de onda mais longos impostas pela presença de cobertura vegetal (Veilleux & Cummings, 2012), o que poderia refletir no ajuste espectral de espécies habitantes de floresta densa, como *B. jararca*. Contudo, a medição do real valor de $\lambda_{\max}$ das opsinas destas duas espécies, utilizando a técnica de MSP ainda resta ser realizada, como forma de verificar os valores de $\lambda_{\max}$ estimados neste estudo.

A literatura ainda carece de uma descrição mais completa do funcionamento do sistema visual para serpentes, para viperídeos e para as espécies contempladas por este estudo. Além dos pigmentos visuais, estudos de expressão dos genes de melanopsina podem complementar

o conhecimento do comportamento de ciclo circadiano e revelar padrões característicos entre animais diurnos, noturnos e crepusculares.

A variabilidade de espécies e de uso de ambiente pelas serpentes aponta para inúmeras adaptações de seu sistema visual, no que diz respeito aos tipos de fotorreceptores, evolução dos pigmentos visuais, sensibilidade espectral das opsinas e as especializações das retinas e regiões de aumento de densidade celular. Estudos acerca das características e adaptações do sistema visual de serpentes são extremamente escassos, quando considerado o grande número de espécies e a diversidade deste grupo de vertebrados (Hauzman, 2014). Estudos recentes destacam influência do padrão de atividade circadiana na evolução dos três genes de opsina e a estrutura da retina, como a espessura da camada nuclear externa e a morfologia dos fotorreceptores de serpentes noturnas e diurnas (Hauzman et al., 2017). De forma geral é generalizado que serpentes noturnas possuem o cristalino translúcido (Simões et al., 2016b).

Além da inexistência de estudos sobre os meios oculares de transmissão da luz, incluindo o cristalino e o espectáculo nestas espécies, a análise morfológica aqui descrita assume aspectos meramente qualitativos e merece maior aprofundamento sobre a questão da distribuição e de densidade dos tipos morfológicos aqui estudados. Este tipo de análise, combinada à estimativa da densidade de células ganglionares, pode prover estimativas da acuidade visual para os animais em questão.

Considerando a escassez dos estudos de eletrofisiologia e de comportamento, estes apontam ainda para uma incógnita no que concerne a percepção de cores em serpentes, ainda meramente potencial, tendo em conta a expressão de três genes de pigmentos visuais em distintas populações de fotorreceptores dotados de seus respectivos λ_{max} . Particularmente no que se refere à possibilidade da dicromacia ou tricromacia condicionada a níveis mesópicos de iluminação, esta busca poderia complementar, com grande riqueza, os alcances e a funcionalidade da visão para o grande número de espécies de serpentes, assim como de mamíferos contemplados pelo tipo de organização da retina encontrada neste estudo (Joesch & Meister, 2016). A ecologia visual de serpentes permanece como um campo incompleto e influente pela contribuição em demais estudos comparativos do sistema visual.

7. CONCLUSÕES

- Foi verificada a expressão dos três genes de fotopigmentos visuais de serpentes, *lws*, *rh1* e *sws1*, nas retinas das serpentes Viperidae noturnas *B. jararaca* e *C. d. terrificus*.
- As sequências de nucleotídeos dos genes de opsinas expressos nas retinas de *B. jararaca* e *C. d. terrificus* apontam para a presença da mesma combinação de aminoácidos nas posições visadas dos pigmentos visuais LWS, RH1 e SWS1.
- A análise morfológica das retinas das duas espécies revelou quatro populações de fotorreceptores, em que estão contidas as diferentes opsinas expressas: uma população abundante de bastonetes; uma maioria de cones simples em relação a um menor número de cones duplos, ambos expressando a opsina LWS, e uma esparsa população de cones que expressam a opsina SWS1.
- A partir da sequência de aminoácidos revelada, foi estimado um mesmo pico de absorção espectral para os três pigmentos visuais das duas espécies: ~555nm para o fotopigmento LWS, ~360nm para o fotopigmento SWS1; e ~500nm para o fotopigmento RH1.

