

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE PSICOLOGIA

Lucas de Oliveira Andrade

**ESTUDO GENÉTICO DE OPSINAS EM DIFERENTES
ESPÉCIES DE CANÍDEOS (CARNIVORA: CANIDAE).**

São Paulo

2022

Lucas de Oliveira Andrade

**ESTUDO GENÉTICO DE OPSINAS EM DIFERENTES ESPÉCIES
DE CANÍDEOS (CARNIVORA: CANIDAE).**

Versão Corrigida

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Psicologia
Experimental da Universidade de
São Paulo para a obtenção do título
de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Maria Oliveira Bonci

São Paulo

2022

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)

De Oliveira Andrade, Lucas

Estudo genético de Opsinas em diferentes espécies de Canídeos
(Carnivora:Canidae). /

Lucas de Oliveira Andrade; Orientadora Daniela Maria Oliveira Bonci. --

São Paulo, 2022.

79 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Psicologia
Experimental) -

- Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2021.

1. Canídeos. 2. Visão de cores. 3. Opsinas. 4. LWS. 5. SWS1. 6. Cães. 7. Lobos.
8. Raposa. 9. Biologia molecular. I. Maria Oliveira Bonci, Daniela, orient. II.

Título

Agradecimentos

Agradeço à minha família, por todo apoio e suporte para que eu pudesse chegar até esse momento, mesmo não compreendendo o significado desse processo.

Agradeço à Prof^a Dr^a Daniela Bonci, minha orientadora, por confiar a mim a tarefa de desenvolver o presente trabalho. Obrigado por todo apoio, conhecimento, paciência, dedicação e compreensão concedidos durante todo esse período. Com você aprendi diversos conhecimentos acadêmicos e pessoais que quero levar para a minha vida.

Agradeço também a agência de fomento CAPES, por contribuir com a bolsa de mestrado, fazendo assim ser possível minha ingressão e desenvolvimento na jornada da pós-graduação.

Agradeço a FAPESP, pela contribuição de verba ao laboratório, permitindo que todos os projetos de pesquisas elaborados no LabVis sejam desenvolvidos.

Meus agradecimentos ao Marcos Tokuda e toda equipe do Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros, e do Zoológico de São Paulo pela contribuição de amostras dos animais silvestres.

Agradeço ao Francisco Moreno pela contribuição de amostras de seus pacientes, seu apoio foi essencial para o desenvolvimento desse projeto.

Agradeço aos professores e doutores Cristiane Schilbach Pizzutto, Marcelo Fernandes da Costa, Marcos Tokuda, Dora Selma Fix Ventura, Fernando Allan de Farias Rocha e Bruno Duarte Gomes por aceitarem participar da banca examinadora desse projeto. Tenho certeza que todas as contribuições auxiliarão com o aperfeiçoamento do trabalho.

Agradeço a todos os amigos e colegas do LabVis, por toda contribuição com conhecimentos técnicos e teóricos, além da companhia no cotidiano do laboratório.

Agradeço a Maria Júlia, pela amizade e companheirismo desde o período da graduação. A mesma responsável por me apresentar ao laboratório.

Agradeço ao João Pedro, pela paciência, contribuição e apoio que precisei para os momentos de ansiedade e angústia.

Agradeço a equipe do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa do Hospital Albert Einstein pela oportunidade de realizar técnicas de biologia molecular em seus espaços.

Agradeço à Universidade de São Paulo, pelo espaço e oportunidade pela qual eu pude experienciar durante todo esse período, com a participação em disciplinas e discussões que agregarão para sempre.

Agradeço a todos os funcionários do Instituto de Psicologia e do programa de pós-graduação em Psicologia Experimental por todo o apoio e estrutura, auxiliando o desenvolver da vida acadêmica de seus alunos.

Agradeço a secretária do programa de Psicologia Experimental, por se mostrar presente e organizada, ajudando em todos os momentos que foram necessários.

“A vida sem ciência é uma espécie de morte”

(Sócrates)

Resumo

Os mamíferos constituem um grupo extremamente diversificado e apresentam grande distribuição e adaptação à diversos ambientes. Esses animais podem apresentar diversos benefícios para nossa sociedade. Os cães domésticos, por exemplo, desempenham papéis importantes podendo atuar em zooterapia, cães de companhia, guias para pessoas com deficiência visual ou auditiva, identificador de substâncias ilegais, transporte, entre outras. A visão é uma das habilidades que permite esses animais perceberem o mundo a sua volta, especificamente a visão de cores concede maior facilidade no desempenho de algumas atividades. Sabe-se que os cães domésticos apresentam visão dicromática devido a presença de 2 classes de cones funcionais que possuem pigmentos visuais com sensibilidades espectrais máximas em diferentes regiões do espectro de luz, assim como ocorre na maioria dos mamíferos. Estudos indicam que essa organização se faz presente em diferentes espécies dentro o grupo dos canídeos, porém pouco se sabe sobre a genética desses pigmentos. Este trabalho tem como objetivo inferir o pico de sensibilidade espectral em diferentes espécies de canídeos, sendo esses: *Chrysocyon brachyurus* (Loboguará), *Speothos venaticus* (Cachorro-vinagre), *Lycalopex vetulus* (Raposa-do-campo), *Cerdocyon thous* (Cachorro-do-mato) e *Canis lupus familiaris* (Cão doméstico). Para isso, foram realizadas extrações de DNA a partir de amostras de saliva de cães domésticos, e soro e sangue dos canídeos silvestres. Com o material genômico foram realizadas técnicas de biologia molecular, como a PCR e sequenciamento Sanger para que assim fosse possível observar as sequências de nucleotídeos presentes nos genes das opsinas desses animais. Com os resultados obtidos, pode-se observar que as espécies analisadas apresentam a conformação de aminoácidos AHYTA em seus cinco sítios para inferência do pico de sensibilidade espectral do o fotopigmento LWS, e assim inferimos um pico de sensibilidade em ~555nm. Os dados obtidos a partir da análise genômica do SWS1 difere dos achados descritos na literatura para a espécie.

Palavras-chave: Canídeos; Visão de cores; Opsinas; LWS; SWS1; Cães; Lobos; Raposa; Biologia molecular.

Abstract

Mammals are an extremely diverse group and have great distribution and adaptation to different environments. These animals can present several benefits for our society. Domestic dogs, for example, could play important roles in zotherapy, companion dogs, guides for people with visual or hearing impairments, identifiers for illegal substances, transportation, among others. Vision is one of the skills that allows these animals to perceive the world around them, specifically color vision makes it easier to perform some activities. It is known that domestic dogs have dichromatic vision due to the presence of 2 classes of functional cones that have visual pigments with maximum spectral sensitivities in different regions of the light spectrum, as most mammals. Studies indicate that this organization is present in different species among the group of canids, but not much is known about the genetics of these pigments. This work aims to infer the peak of spectral sensitivity in different species of canids, these being: *Chrysocyon brachyurus* (Maned wolf), *Speothos venaticus* (Bush dog), *Lycalopex vetulus* (Hoary fox), *Cerdocyon thous* (Crab-eating-fox) and *Canis lupus familiaris* (Domestic dog). For this, DNA extractions were extracted from saliva samples from domestic dogs, and serum and blood from wild canids. Molecular biology techniques were used in genomic material, such as PCR and Sanger sequencing, so that it is possible to observe the nucleotide sequences present in the opsin genes of these animals. With the results obtained, it can be observed that the analyzed species presents AHYTA amino acid conformation in their five sites for inference of the spectral sensitivity peak of the LWS photopigment, and so we inferred a sensitivity peak at ~ 555nm. The data collected from the genetic analysis of SWS1 differ from the literature findings for the species.

Keywords: Canids; Color vision; Opsins; LWS; SWS1; Dogs; Wolves; Foxes; Molecular biology

Lista de Ilustrações

Figura 1: Árvore filogenética dos mamíferos atuais.....	7
Figura 2: Árvore filogenética da ordem Carnivora	8
Figura 3: Cladograma espécies de Canídeos	9
Figura 4: Olho de Cão doméstico	12
Figura 5: <i>Tapetum lucidum</i> e <i>Tapetum nigrum</i>	13
Figura 6: Retina dos vertebrados	14
Figura 7: Retina cão doméstico	15
Figura 8: Fotorreceptores	16
Figura 9: Segmento externo de um fotorreceptor	17
Figura 10: Estruturas químicas do retinal	18
Figura 11: Cascata de eventos da fototransdução	18
Figura 12: Ilustração de ftopigmento	19
Figura 13: Curvas de sensibilidade espectral das três classes de cones em humanos.....	20
Figura 14: Árvore filogenética dos vertebrados	22
Figura 15: Distribuição de cones em retinas de cães domésticos	26
Figura 16: Espécies estudadas neste trabalho.....	29
Figura 17: Exemplo de protocolo para PCR	33
Figura 18: Etapas da PCR.....	34
Figura 19: Exemplo de protocolo de PCR utilizado neste trabalho.....	36
Figura 20: Eletroforese	37
Figura 21: Alinhamento de aminoácidos do ftopigmento LWS de cães domésticos	40
Figura 22: Alinhamento de aminoácidos do ftopigmento LWS de canídeos silvestres	41
Figura 23: Alinhamento de aminoácidos do ftopigmento SWS1 de cães domésticos	43
Figura 24: Alinhamento de nucleotídeos <i>sws1</i> de cães domésticos.....	44
Figura 25: Eletroferograma parcial do gene <i>sws1</i> de cão doméstico	44

Figura 26: Eletroferograma parcial do gene <i>sws1</i> de <i>L. vetulus</i>	44
Figura 27: Resultado BLAST para o éxon 1 do gene <i>sws1</i> de <i>L. vetulus</i>	45
Figura 28: Alinhamento de aminoácidos do fotopigmento SWS1 de diferentes espécies de raposas.....	46
Figura 29: Alinhamento de aminoácidos do fotopigmento SWS1 de canídeos silvestres	47
Figura 30: Modelo 3D do fotopigmento SWS1 de cão doméstico	48
Figura 31: Curva de sensibilidade espectral do fotopigmento LWS das espécies estudadas.....	49
Figura 32: Curva de sensibilidade espectral do fotopigmento SWS1 das espécies estudadas.....	51
Quadro 1: Informações adicionais sobre as espécies	11
Quadro 2: Informações sobre as raças	27
Quadro 3: Amostras canídeos silvestres	31
Quadro 4: Amostras cães domésticos.....	32
Quadro 5: <i>Primers</i>	35

Sumário

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Organização do sistema visual	11
1.2 Fotorreceptores e o processo de fototransdução	15
1.3 Opsinas	19
1.4 Genética e evolução da visão de cores em mamíferos	21
1.5 Visão de cores em mamíferos	21
1.6 Visão de Cores e fotorreceptores em Canídeos	24
2 JUSTIFICATIVA	28
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Coleta do material	30
4.2 Extração e quantificação do DNA	32
4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	33
4.4 Sequenciamento	37
4.5 Análise de dados	37
4.6 Modelagem das proteínas	38
6 RESULTADOS	39
6.1 LWS	39
6.1.1 Cães domésticos	39
6.1.2 Canídeos silvestres	41
6.2 SWS1	42
6.2.1 Cães domésticos	42
6.2.2 Canídeos silvestres	44
6.2.3 Modelagem SWS1	48
7 DISCUSSÃO	49
7.1 LWS	49
7.2 SWS1	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXO I	65
ANEXO II	65
APÊNDICE I	66

APÊNDICE II	67
APÊNDICE III	69
APÊNDICE IV	70
APÊNDICE V	72

1 INTRODUÇÃO

A classe Mammalia é um grupo extremamente diversificado que possui grande distribuição e adaptação à diversos ambientes. Mamíferos selvagens e domesticados podem contribuir de diversas formas para nossa sociedade, dentre esses, como modelos de pesquisa. Pesquisas com esses animais são importantes pois englobam diversos ramos da ciência, por exemplo, estudos de fisiologia, psicologia e diversas doenças, que podem afetar tanto os animais quanto o ser humano (WILSON et al., 2020).