8. REFERÊNCIAS

- ALI M.A & KLYNE, M.A. (1985). *Vision in Vertebrates*. Plenum Press, New York and London, 272 p.
- AMARAL CFS, BUCARETCHI F, ARAÚJO FAA, CARDOSO JLC, CAMPOS JA, MARQUES MMA, SANTALUCIA M. (2001). Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. 2ª ed. FUNASA, Brasília DF.
- ARTAL P. (2017). *The Handbook of Visual Optics*, 1st edition. Pp 1 – 432. CRC press, Boca Raton, Florida EUA.
- AUGUSTINE GJ, CHIKARASHI DM, EHLERS MD, EINSTEIN G, FITZPATRICK D, HALL WC, JARVIS E, KATZ LC, KAUER J, LAMANTIA A., MCNAMARA JO, MOONEY RD, NICOLELIS MAL, PURVES D. (2012). *Neuroscience*. (4th ed.) Sunderland: Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- BAILES, HJ, DAVIES WL, TRESIZE AEO & COLLIN SP. (2007). Visual pigments in a living fossil, the Australian lungfish *Neoceratodus forsteri*. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 200.
- BEAR MF, CONNORS BW, PARADISO MA. (2007). *Neuroscience - Exploring the brain*, 3rd ed. 1-857. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- BERSON DM, DUNN FA & TAKAO M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, 295, 1070–1073
- BURNS ME & LAMB TD. (2003). *Visual transduction by rod and cone photoreceptors*. Center for Neuroscience and Department of Psychiatry, University of California, Davis, CA, and Physiological Laboratory, University of Cambridge, Cambridge, CB2 3EG, UK.
- BOYNTON, RM. (1979). *Human color vision*, 2nd edition Pp 1 – 438. Holt, Rinehart and Winston, New York, EUA.
- BOWMAKER JK & HUNT DM. (2006). Evolution of vertebrate visual pigments. *Curr Biol*. 16(13):R484-9. Bowmaker & Hunt, 2006
- CAMERON DA, PUGH Jr. EM. (1991). Double cones as a basis for a new type of polarization vision in vertebrates. *Nature*, 353: 161 -164.
- CAMPBELL JA, LAMAR WW. (1989). *The Venomous Reptiles of Latin America*. Comstock, Cornell University Press, Ithaca and London.
- CAMPBELL JA, BRODIE Jr. ED. (1992). *Biology of the Pitvipers*. Comstock, Cornell University Press, Ithaca and London.

CAMPBELL JA, LAMAR WW. (2004). *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Comstock, Cornell University Press, Ithaca and London.

CAPRETTE C. L. (2005). *Conquering the cold shudder: the origin and evolution of snakes eyes*. Ph.D. Thesis, The Ohio State University. 107p.

CAPRETTE CL, LEE MSY, SHINE R, MOKANY A, DOWNHOWER JF. (2004). The origin of snakes (Serpentes) as seen through eye anatomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 81, 469–482.

CARDOSO JLC, FRANÇA FOS, WEN FH, MÁLAQUE CMS, HADDAD Jr. V. (2003). *Animais peçonhentos do Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes*, 1ª ed. Sarvier FAPESP, São Paulo SP.

CONANT R, & COLLINS JT. (1998). A field guide to reptiles & amphibians: eastern and central North America (Vol. 12). Houghton Mifflin Harcourt.

COWING, JA, POOPALASUNDARAM S, WILKIE SE, ROBINSON PR., BOWMAKER JK & HUNT DM. (2002). The molecular mechanism for the spectral shifts between vertebrate ultraviolet- and violet-sensitive cone visual pigments. *Biochem J*, 367, 129 –135.

DAVIES WL, COWING JA, BOWMAKER JK, CARVALHO LS, GOWER DJ & HUNT DM. (2009). Shedding light on serpent sight: the visual pigments of Henophidian snakes. *The Journal of Neuroscience*, 29(23), 7519 –7525.

DAVIES WIL, COLLIN SP, HUNT DM. (2012). Molecular Ecology and adaptation of visual pigments in craniates. *Molecular Ecology*, 21: 3121-3158.

FASICK JI, AAPPLEBURY ML & OPRIAN DD. (2002) Spectral tuning in the mammalian short-wavelength sensitive cone pigments. *Biochemistry*, 41, 6860–6965.

GREENE HW. (1992). The ecological and behavioral context of pioviper evolution. Pp. 107-117. In: J.A. Campbell and E.D. Brodie Jr. (Eds.), *Biology of the Pitvipers*. Selva. Tyler, Texas.

HALL, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, v. 41, p. 95-98.

HAUSER FE, van HAZEL I, CHANG BS. (2014). Spectral tuning in vertebrate short wavelength-sensitive 1 (SWS1) visual pigments: can wavelength sensitivity be inferred from sequence data? *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 322(7):529-39.

HAUZMAN E. (2014). Ecologia e evolução do sistema visual de serpentes caenophidia: estudos comparativos da morfologia retiniana e genética de opsinas. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

HAUZMAN E, BONCI DMO, SUÁREZ-VILLOTA EY, NEITZ M, VENTURA DF. (2017). Daily activity patterns influence retinal morphology, signatures of selection, and spectral tuning of opsin genes in colubrid snakes. *BMC Evolutionary Biology* 17:249.

HENDERSON RW, SCHWARTZ A, NOESKE-HALLIN. (1987). Food Habits of Three Colubrid Snakes (genus *Uromancer*) on Hispanola. *Herpetologica* 43:241-248.

JOESCH M, MEISTER M. (2016). A Neuronal Circuit for Colour Vision Based on Rod-Cone Opponency. *Nature* 532.

KITO Y, SUZUKI T, AZUMA M & SEKOGUCHI Y. (1968). Absorption spectrum of rhodopsin denatured with acid. *Nature*, 218, 955–57.

KLAUBER, LM. (1972). *Rattlesnakes – Their Habits, Life Histories, and Influence on Mankind*, 2nd edition. pp. 1-740. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.

LEVINE JS, MACNICHOL Jr. EF. (1982). Color Vision in Fishes. *Scientific American* 246 (140-149).

LIMA JS, MARTELLI H, MARTELLI DRB, SILVA MS, CARVALHO SFG, CANELA JR, BONAN PRF. (2009). Perfil dos acidentes ofídicos no norte do estado de Minas Gerais, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42(5):561-564.

LUCAS RJ, FREEDMAN M.S, MUÑOZ M, GARCIA-FERNANDEZ JM, FOSTER RG. (1999) Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284: 505–507.

MASLAND, RH. (2011). Cell Populations of the Retina: the Proctor Lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52(7) 4581-4591.

MOREIRA JPL. (2014). *Primeiro simpósio mineiro de Geografia. Das diversidades à articulação Geográfica*. Incidência e ocorrência de ataques ofídicos no Brasil em 2012.

NEWMAN EA, HARTLINE PH.(1982). The Infrared “Vision” of Snakes. *Scientific American* 246(3):116-127.

NICKLA DL & WALLMAN J. (2010). The Multifunctional Choroid. *Progress in Retinal and Eye Research* 29, 144-168.

NIESSNER C, DENZAU S, GROSS JC, PEICHL L, BISCHOF HJ, FLEISSNER G, WILTSCHKO W, WILTSCHKO R. (2011). Avian Ultraviolet/Violet cones identified as probable magetoreceptors. *PLoS ONE*, 6(5), 1-18.

PARRY JWL, POOPALASUNDARAM S, BOWMAKER JK & HUNT DM. (2004). A novel amino acid substitution is responsible for spectral tuning in a rodent violet-sensitive visual pigment. *Biochemistry*, 43, 8014-8020.