A classe dos mamíferos é dividida em duas subclasses: a primeira, Prototheria, também conhecida como Monotremata, compreende os mamíferos que botam ovos; e a segunda, Theria, é dividida em duas infraclasses, a Metatheria, que é composta pelos marsupiais, e a Eutheria, que é formada pelos mamíferos placentários (Figura 1) (WILSON et al., 2020; WILSON & REEDER, 2005).

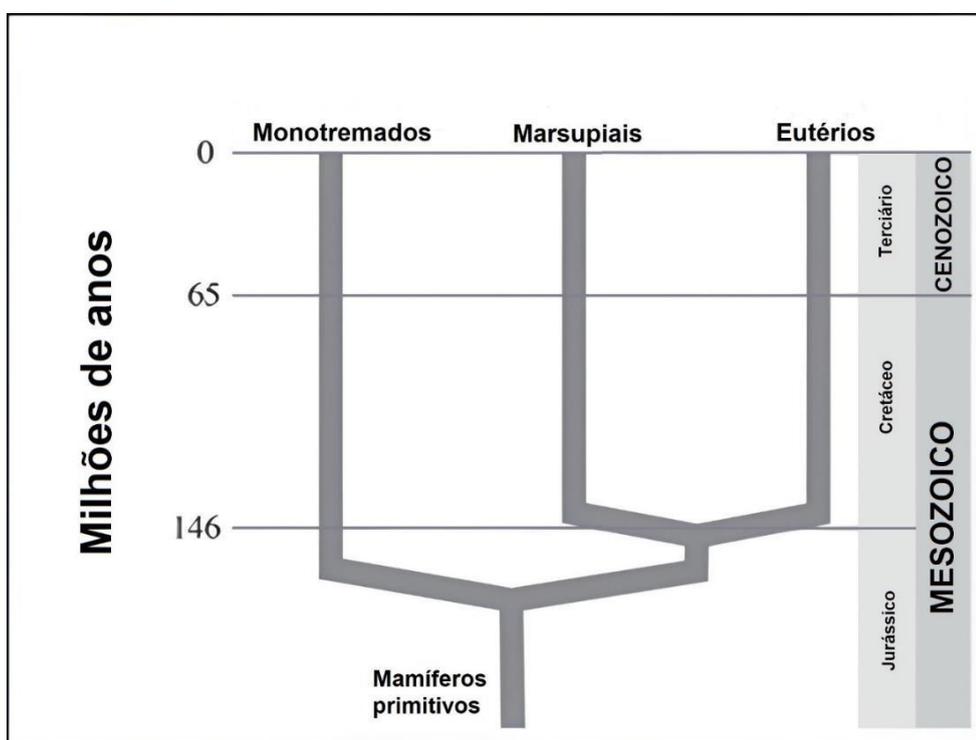


Figura 1: Árvore filogenética das subclasses e infraclasses dos mamíferos atuais. Ao lado esquerdo da imagem há uma representação do tempo em milhões de anos, ao lado direito há indicação da escala de tempo geológica. Modificado de Jacobs (2009).

Entre os membros da infraclasse Eutheria estão os carnívoros, pertencentes a ordem Carnivora, animais geralmente predadores que ocupam ampla variedade de habitats. A ordem Carnivora é distribuída entre 16 famílias (Figura 2), 5 delas são encontradas no Brasil: Felidae, Mustelidae, Procyonidae, Mephitidae e Canidae (ICMBIO, 2020; HUNTER & BARRETT, 2018).

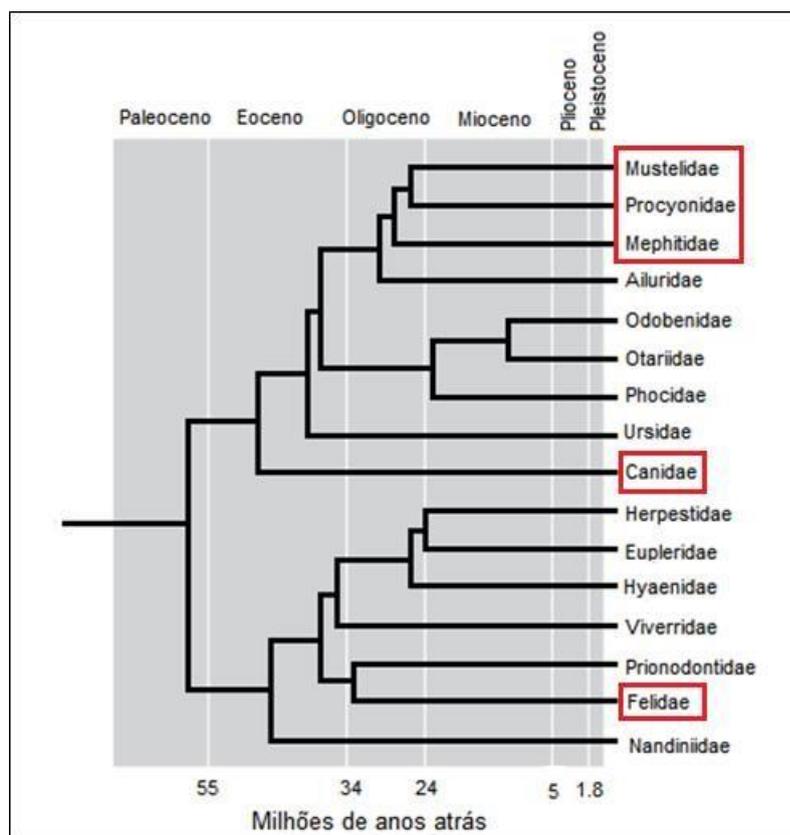


Figura 2: Árvore filogenética indicando a distribuição das famílias que pertencem a ordem Carnivora. Em baixo da imagem há uma representação do tempo em milhões de anos, em cima há indicação da escala de tempo geológica. Em destaque vermelho estão as famílias presentes no Brasil. Modificado de Hunter e Barrett, (2018).

No presente estudo serão estudadas algumas espécies da família Canidae. Esse grupo é constituído por 16 gêneros e 36 espécies (Figura 3) (PESSUTTI et al., 2001), e dentre essas serão avaliadas as espécies: *Chrysocyon brachyurus* (Lobo-guará), *Speothos venaticus* (Cachorro-vinagre), *Lycalopex vetulus* (Raposa-do-campo), *Cerdocyon thous* (Cachorro-do-mato) e *Canis lupus familiaris* (Cão doméstico).

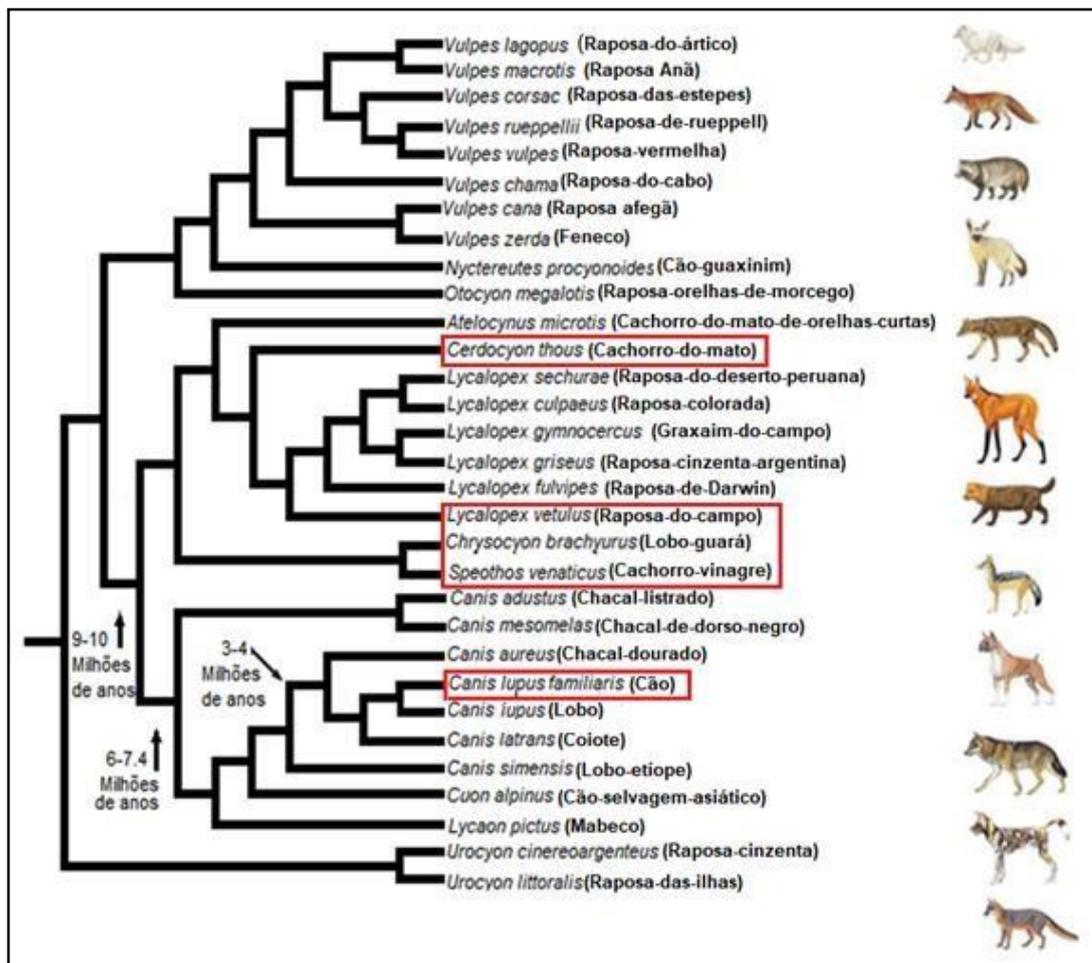


Figura 3: Cladograma apresentando a divisão taxonômica de 31 espécies de Canídeos, distribuídas em 13 gêneros. As setas apontam para a divisão de alguns clados, junto com a data de separação em milhões de anos. Os destaques em vermelho indicam as espécies que serão estudadas neste projeto. Ao lado direito do nome científico entre parênteses estão citados os nomes comuns das espécies. Representações ilustrativas de algumas espécies estão ao lado direito da imagem. Este cladograma foi construído com base nas sequências genômicas e modificado a partir do trabalho de Lindblad-Toh et al., (2005).