RAMON Y CAJAL S. (1893). La rétine des vertébrés. *La Cellule*, 9, 17 – 257.

RAGE JC. (1987). Fossil History. In *Snakes: Ecology and Evolutionary Biology* (ed. R. A. Seigel, J.T. Collins and S.S. Novak), pp 51-76. New York. Macmillan.

Rodieck RW (1998). *The first steps in seeing*. pp.1-562. Sinauer Associates, Inc, Sunderland.

SAZIMA, I. (1992). Natural history of the jararaca pitviper, *Bothrops jararaca*, in southeastern Brazil. 199-216. in book: *Biology of the pitvipers*, Edition: 1st, Chapter: 14, Publisher: Selva, Editors: Jonathan A. Campbell & Edmund D. Brodie, pp.199-216.

SCHOTT RK, MÜLLER J, YANG CGY, BHATTACHARYYA N, CHAN N, XU M, MORROW JM, GHENU AH, LOEW ER, TROPEPE V, CHANG BS. (2016). Evolutionary transformation of rod photoreceptors in the all-cone retina of a diurnal garter snake. *Proc Natl Acad Sci USA*. 12; 113(2):356-61.

SHINE R. (1989). Constraints, Allometry, and Adaptation: Food Habits and Reproductive biology Biology of Australian brownsnakes (*Pseudonaja*: Elapidae). *Herpetologica* 45:195-207.

SILLMAN AJ, CARVER JK, LOEW ER (1999). The Photoreceptors and Visual Pigments in the Retina of a Boid Snake, the Ball Python (*PYTHON REGIUS*). *The Journal of Experimental Biology* 202: 1931 – 1938.

SILLMAN AJ, JOHNSON JL, LOEW ER (2001). Retinal Photoreceptors and visual Pigments in *Boa constrictor imperator*. *Journal of Experimental Zoology* 290: 359-365.

SIMÕES BF, SAMPAIO FL, ANTONIAZZI JC, LOEW ER, BOWMAKER JK, RODRIGUEZ A, HART NS, HUNT DM, PATRIDGE JC. (2015). Visual System Evolution and the Nature of the Ancestral Snake. *J. Evol Biol.* 28(7): 1309-1320.

SIMÕES BF, SAMPAIO FL, LOEW ER, SANDERS KL, FISHER RN, HART NS, HUNT DM, PATRIDGE JC, GOWER DJ (2016a). Multiple Rod-Cone and Cone-Rod photoreceptor transmutations in snakes: Evidence from Visual Opsin Gene Expression. *Proc R Soc B*. 283:1823. Pp 2015-2624.

SIMÕES BF, SAMPAIO FL, DOUGLAS RH, KODANDARAMAIAH U, CASEWELL NR, HARRISON RA, HART NS, PATRIDGE JC, HUNT DM, GOWER DJ (2016b). Visual Pigments, Ocular Filters and the Evolution of Snake Vision. *Mol Biol. Evol.* 33 (10):2483-2495.

SOLIS, MS. (2017). Cloning of the opsin genes present in *Bothrops atrox* (Viperidae) retina. Dissertação. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Equador.

SPIRIDON M, KANWISHER N (2002). How distributed is visual category information in human occipito-temporal cortex? An fMRI study. *Neuron* 35, 1157–1165.

STRADER CD, FONG TM, TOTA MR & UNDERWOOD D. (1994). Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.*, 63, 101–32.

STANDHART BR. (1986). *Vertebrate Paleontology of the Cretaceous/Tertiary transition of Big Bend National Park, Texas*. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Baton Rouge.

STRAUSS O. (2005). The retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiol. Rev.*, 85, 845-881.

UETZ, P. & HOŠEK, J. (Eds.) 2018. The Reptile Database. Recuperado de: www.reptiledatabase.org. Acesso em 03 de setembro de 2018.