A espécie *Canis lupus familiaris*, também conhecida como cães domésticos, desempenha papéis importantes em nossa sociedade, podendo atuar em zooterapia, cães de companhia, guias para pessoas com deficiência visual ou auditiva, identificador de substâncias ilegais, transporte, entre outras. A interação homem-cão é considerada benéfica, tanto para aspectos físicos, quanto para aspectos psicológicos (KITAGAWA & COUTINHO, 2004; ROSS & BLOCK, 1988; LOPES & SILVA, 2012).

Quando os cães começaram a se relacionar com a espécie humana, esses animais foram selecionados para melhor aproveitamento de suas

características e habilidades (LOPES & SILVA, 2012). Como consequência dessa seleção, a espécie começou a apresentar diferenciação, dando origem a diversas raças, que hoje chegam a mais de 350 em todo o planeta (PARKER, et al., 2017).

Hoje em dia a espécie *C. l. familiaris* é considerada uma subespécie da *C. lupus*, devido suas semelhanças morfológicas, fisiológicas e genéticas (WILSON & REEDER, 2005; LOPES & SILVA, 2012; LEONARD et al., 2002). Mesmo com essas características, ainda não há consenso sobre a origem dos cães domésticos (FRANTZ et al., 2016; LEONARD et al., 2002; VILÀ et al., 1997; FREEDMAN et al., 2014; COPPINGER e COPPINGER, 2002; REED, 1959; ZIMEN, 1981). Vilà et al. (1997) realizaram um estudo baseado em DNA mitocondrial e inferiram que a separação entre as espécies ocorreu por volta de 100.000 anos atrás. Em contrapartida, a análise genômica realizada por Frantz et al. (2016) conclui que os cães domésticos atuais foram originados em duas regiões distintas, com uma linhagem oriunda da Ásia e outra da Europa, e a origem dessas linhagens ocorreu por volta de 14.000 a 6.400 anos atrás.

Para melhor compreensão e contextualização em relação aos aspectos ecológicos das espécies que foram estudadas neste projeto, o quadro 1 apresenta informações adicionais relacionadas ao nicho ecológico dos animais.

Quadro 1: Informações gerais sobre as espécies estudadas neste projeto. Os números indicados nos campos de informações correspondem à numeração de sua fonte.

Nome Científico	Nome Popular	Distribuição Geográfica	Habitat	Hábitos	Hábitos Alimentares	Fonte
<i>Canis lupus familiaris</i>	Cão doméstico	Todos os locais habitados pelo ser humano ¹	Todos os habitats ocupados pelo ser humano ¹	Predominantemente diurno ²	Onívoro ³	¹ ADW, 2019; ² SILVA, 2017; ³ ARAÚJO et al., 2018
<i>Speothos venaticus</i>	Cachorro-vinagre	Do Panamá até sul do Brasil, Paraguai e norte da Argentina, estendendo ao oeste da Bolívia, Peru e Equador ¹	Pantanal, Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado ²	Diurno ³	Carnívoro ⁴	¹ BEISIEGEL; ZUERCHER, 2005; ² JORGE et al., 2013; ³ BEISIEGEL; ADES, 2002; ⁴ FLOWER, 1880 apud BEISIEGEL; ZUERCHER, 2005
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Lobo-guará	Do centro-sul do Maranhão até Uruguai. Do leste do Peru até Espírito Santo e sul da Bahia ¹	Campo, Cerrado e Mata ²	Noturno ²	Onívoro ²	¹ PAULA; MEDICI; MORATO, 2007; ² DIETZ, 1984
<i>Lycalopex vetulus</i>	Raposa-do-campo	Brasil	Cerrado	Noturno	Onívoro	DALPONTE, 2009
<i>Cerdocyon thous</i>	Cachorro-do-mato	Colômbia, Venezuela, Brasil, Paraguai, Argentina, Uruguai e Bolívia ¹	Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pampas, Pantanal, Floresta Amazônica ¹	Noturno ²	Onívoro ²	¹ BEISIEGEL et al., 2013; ² BERTA, 1982

Cães domésticos são usados comumente como modelos de pesquisa (FAGUNDES & TAHA, 2004; HASIWA et al., 2011) incluindo estudos com visão (JACOBS et al., 1993; NEITZ et al., 1989; YOKOYAMA, 1998; MOWAT et al., 2008; AMANN et al., 2014; MALKEMPER & PEICHL, 2018; PEICHL 1991; PEICHL, 2001), porém, pouco se sabe sobre outras espécies que pertencem a família dos canídeos, principalmente no que se refere ao sistema visual.

1.1 Organização do sistema visual

A visão é uma das habilidades que permite ao animal perceber o mundo a sua volta (BOWMAKER, 2008). Especificamente a visão de cores permite que os animais possuam maior facilidade nas atividades de forrageamento, fuga de predadores, entre outros (YOKOYAMA, 2002; JACOBS & ROWE, 2004).

De forma geral, os olhos dos cães apresentam similaridade com os olhos de outros vertebrados. O olho desses animais é considerado bem desenvolvido, e é composto por três camadas: a camada externa, camada média e camada interna. A camada externa do olho é constituída por uma estrutura chamada esclera, um tecido que garante proteção e sustentação ao olho. A esclera apresenta uma porção contínua na região anterior do globo ocular, a córnea, uma lente transparente que permite a passagem de luz para o interior do olho. A camada média é composta pela úvea, que por sua vez apresenta o corpo ciliar, a íris e a coróide em sua formação. A coróide é um tecido altamente vascularizado responsável por nutrir a camada mais interna do olho, a retina (WALLS, 1942). Esses animais ainda possuem uma terceira pálpebra, chamada de membrana nictitante. Essa membrana está relacionada com a produção de lágrimas e proteção do globo ocular (MURPHY et al., 2012) (figura 4).

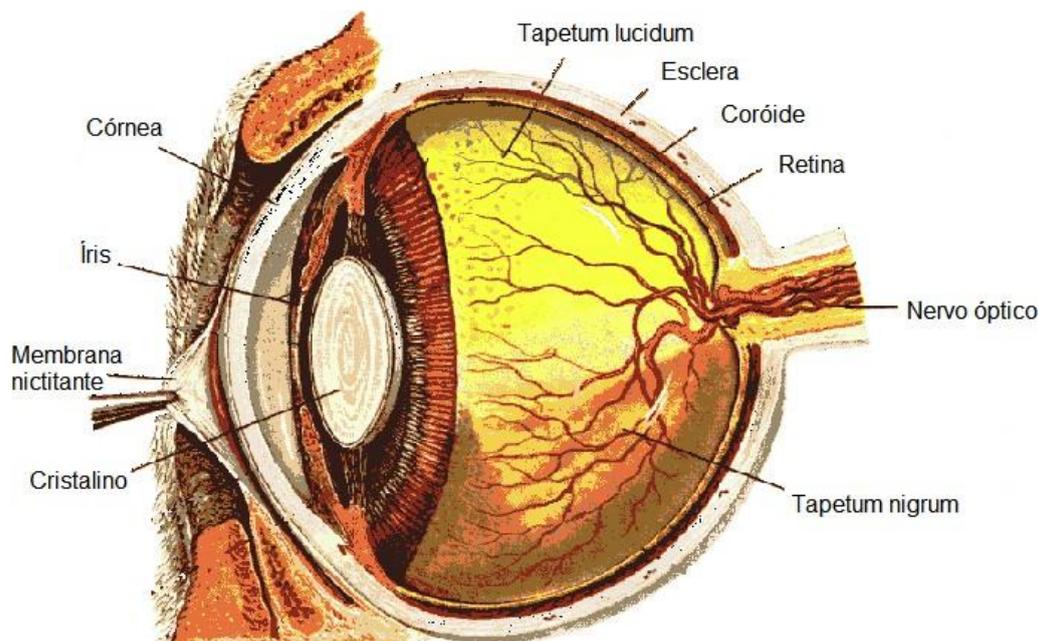


Figura 4: Ilustração esquemática de um olho de Cão doméstico (*Canis lupus familiaris*). Modificado de Evergreen (2011).

Anterior à retina, os cães possuem uma estrutura chamada *Tapetum lucidum* que permite com que a luz, que já passou pela retina retorne novamente a ela, garantindo aos fotorreceptores duas chances de absorvê-la. Essa dispersão de luz apresenta desvantagem pois pode reduzir a habilidade em

perceber detalhes na imagem (LESIUK & BRAEKEVELT, 1983). Logo abaixo desse tecido, encontra-se o *Tapetum nigrum*, uma estrutura pigmentada que tem como função diminuir a dispersão de luz dentro do globo ocular (WASSLE & BOYCOTT, 1991) (Figura 5).

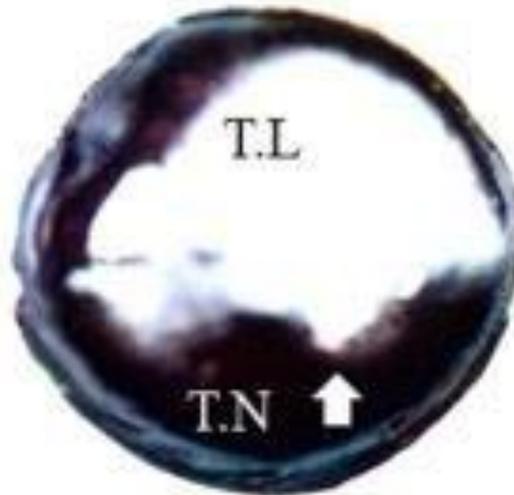


Figura 5: Imagem histológica de olho de cão doméstico indicando a presença do *Tapetum lucidum* (indicado como T.L na imagem) e *Tapetum nigrum* (indicado como T.N na imagem). Retirado de KOTB et al., 2019.

Lantyer-Araujo et al. (2019) realizaram um estudo de comparação anatômica e morfológica entre olhos de *C. thous* e *C. l. familiaris* e encontraram algumas particularidades anatômicas entre os olhos destes animais, como diferença em relação a dimensão do globo ocular, formato da fenda pupilar, entre outros. Mesmo com algumas divergências, ambas as espécies apresentam estruturas oculares similares, por exemplo, as camadas da esclera, coróide e retina.

A retina é a camada mais interna do olho, e é organizada em dez camadas formadas por corpos celulares e plexos nervosos que são dispostos da seguinte maneira: Epitélio pigmentado (EP), camada de fotorreceptores (CF), membrana limitante externa (MLE), camada nuclear externa (CNE), camada plexiforme externa (CPE), camada nuclear interna (CNI), camada plexiforme interna (CPI), camada de células ganglionares (CCG), camada de fibras nervosas (CFN) e membrana limitante interna (MLI) (RAMÓN & CAJAL, 1893). Nessas camadas são encontrados seis tipos celulares: os fotorreceptores, células bipolares,

células horizontais, células amácrinas, células ganglionares e células de Müller (WALLS, 1942) (figura 6). Em cães podemos encontrar a mesma organização laminar vista em vertebrados (figura 7).