UNTERGRASSER A, CUTCUTACHE I, KORESSAAR T, YE J, FAIRCLOTH BC, REMM M, ROZEN SG (2012). Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:e115.

VEILLEUX CC, Cummings ME. (2012). Nocturnal Light Environments and Species Ecology: Implications for Nocturnal Color Vision in Forests. *Journal of Experimental Biology*, 215 (23), 4085-4096.

WALD G. (1935). Carotenoids and the visual cycle. *J. Gen. Physiol.*, 19, 351–71.

WALD G. (1955). The photoreceptor process in vision. *Am. J. Ophthalmol.*, 40, 18–41.

WALD G. (1968). Molecular basis of visual excitation. *Science*, 162, 230–39.

WALLS GL. (1934). The Reptilian Retina. In: A New Concept of Visual Cell Evolution. *Am. J. Ophthalmol.* (17) 892- 915.

WALLS GL. (1942). *The Vertebrate Eye and its Adaptive Radiation*. New York, NY: fafner publishing company.

World Health Organization. Progress in the characterization of venoms and standarization of antivenoms. *WHO off-set Publication*. n^o 58, 1981.

YOKOYAMA S. (1997). Molecular Genetic Bases of Adaptative Selection: Examples from color vision in vertebrates. *Annu Rev. Genet.* 31: 315-336.

YOKOYAMA S. (2002). Molecular Evolution of Color Vision in Vertebrates. *Gene* 300 69-78.

YOKOYAMA S. (2008). Evolution of Dim-Light and Color Vision Pigments. *Annual Reviews of Genomics and Human Genetics* 9: 259-282.

YOKOYAMA S, YOKOYAMA R (1996). Adaptive Evolution of Photoreceptors and Visual Pigments in Vertebrates. *Annu Rev. Ecol. Syst.* 26: 543-567.

YOKOYAMA S. & STARMER WT (1996). Evolution of the G-protein-coupled receptor superfamily. In: *Human Genome Evolution*, ed. M Jackson, T Strachan, G Dover, pp. 93–119. Oxford: BIOS Sci.

YOKOYAMA S, RADLWIMMER FB (1999). The Molecular Genetics of Red and Green Color Vision in Mammals. *The Genetics Society of America* 153: 919 – 932.

YOKOYAMA, S. (2000). The Molecular Evolution of Vertebrate Visual Pigments. *Progress in Retinal and Eye Research*. 19(4), 385-419.

YOVANOVITCH CAM, KOSKELA SM, NEVALA N, KONDRASHEV SL, KELBER A, DONNER K (2017). The Dual Rod System of Amphibians Supports Colour Discrimination at the Absolute Visual Threshold. *Phil. Trans. R. Soc. B* 372: 20160066.

Anexo 1: CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO DE PSICOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE PSICOLOGIA
www.ip.usp.br

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudos comparativos da morfologia da retina e análises genéticas dos fotopigmentos visuais e não visuais de serpentes Viperidae e Elapidae - Segunda submissão.", protocolada sob o CEUA nº 1805090417, sob a responsabilidade de **Daniela Maria Oliveira Bonci** e equipe; *Guido Barbieri Bittencourt; Juliana Hiromi Tashiro; Dora Selma Fix Ventura; Einat Hauzman* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (CEUA/IPUSP) na reunião de 19/04/2017.