Figura 6: Esquema da retina dos vertebrados. Epitélio pigmentado (EP) formado por células epiteliais; Camada de fotorreceptores (CF) apresenta células com formato cônico, e células em formato de bastão; Membrana limitante externa (MLE); Camada nuclear externa (CNE); Camada plexiforme externa (CPE); Camada nuclear interna (CNI) apresenta células horizontais, células bipolares e células amácrinas; Camada plexiforme interna (CPI); Camada de células ganglionares (CCG); Camada de fibras nervosas (CFN) e Membrana limitante interna (MLI) Modificado de Web Vision.

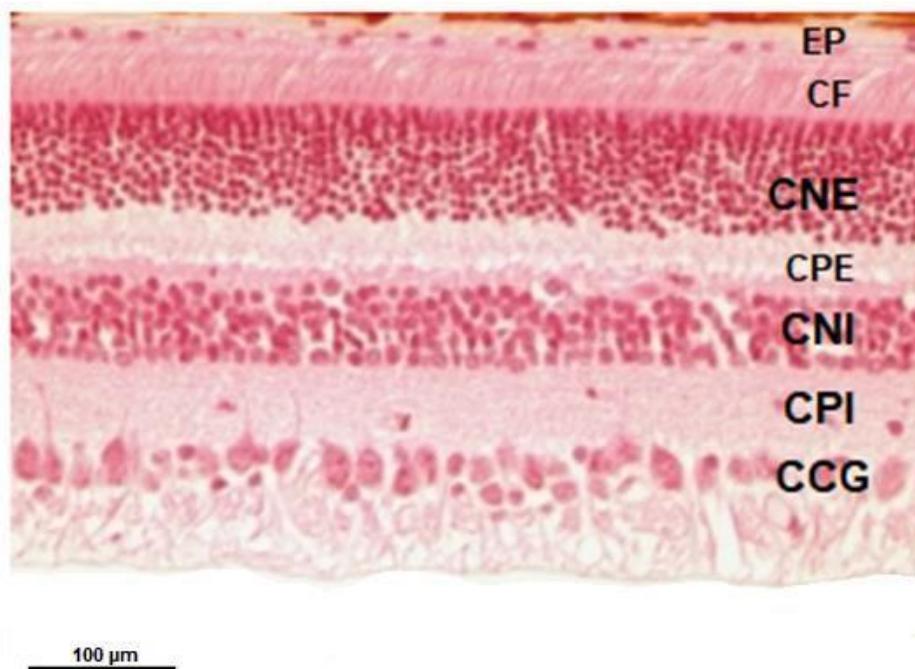


Figura 7: Corte longitudinal da retina de cão doméstico (*C. lupus familiaris*) corado por HE (Hematoxilina-Eosina). Epitélio pigmentado (EP); Camada de fotorreceptores (CF); Camada nuclear externa (CNE); Camada plexiforme externa (CPE); Camada nuclear interna (CNI); Camada plexiforme interna (CPI); Camada de células ganglionares (CCG). Modificado de LHÉRITEAU et al. (2009).

1.2 Fotorreceptores e o processo de fototransdução

O processamento visual é iniciado com a interação de fótons de luz com os fotorreceptores, que são células fotossensíveis e tem como função captar e realizar a transdução de energia luminosa em energia eletroquímica. Nesse processo são gerados sinais que fluem da retina para as fibras nervosas do nervo óptico até alcançar os centros superiores do sistema nervoso central, onde a imagem será gerada (WALLS, 1942).

Na retina de mamíferos, é possível encontrar dois tipos de fotorreceptores clássicos, os cones e os bastonetes. Os bastonetes são responsáveis pela visão escotópica, ou seja, tem maior sensibilidade à luz, ideal para visão noturna de baixa intensidade luminosa, e possuem o fotopigmento conhecido como rodopsina. Os cones por outro lado, são responsáveis pela visão fotópica, ou seja em alta intensidade luminosa presente principalmente durante o dia pois são menos sensíveis a luz. A quantidade e classificações desses fotorreceptores pode variar de acordo com as espécies. A espécie humana, por exemplo,

apresenta três tipos:. Cada um desses tipos de cone apresenta proteínas diferentes em seus pigmentos visuais, e essas proteínas fazem parte de um mesmo grupo chamado de opsinas (BOWMAKER, 2008).

Os fotorreceptores são neurônios especializados da retina e possuem um segmento externo, um segmento interno e uma terminação sináptica (figura 8). O segmento externo contém discos membranosos, e em suas membranas estão presentes os pigmentos visuais (figura 9) (BOWMAKER, 1991).

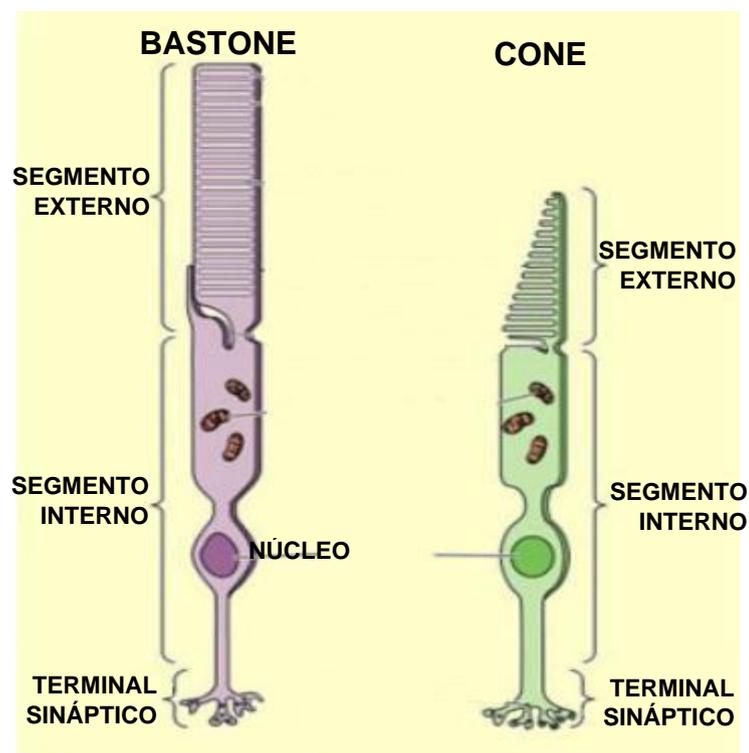


Figura 8: Representação em corte longitudinal dos fotorreceptores bastonete (à esquerda) e cone (à direita) da retina de vertebrados. As chaves ao lado das figuras indicam o nome das estruturas: Segmento externo, segmento interno e terminal sináptico. Vilosidades no segmento externo indicam os discos membranosos. Estruturas rosadas presentes no segmento interno ilustram a presença de mitocôndrias. Modificado de OLIVERA (2019).

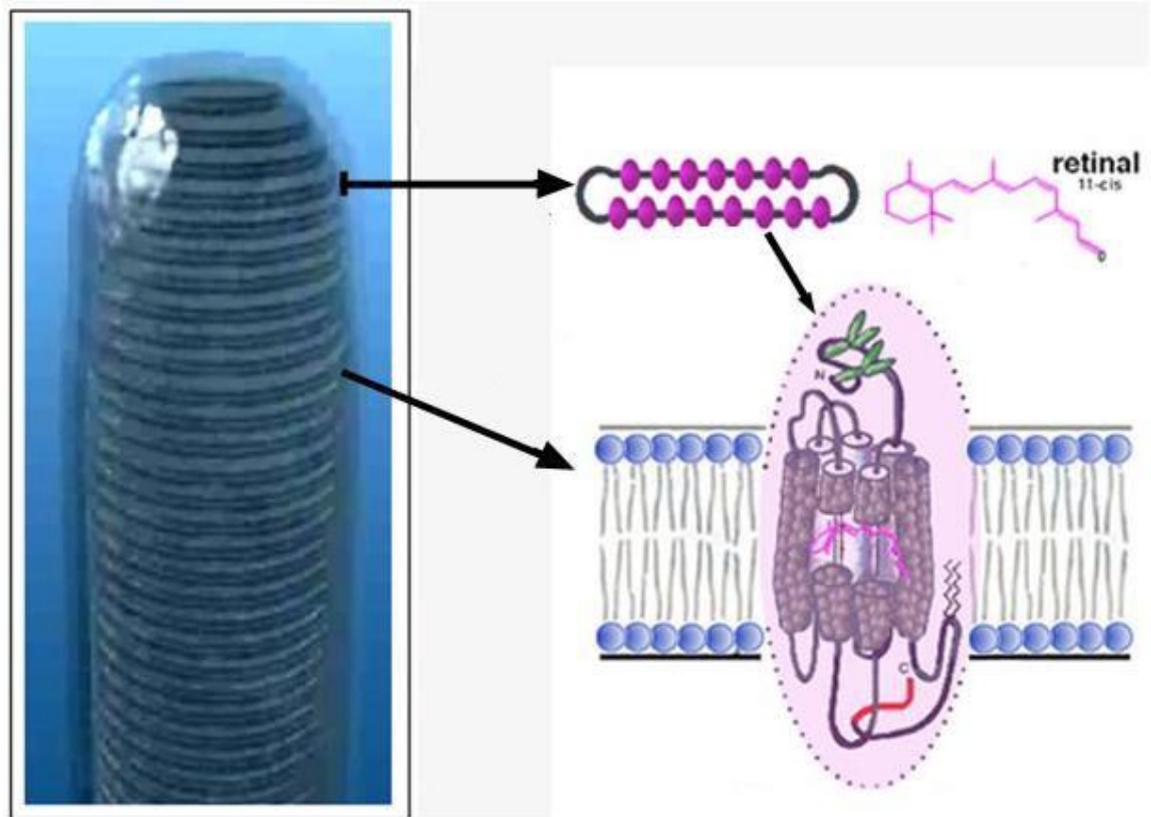


Figura 9: Ao lado esquerdo da imagem há uma representação de segmento externo de um fotorreceptor (bastonete) em um modelo em 3D. A seta superior que sai do modelo em 3D do segmento externo do fotorreceptor indica um corte transversal de um dos discos membranosos, os círculos em roxo indicam a presença de rodopsinas. Ao lado dessa representação há a estrutura química do 11-*cis* retinal. A seta inferior que sai do modelo em 3D do segmento externo do fotorreceptor indica uma ilustração de um corte longitudinal em uma membrana plasmática de um dos discos membranosos presentes no segmento externo, além de representar os fosfolípidios (pequenos círculos em azul) há uma ilustração de rodopsina circulada por uma forma oval em lilás. Modificado de WebVision.

Os ftopigmentos são responsáveis pelo processo de transdução do sinal luminoso em sinal eletroquímico, processo esse denominado de fototransdução (KAWAMURA,1993). Esses ftopigmentos, também conhecidos como pigmentos visuais, constituem o grupo de receptores de membrana acopladas à proteína G e são compostos por um cromóforo derivado da vitamina A chamado de retinal, e uma proteína transmembrana, que em cones são as opsinas, e em bastonetes a rodopsina.

O cromóforo é responsável por absorver energia dos fótons de luz, o que inicia uma série de reações químicas (SCHWARTZ, 2009). Quando não há luz, o retinal permanece em sua formação 11-*cis* retinal, porém com a presença de

luz, os fótons que são absorvidos provocam a isomerização do retinal, mudando sua configuração espacial para *todo-trans* retinal (figura 10), assim é iniciado o processo de transdução de sinal luminoso em sinal elétrico (NISHIDA, 2012).

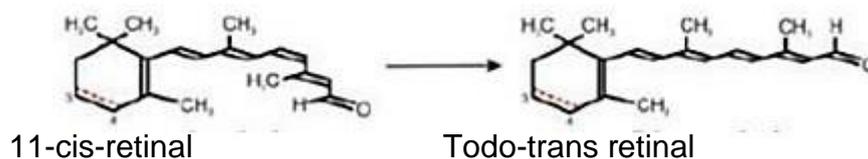


Figura 10: Representações das estruturas químicas do retinal na ausência (à esquerda) e presença (à direita) de luz. A seta entre as estruturas indica a alteração do retinal entre o 11-*cis* retinal e o *todo-trans* retinal. Modificado de Davies et al. (2012).

Com a alteração estrutural do retinal, também ocorre alteração na conformação da opsina. Essa modificação resultará na ativação de uma transducina, que por sua vez ativará uma fosfodiesterase. Essa enzima quebrará moléculas de GMPc em GMP. As moléculas de GMPc são responsáveis por manter canais de Na⁺ e Ca⁺⁺ abertos dentro da célula. Quando essas moléculas são quebradas, os canais iônicos não são abertos e ocorre hiperpolarização da célula, o que inibirá a liberação de neurotransmissores (figura 11) (OYAMADA, 2015).

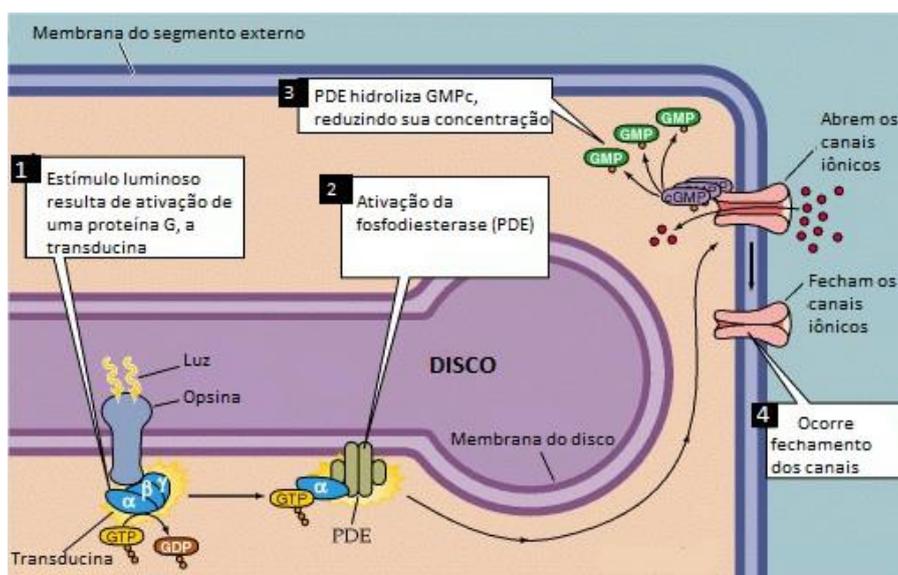


Figura 11: Ilustração esquemática representando a cascata de eventos que ocorre durante a fototransdução no segmento externo de um fotorreceptor. Modificado de Russo (2008).

A inibição da liberação de neurotransmissores pelos fotorreceptores ocasionará despolarização ou hiperpolarização das células bipolares e horizontais na camada plexiforme externa. Em seguida a informação gerada passará através da camada plexiforme interna, onde há comunicação entre os axônios das células bipolares com os dendritos das células amácrinas e ganglionares. Por fim, o estímulo produzido será transportado pelo nervo óptico, que é composto pelos axônios das células ganglionares, até as áreas visuais centrais, onde será formada a imagem (LAM et al., 1982).

1.3 Opsinas

As opsinas são proteínas compostas de aproximadamente 360 aminoácidos com sete domínios transmembrânicos. Em sua sétima hélice está acoplado o cromóforo. Além disso, essas proteínas fazem parte da família dos receptores acoplados a proteína G (BOWMAKER, 2008). Substituições de aminoácidos em determinadas regiões dessas proteínas afetam o deslocamento da absorção espectral observado nos diferentes tipos de cones (figura 12) (HUNT et al., 1998).

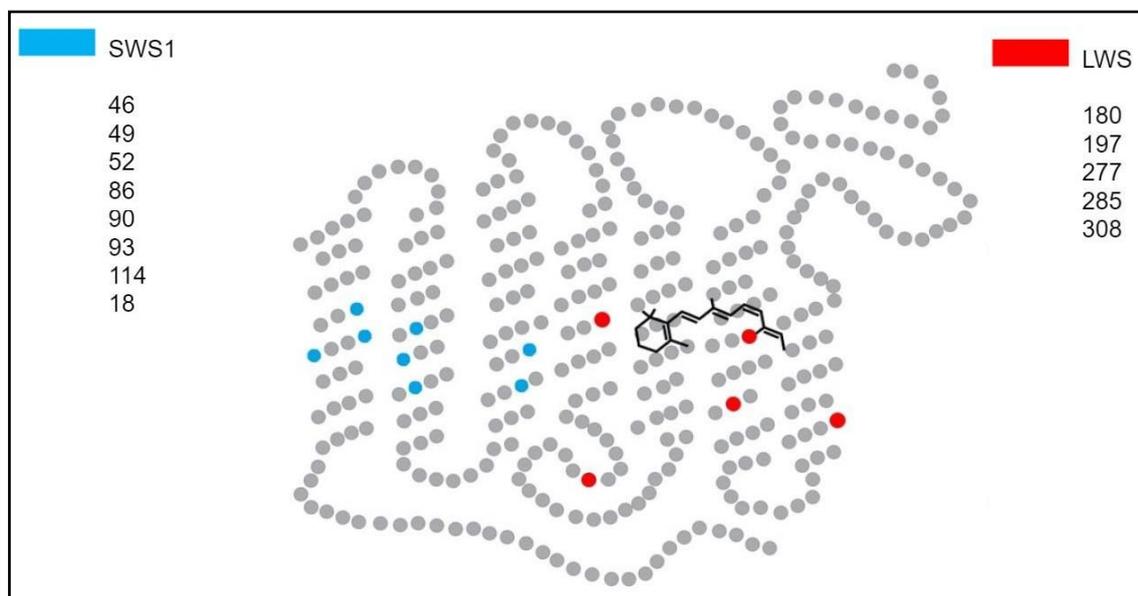


Figura 12: Ilustração em 2D de um fotopigmento. Os pontos em azul indicam oito sítios importantes para a inferência do pico de sensibilidade espectral do fotopigmento SWS1 em vertebrados (SHI et al., 2001; YOKOYAMA & SHI, 2000; HAUSER et al., 2014). Os pontos em vermelhos indicam os cinco sítios importantes para a inferência do pico de sensibilidade espectral do fotopigmento LWS em mamíferos (YOKOYAMA & RADLWIMMER, 1998). Modificado de Yokoyama (2002).

Em seres humano, a maioria dos indivíduos apresentam três tipos de cones, sendo esses chamados de cone L (*long*), cone M (*middle*) e cone S (*short*), o que caracteriza a visão de cores nesses indivíduos como tricromata. Cada tipo de cone apresenta um fotorreceptor com diferente pico de sensibilidade espectral, e essa característica define o tipo do fotorreceptor. Dessa forma os cones L, M e S são maximamente sensíveis aos comprimentos de onda longos, médios e curtos, respectivamente (figura 13) (DEEB, 2005; PURVES et al., 2001)

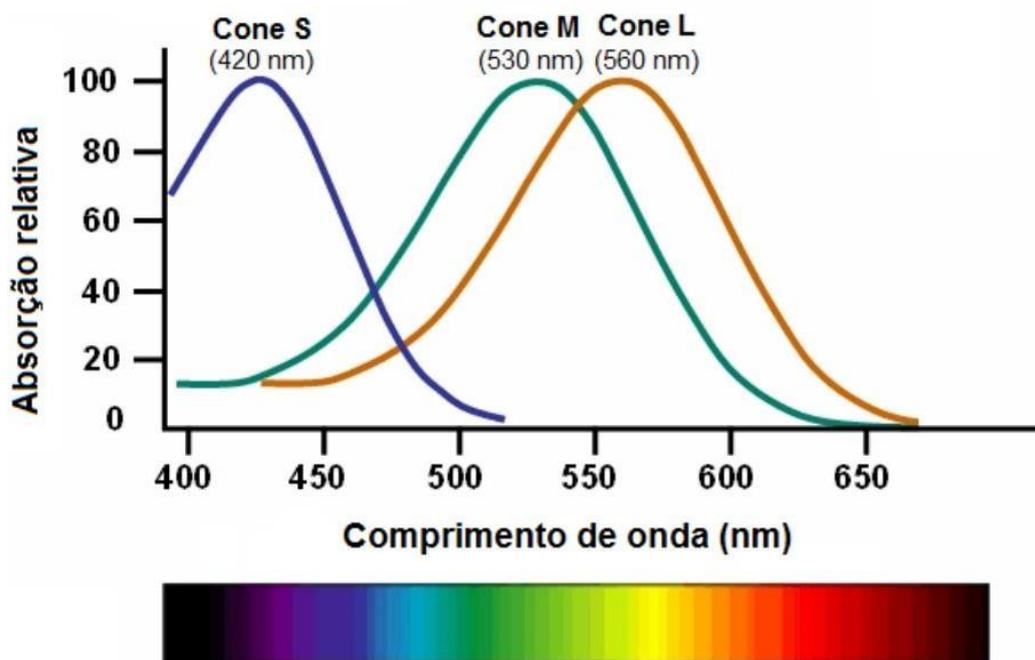


Figura 13: Representação das curvas de sensibilidade espectral das três classes de cones da retina de humanos com visão de cores tricromata. O pico de absorção espectral dos cones S, M e L estão indicados em parênteses. Modificado de Deeb (2005).

De forma geral, os mamíferos são dicromatas, ou seja, apresentam 2 classes de cones em suas retinas, com exceção de alguns animais, como alguns primatas que apresentam tricromacia, com três classes de cones, como ocorre com a espécie humana (JACOBS, 2009).

1.4 Genética e evolução da visão de cores em mamíferos

Entre o grupo de vertebrados existem cinco famílias de genes de opsinas que codificam as proteínas presentes nos cones e bastonetes. Os genes que são expressos nos cones são: *lws* que codifica os fotopigmentos maximamente sensíveis a comprimentos de onda longos, *sws1* e *sws2* que codificam fotopigmentos maximamente sensíveis a comprimentos de onda curtos, *rh2*, que codifica fotopigmentos maximamente sensíveis a comprimentos de onda médios. E o gene *rh1* que codifica as rodopsinas, expressa nos bastonetes (BOWMAKER, 2008; JACOBS, 2009; JACOBS & ROWE, 2006).