We certify that the proposal "Comparative studies of the retinal morphology and genetic analysis of visual and non-visual photopigments of Viperidae and Elapidae snakes.", utilizing 30 Reptiles (males and females), protocol number CEUA 1805090417, under the responsibility of **Daniela Maria Oliveira Bonci** and team; *Guido Barbieri Bittencourt; Juliana Hiromi Tashiro; Dora Selma Fix Ventura; Einat Hauzman* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Psychology Institute - São Paulo University (CEUA/IPUSP) in the meeting of 04/19/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 04/2017 a 04/2022

Área: Neurociências E Comportamento/psicologia

Origem:	Animais provenientes de doação espontânea			
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	N: 10
Linhagem:	Crotalus durissus terrificus	Idade:	1 a 10 anos	Peso: 100 a 1000 g
Origem:	Animais provenientes de doação espontânea			
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	N: 10
Linhagem:	Crotalus durissus terrificus	Idade:	1 a 10 anos	Peso: 100 a 1000 g
Origem:	Animais provenientes de doação espontânea			
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	N: 10
Linhagem:	Micrurus corallinus	Idade:	1 a 10 anos	Peso: 100 a 1000 g

Resumo: Este projeto visa responder importantes questões sobre a genética molecular e a morfologia da retina de serpentes em continuidade aos trabalhos que vem sendo realizados ao longo do mestrado e doutorado da Dra. Einat Hauzman. Apesar da grande diversidade de espécies de serpentes poucos estudos avaliaram as especializações de seus sistemas sensoriais. Durante seu mestrado foram analisados a densidade e distribuição de fotorreceptores e de células da camada de células ganglionares (CCG) de duas espécies de serpentes diurnas (Hauzman, 2009; Hauzman et al., 2014). No projeto de doutorado, os fotorreceptores e células da CCG foram quantificados em retinas de 20 espécies de serpentes diurnas e noturnas das famílias Colubridae e Dipsadidae, e os genes de pigmentos visuais foram sequenciados a partir de RNAm de retinas de 17 espécies de serpentes (Hauzman, 2014). Diferentes tipos de fotorreceptores foram marcados pela técnica de imunohistoquímica, com anticorpos contra opsinas sensíveis a comprimentos de onda curtos (grupo SWS1) e contra opsinas sensíveis a comprimentos de onda longos (grupo LWS). O presente trabalho tem por objetivo dar continuidade aos estudos que vem sendo realizados sobre as características e evolução do sistema visual de serpentes, mas agora avaliando aspectos morfológicos e genéticos das retinas de serpentes peçonhentas, das famílias Viperidae e Elapidae. Nenhum estudo na literatura descreve aspectos do sistema visual destas serpentes de alta relevância para a saúde pública no Brasil. Para tanto, serão coletadas retinas de 10 serpentes das espécies de viperídeos Bothrops jararaca e Crotalus durissus terrificus e elapídeos Micrurus corallinus, para análise genética dos pigmentos visuais (opsinas) e não visuais (melanopsinas), e para estudos morfológicos. Os animais serão entregues por fornecedores do Instituto Butantan, recebidos na Recepção de Serpentes e mantidos em caixas plásticas com água, em condições próprias para sua manutenção. A eutanásia será feita com uso de anestésico Thionembutal (princípio ativo tiobarbiturato etil sódico, dose 100 mg/kg) associado a Lidocaína (dose 10 mg/kg), por médica veterinária capacitada, do Instituto Butantan. Os procedimentos com os animais estão de acordo com os princípios éticos de manejo e experimentações com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Após eutanásia os olhos serão enucleados e as retinas dissecadas e preservadas para extração de RNA, ou fixadas em paraformaldeído 4% ou formalina 10% para análises morfológicas. Após a coleta, os espécimes serão fixados e depositados em

INSTITUTO DE PSICOLOGIA
www.ip.usp.br

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de São Paulo

coleção herpetológica do Instituto Butantan. As coletas e experimentos estão previstos para serem realizados em um prazo de 5 anos, dada a grande quantidade de experimentações e o reduzido número de chegada de serpentes da espécie *Micrurus corallinus*. Este projeto inclui os trabalhos de iniciação científica da aluna Juliana Hiromi Tashiro e de mestrado do aluno Guido Barbieri Bittencourt.

Local do experimento: Laboratório de Psicofisiologia Sensorial - Instituto de Psicologia USP

São Paulo, 19 de abril de 2017

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

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