Para garantir ao indivíduo a habilidade de visão de cores, são necessários dois ou mais tipos de cones contendo fotopigmentos com picos de sensibilidade espectrais diferentes (PEICHL, 2005) e um sistema pós-receptoral capaz de comparar esses sinais. A pressão evolutiva apresenta um papel importante na percepção visual dos animais, uma vez que seleciona os componentes ideais ao ambiente em que os indivíduos estão inseridos. Alterações pontuais em nível de nucleotídeo nos genes das opsinas podem resultar em alterações de aminoácidos presentes nas estruturas das mesmas. Essas alterações podem afetar a interação entre a opsina e o cromóforo, o que pode resultar no deslocamento no pico de sensibilidade do fotopigmento (BOWMAKER, 2008).

1.5 Visão de cores em mamíferos

Até o presente momento, sabe-se que todos os mamíferos apresentam cones em suas retinas e que a visão de cores na maioria desses animais é dicromata uma vez que apresentam apenas 2 classes de cones, com exceção de alguns animais, como alguns primatas monocromatas e tricromatas e marsupiais australianos que apresentam tricromacia (JACOBS & DEEGAN, 1999; BOWMAKER, 2008) .

A maioria das espécies de mamíferos atuais, classificados como eutérios, perderam os genes *rh2* e *sws2*, e possuem os genes *lws* e *sws1* (figura 14). Devido a isso, esses animais são considerados dicromatas, uma vez que a habilidade de discriminação de cores nesses indivíduos ocorre com base na

comparação dos sinais emitidos pelos cones L e cone S (JACOBS, 2009; PEICHL, 2005).

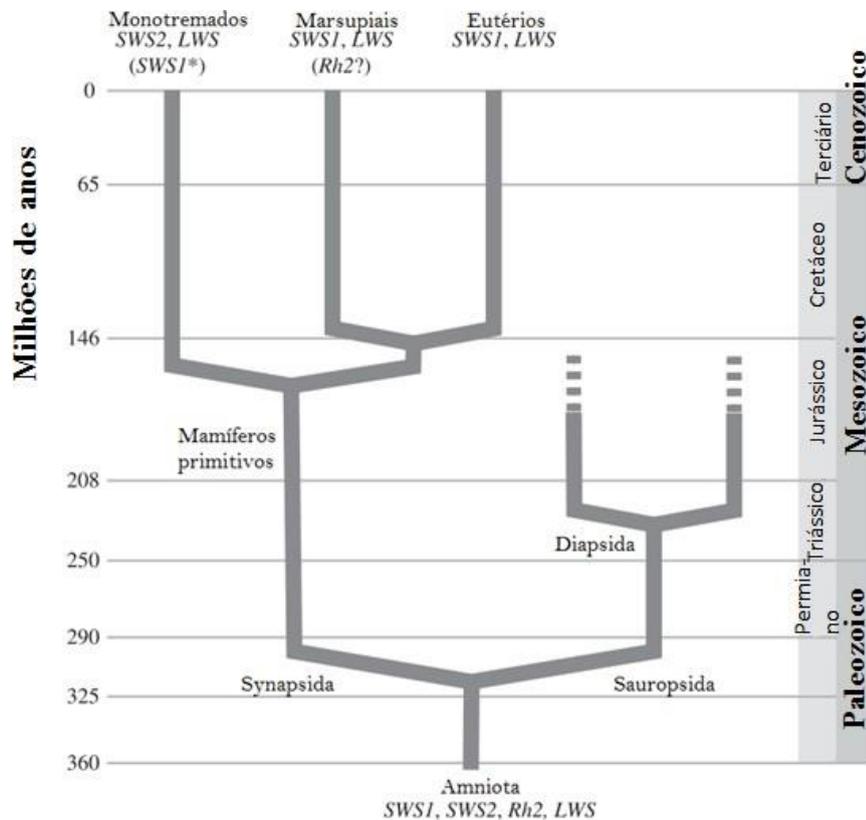


Figura 14: Árvore filogenética dos vertebrados ilustrando a distribuição dos quatro genes que codificam opsinas nos cones no grupo dos mamíferos. Monotremados apresentam os genes SWS2 e LWS, esses animais apresentam o gene SWS1 não funcional (*). Todos os eutérios possuem os genes SWS1 e LWS. Os marsupiais apresentam os genes SWS1, LWS e possivelmente esses animais também apresentam o gene Rh2. Modificado de Jacobs (2009).

Yokoyama e Radlwimmer (1998) propuseram a “regra dos cinco sítios” importantes na proteína para o ajuste espectral da opsina expressa a partir do gene *lws*, sendo esses os sítios 180, 197, 277, 285 e 308. Os autores encontraram a conformação de aminoácidos AHYTA nesses sítios na opsina de cachorro doméstico, e inferiram que essa conformação de aminoácidos proporciona um pico de absorção espectral de ~555nm para essa proteína, uma vez que, esse foi o resultado obtido por meio de testes de eletrorretinograma em cães domésticos para o fotopigmento LWS. . Em cães, o gene *lws* está localizado no cromossomo X, apresenta 6 exons, todos codificantes de proteína, e

transcreve um mRNA de aproximadamente 1.095 pares de base, que em seguida codificará uma proteína com cerca de 364 aminoácidos (HOWE et al., 2021).

Em cães domésticos, o gene *sws1* está presente no cromossomo 14, apresenta 5 éxons, todos codificantes de proteína, e transcreve um mRNA de aproximadamente 1.323 pares de base, que posteriormente codifica uma proteína com cerca de 348 aminoácidos (HOWE et al., 2021). Até o momento não há trabalhos que infiram o pico de absorção espectral do pigmento SWS1 de cães a partir de dados genéticos. Em vertebrados, os sítios importantes para inferir o pico de sensibilidade espectral da opsina SWS1 geralmente são: 46, 49, 52, 86, 90, 93, 114 e 118 (SHI et al., 2001; YOKOYAMA & SHI, 2000; HAUSER et al., 2014).

De acordo com Jacobs (1983), a habilidade de visão de cores é selecionada pelo ambiente em que as espécies habitam. Essa habilidade garante aos animais discriminar cores que são necessárias para garantir a sobrevivência das espécies, por exemplo, diferenciar frutos verdes e maduros. Ainda segundo o autor, embora a visão de cores tenha sido caracterizada em diversas espécies, existem poucos casos que relacionem o nicho ecológico dos animais com características dependentes da habilidade de ver cor, porém quando esse propósito é alcançado, é possível começar a entender o papel da visão de cores no comportamento dos animais.

Em alguns casos, é possível observar a influência no nicho ecológico dos animais sob a habilidade de visão de cores. A influência do ambiente pode ser observada em alguns grupos de mamíferos aquáticos como cetáceos e pinípedes. Esses grupos não possuem cones S em suas retinas e essa característica está relacionada ao ambiente em que esses animais vivem, onde a luminosidade não atua como ocorre no ar, tendo influência de diversos fatores como refração da água e moléculas dispersas no ambiente (GRIEBEL, 2002)

Além do ambiente, características como hábitos alimentares dos animais também podem influenciar na habilidade de identificar cores. No caso dos mamíferos, alguns estudos com primatas indicam que indivíduos tricromatas apresentam maior facilidade para encontrar certos tipos de alimentos de

coloração amarelo ao vermelho, o que sugere uma vantagem evolutiva em relação aos animais que não conseguem discriminar tal diferença dos alimentos (CAINE & MUNDY, 2000; VOROBYEV, 2004).

1.6 Visão de cores e fotorreceptores em Canídeos

Inicialmente Gregg et al. (1929) postularam que a discriminação de cores não é importante para a visão de cães, mas sim a discriminação de intensidade luminosa. Os autores afirmaram que esses animais são cegos para cores, ou então, que sua visão depende pouco de estímulos de cor. Mais recentemente, Pretterer et al. (2004), descreveram os cães com um sistema visual generalista, adaptado tanto para situações fotópicas, quanto para escotópicas. Segundo os autores, esses animais utilizam o olfato para suprimir as suas deficiências visuais.

Alguns trabalhos indicam que a visão de cores está presente no grupo dos canídeos (cães, lobos e raposas) (JACOBS et al., 1993; NEITZ et al., 1989; YOKOYAMA, 1998; MOWAT et al., 2008; AMANN et al., 2014; MALKEMPER & PEICHL, 2018; PEICHL 1991; PEICHL, 2001), e estudos comportamentais sugerem que cães possuem a habilidade de ver cores (TANAKA et al., 2000; KASPARSON et al., 2013).

Neitz et al. (1989) realizaram um experimento de discriminação de cores em cães. O experimento foi realizado com três cães de raças puras, dois Galgos italianos, um macho e uma fêmea, e um Poodle toy fêmea. Sucintamente, em um ambiente controlado para que os animais respondessem apenas a variação de cor, os cães ficavam em frente de três painéis, e em cada seção do experimento um dos painéis era iluminado por uma cor diferente. Os cachorros foram adestrados a encostar o focinho no painel quando percebessem essa variação, e assim, foi possível atestar que esses animais apresentam visão de cores típica de dicromatas, com os picos de sensibilidade de aproximadamente 429nm e 555nm.

Jacobs et al. (1993) realizaram testes de eletrorretinograma em quatro espécies de canídeos: cães domésticos (*Canis lupus familiaris*), Raposa-das-ilhas (*Urocyon littoralis*), Raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*) e a Raposa-do-Ártico

(*Vulpes lagopus*). Os resultados indicam que esses animais apresentam um pigmento visual com o pico de sensibilidade espectral em 555nm, e outro pigmento com a média de pico de sensibilidade espectral em aproximadamente 431,5nm, essa média foi obtida por meio das somas dos picos de sensibilidade espectral obtidos para as quatro espécies estudadas e dividindo o valor por quatro. Os autores ainda sugerem que esses resultados podem ser semelhantes para todos os membros da família Canidae, uma vez que as espécies estudadas são taxonomicamente distantes, os resultados semelhantes obtidos podem indicar que as demais espécies presentes nessa família podem apresentar respostas semelhantes

Os testes comportamentais e de eletroretinograma confirmam a presença de duas classes de cones na retina dos cães, sendo um deles o cone L que possui o fotopigmento maximamente sensível à comprimentos de ondas longos com o pico de sensibilidade espectral em 555nm, e o outro é um cone S que possui o fotopigmento maximamente sensível à comprimentos de ondas curtos com o pico de sensibilidade entre 429 e 431,5nm (JACOBS et al., 1993; NEITZ et al., 1989).

Segundo McGreevy et al. (2004) a distribuição dos cones na retina dos cães pode estar correlacionada com o tamanho do crânio desses animais, assim como ocorre na distribuição das células ganglionares. Os autores informam que essa correlação foi observada apenas nos cones L. Cães braquicéfalos apresentaram maior concentração desses cones na região temporal da retina enquanto os animais dolílocéfalos apresentaram menor concentração nessa mesma região. Em relação ao cone S não foi observada a mesma correlação, em ambos os casos (figura 15).

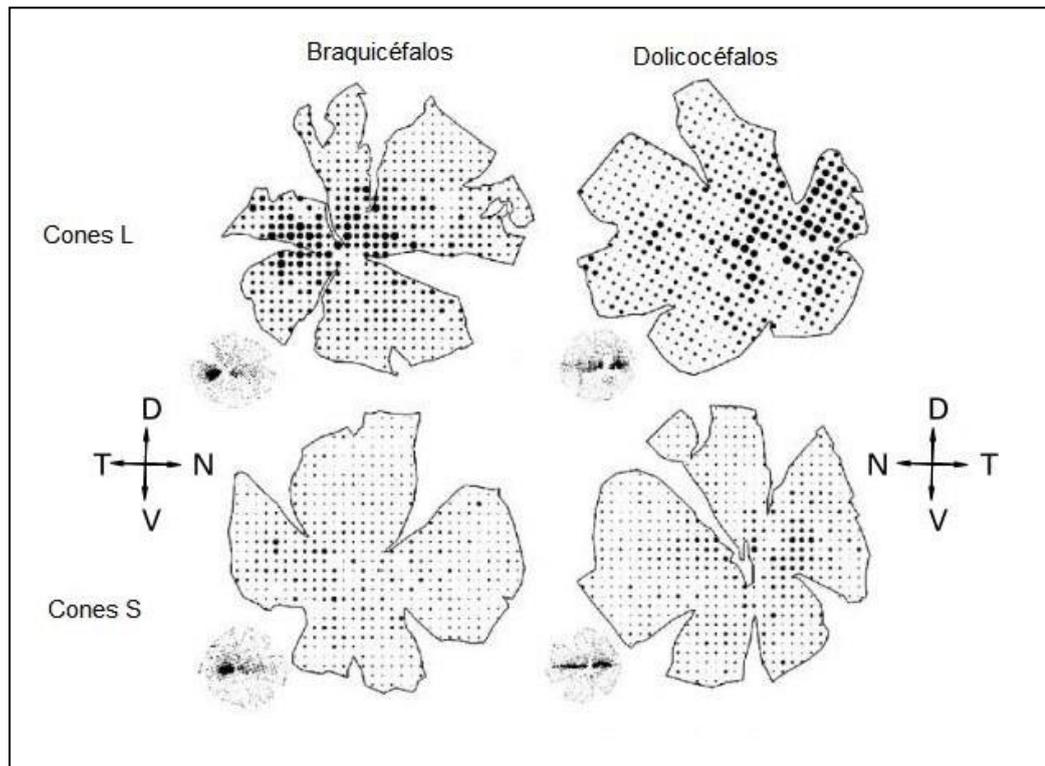


Figura 15: Mapas de isodensidade representando a distribuição de cones L e S nas retinas de cães domésticos. As duas retinas em cima indicam a distribuição dos cones L, ao lado esquerdo em um animal braquicéfalo, ao lado direito, de um animal dolicocéfalo. As duas retinas abaixo indicam a distribuição dos cones S, ao lado esquerdo de um animal braquicéfalo, e ao lado direito, de um animal dolicocéfalo. Os pontos dentro das retinas indicam a densidade dos cones, quanto maior os pontos, há maior densidade de cones na região, e quanto menor o ponto, menor é a densidade dos cones. As pequenas ilustrações ao lado esquerdo dos mapas indicam a distribuição das células ganglionares nessas retinas. As setas em cruz ao lado dos mapas indicam a posição do olho no animal, em que D significa dorsal, N significa nasal, V significa ventral e T significa temporal.. Modificado de Mcgreevy et al. (2004).

Para averiguar se aspectos evolutivos podem ter influenciado a sequência dos genes *lws* e *sws1* nos cães domésticos, foram coletadas amostras de diferentes raças. As informações sobre elas estão no quadro 2:

Quadro 2: Informações gerais sobre local de origem, primeiro registro catalogado, utilização e tamanho das raças estudadas no presente trabalho. Os números indicados nos campos de informação correspondem a numeração de sua fonte. CBKC:Confederação Brasileira de Cinofilia;AKC: *American Kennel Club*. Ao lado das informações encontram-se caracteres numérico referenciando a fonte da informação. Quando não há caracteres numéricos todas as informações foram obtidas de uma única fonte de referência.

Raça	Local de origem	Primeiro registro	Utilização	Média de tamanho (cm)	Fonte
Akita	Japão	1603	Caça e luta	58 à 70	CBKC
Borzoi	Rússia	Século XV (1401-1500)	Caça e corrida	68 à 85	CBKC
Buldogue francês	França	1880	Cães Toy e de Companhia	24 à 35	CBKC
Dachshund	Alemanha ¹	1800 ²	Caça ¹	20,3 à 22,8 ²	¹ CBKC ² AKC
Galgo italiano	Itália	século V A.C.	Corrida	32 à 38	CBKC
Golden retriever	Grã-Bretanha ¹	Entre 1840 and 1890 ²	Caça ¹	51 à 61 ¹	¹ CBKC ² AKC
Greyhound	Grã-Bretanha.	4000 A.C.	Caça e corrida	68 à 76	CBKC
King Charles Spaniel	Grã-Bretanha ¹	1600 ²	Companhia ¹	22,8 à 25,4 ²	¹ CBKC ² AKC
Pastor Australiano	Estados Unidos da América	1800	Pastoreiro de fazendas e ranchos	46 à 58	CBKC
Pequinês	China ¹	1860 ²	Companhia ¹	15,2 à 22,8 ²	¹ CBKC
Pug	China ¹	1500 ¹	Companhia ¹	25,4 à 33 ²	¹ CBKC ² AKC
Shih-tzu	China	1931	Companhia	até 27	CBKC
Spitz	Alemanha ¹	1450 ²	Companhia ¹	20 ¹	¹ CBKC ² AKC
SRD	Sem padrão	Sem padrão	Sem Padrão	Sem padrão	

Raça	Local de origem	Primeiro registro	Utilização	Média de tamanho (cm)	Fonte
Whippet	Grã-Bretanha ¹	Era vitoriana (1838 à 1901) ²	Raça originariamente utilizada para caça, um ou outro pelo faro ou pela visão ¹	44 à 51 ¹	¹ CBKC ² AKC
Yorkshire	Grã-Bretanha ¹	1850 ¹	Companhia ¹	17,8 à 20,3 ²	¹ CBKC ² AKC

O estudo comportamental de Jotta (2012) demonstrou que uma fêmea de Lobo-guará (*C. brachyurus*) apresentou comportamento de um animal tricromata, porém a análise genética em quatro indivíduos não comprovou esse resultado, demonstrando uma dicromacia em outros animais dessa espécie. O trabalho de Emerling et al. (2015) indica que o Lobo-guará e o Cachorro-vinagre (*S. venaticus*) apresentam o gene *sws1*. Além de sequenciar o gene, os autores conseguiram inferir que o fotopigmento SWS1 desses animais apresenta respostas à estímulos de comprimentos de onda do espectro violeta, porém não identificaram seu pico de sensibilidade espectral.

O presente trabalho pretende fazer um estudo comparativo sobre a genética dos pigmentos visuais de diferentes espécies de canídeos para compreender melhor o processo evolutivo das opsinas dentro do grupo. Além disso, serão analisados os genes dos pigmentos visuais em diferentes raças de cães domésticos, para assim avaliar se o processo de seleção artificial das raças e adaptação a diferentes habitats teria exercido uma pressão seletiva nos genes das opsinas.

2 JUSTIFICATIVA

Dada a relevância da visão para a sobrevivência dos animais, estudos que pretendem investigar essa habilidade propiciam melhor compreensão sobre sua importância no comportamento dos animais. Devido à carência de pesquisas em relação a estudos dos pigmentos visuais em canídeos, é necessária maior investigação para entender como esses animais percebem o mundo.

Além disso, estudos comparativos podem trazer informações em relação a evolução dos pigmentos visuais em determinados grupos de animais. Com

informações sobre a genética das opsinas dos canídeos estudados neste trabalho (figura 16), é possível observar se houveram modificações dessas moléculas ao longo da história evolutiva das espécies e se essas mudanças se correlacionam com algum aspecto da vida desses animais.

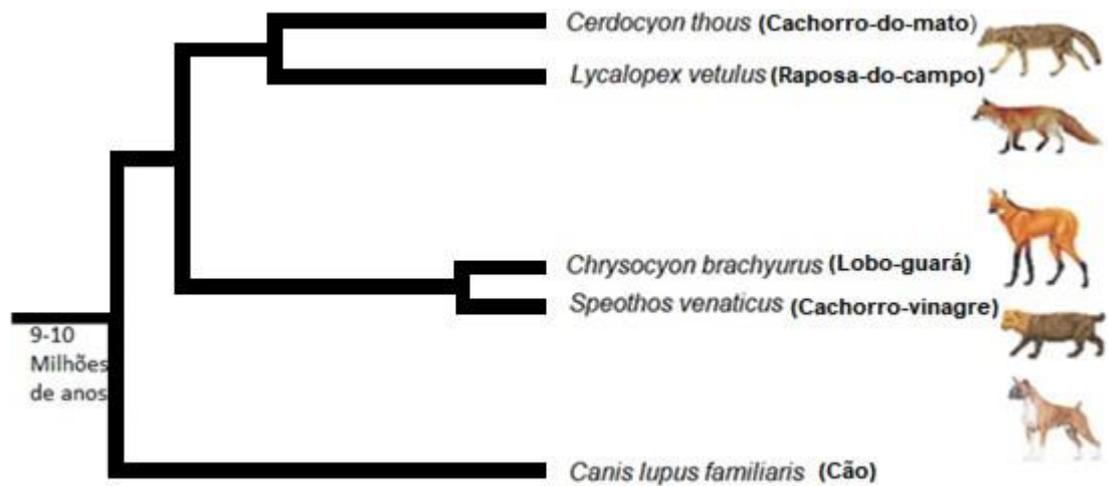


Figura 16: Cladograma simplificado ilustrando as espécies que foram estudadas neste projeto. Modificado de Lindlab-toh.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar os genes das opsinas presentes em diferentes espécies de canídeos.

3.2 Objetivos específicos

- Sequenciar os éxons 3, 4 e 5 do gene *lws* nas espécies *Chrysocyon brachyurus* (Lobo-guará), *Speothos venaticus* (Cachorro-vinagre), *Lycalopex vetulus* (Raposa-do-campo), *Cerdocyon thous* (Cachorro-do-mato) e diferentes raças de *Canis lupus familiaris* (Cão doméstico);
- Sequenciar o éxon 1 do gene *sws1* nas espécies *Cerdocyon thous* (Cachorro-do-mato), *L. vetulus* (Raposa-do-campo) e diferentes raças de *Canis lupus familiaris* (Cão doméstico);
- Inferir e comparar os picos de sensibilidade espectral das opsinas das espécies selecionadas e de diferentes raças de cães domésticos;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos realizados neste projeto estão de acordo com os princípios éticos de gestão e experimentação estabelecido pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBIO) sob protocolo nº 71236-1 (Anexo 1). Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa animal do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo sob protocolo nº 8595300719 (Anexo 2).

4.1 Coleta do material

A coleta do material biológico dos animais silvestres foi realizada em parceria com o Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros (PZMQB) e Zoológico de São Paulo (FPZSP). Para esses animais, optamos por utilizar amostras de sangue, soro ou DNA genômico, dependendo da disponibilidade de coleta e do material armazenado nas instituições.

Para a análise dos animais mantidos nos zoológicos, foi solicitado uma amostra de 2ml sangue coletado em tubos de EDTA. A coleta de sangue foi realizada por profissionais especializados em cada instituição colaboradora. Foram coletadas amostras de sangue, soro ou DNA já extraído das espécies *L. vetulus*, *C. brachyurus*, *S. venaticus* e *C.thous*.

Quadro 3: Informações sobre a instituição de origem e o material biológico obtido das espécies de canídeos silvestres estudadas no presente trabalho. A sigla PZMQB refere-se ao Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros e a sigla FPZSP refere-se ao Zoológico de São Paulo.

Espécie	Amostra biológica	Instituição de origem
C. brachyurus	Soro	PZMQB
C. thous	Sangue DNA extraído	PZMQB FPZSP
L. vetulus	Sangue	PZMQB
S. venaticus	DNA extraído	FPZSP

Para cães domésticos, foi realizada a coleta de amostras de saliva. Esse método foi escolhido por ser menos invasivo ao animal. As amostras de saliva dos cães domésticos foram obtidas com a contribuição de colegas, familiares, e com o apoio do médico veterinário Dr. Francisco Moreno que se disponibilizou em contribuir com o trabalho, coletando as amostras dos cães que atende. Os tutores dos animais foram informados sobre o projeto e o método de coleta, e somente com a sua autorização e assinatura no termo de ciência e concordância (apêndice I) as amostras foram coletadas.

Para realizar a coleta de saliva, foi utilizado o procedimento de raspagem bucal com auxílio de um *swab*. Após a raspagem com o *swab*, o mesmo foi mantido em um microtubo de 1,5ml contendo 300µl de solução *Cell Lysis*. Essa solução é necessária para realização da extração de DNA descrita a seguir no item 4.2.

Amostras de saliva de cães domésticos foram obtidas. Esses indivíduos são classificados e distribuídos em 16 raças diferentes (quadro 4).

Quadro 4: Raça e número de cães analisados neste trabalho. SRD: Sem raça definida.

Raça	Número de animais
Akita	1
Borzoi	3
Bulldog francês	1
Galgo italiano	2
Golden retriever	3
Greyhound	2
King Charles Spaniel	1
Lhasa apso	3
Pastor Australiano	2
Pequinês	4
Pug	4
Shih-tzu	2
Spitz	2
SRD	9
Teckel	1
Whippet	4
Yorkshire	1

4.2 Extração e quantificação do DNA

Para extração do DNA, utilizou-se o kit *PUREGENE DNA purification* (Gentra Systems) da QIAGEN seguindo o protocolo do fabricante para cada tipo de amostra: sangue, saliva ou soro. Após a extração, a concentração de DNA foi obtida utilizando o microespectrofotômetro Nanodrop 2000.

Das 45 amostras de cães domésticos coletadas, 41 tiveram o DNA extraído. Não foi realizada a extração do DNA de 4 amostras devido ao tempo utilizado para realizar as extrações em laboratório. Todas as 03 amostras de sangue e soro das espécies *C. thous*, *C. brachyurus* e *L. vetulus* tiveram seu DNA extraído.

As informações sobre a extração e quantificação do material genético extraído das amostras de cães domésticos e canídeos silvestres constam no apêndice II e III.

Após a extração de DNA, as amostras permaneceram a -20°C e foram utilizadas nas reações de PCR.

4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*) é utilizada para realizar a amplificação de regiões específicas do material genético. A PCR se baseia em três etapas, nas quais há uma variação de temperatura para que a amplificação da sequência de interesse seja obtida (figura 17).

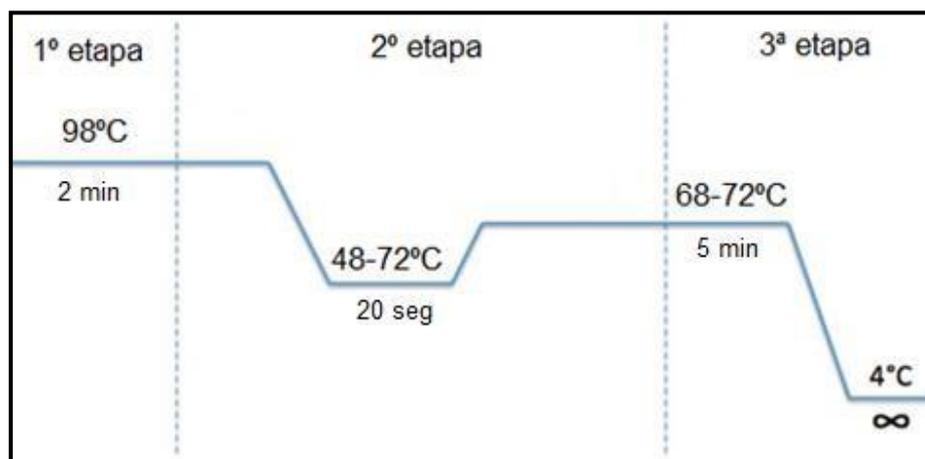


Figura 17: Ilustração esquemática com um exemplo de protocolo utilizado no termociclador para a técnica de PCR. A imagem ilustra a divisão das três etapas de variação de temperatura para o processamento do método. Acima da linha do gráfico em azul, são indicadas as temperaturas utilizadas, e abaixo dessa linha é indicada a duração de tempo em minutos (min) e segundos (seg) de cada etapa. Modificado de GenScript, disponível em: <https://www.genscript.com/pcr-protocol-pcr-steps.html>.

A primeira etapa é conhecida como processo de desnaturação, e nela ocorre a separação da dupla-fita de DNA com a quebra das pontes de hidrogênio devido a temperatura. Na segunda etapa, conhecida como etapa de anelamento, ocorre a ligação dos *primers*, que são os iniciadores da síntese de uma nova fita de DNA. Os *primers* são pequenas sequências de nucleotídeos que se ligam a sequência de DNA devido queda de temperatura. A temperatura de anelamento é variada de acordo com a sequência de nucleotídeos dos *primers*. Na terceira etapa, conhecida como etapa de extensão, a enzima responsável pela síntese de uma fita complementar de DNA, se liga aos primers e com a elevação da temperatura realizará a síntese de uma nova dita de DNA (figura 18)

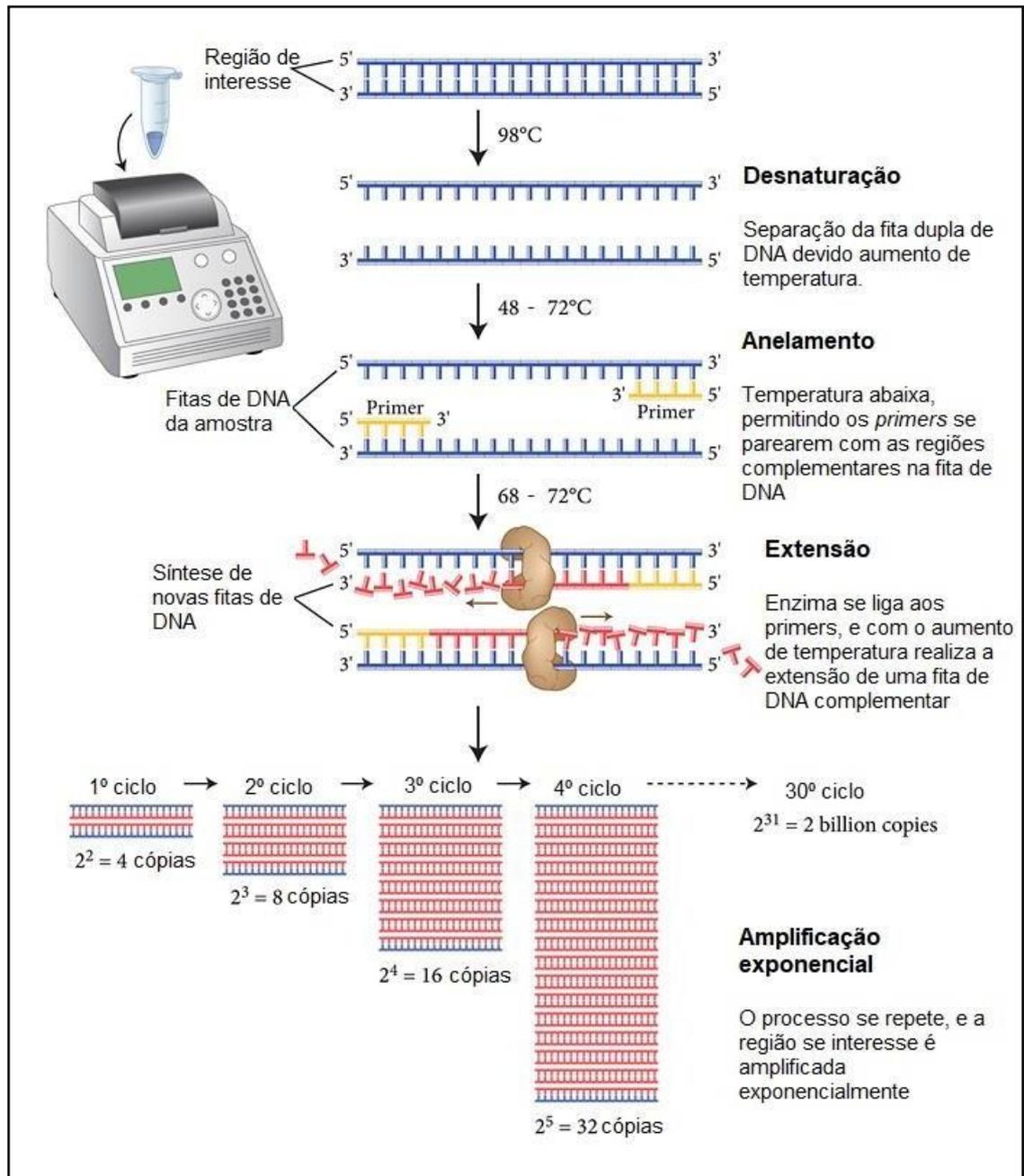


Figura 18: Esquema com a descrição e ilustração das etapas que ocorrem com as amostras de DNA durante o processamento no termociclador. No canto superior esquerdo é ilustrado um termociclador em cinza e um microtubo com amostra. Na região central da imagem se encontra, as ilustrações indicando o que ocorre durante o processo de amplificação das fitas de DNA no termociclador. Ao lado direito da imagem, encontra-se as explicações em forma de texto indicando cada uma das que ocorrem na amplificação do material genético na técnica de PCR. Modificado de NEB, disponível em: <https://www.neb.com/products/pcr-qpcr-and-amplification-technologies/master-mixes/master-mixes>.

A técnica de PCR foi utilizada para amplificar os éxons 3, 4 e 5 do gene *lws*, e o éxon 1 do gene *sws1*. Para tal, utilizou-se o kit *Platinum Taq DNA Polymerase* (Life Technologies), seguindo o protocolo do fabricante. Esse kit possui os seguintes reagentes: Enzima Platinum Taq polymerase, Magnésio na concentração de 50mM, 10x tampão. Além desses reagentes, foram utilizados dNTPs (desoxirribonucleotídeos fosfatados) na concentração de 10mM.

Para realização da PCR, foi necessário desenhar *primers* com o objetivo de amplificar as regiões de interesse do DNA. Foram utilizadas as sequências dos genes *lws* (ENSCAFG00000019441) e *sws1* (ENSCAFG00000001626) de cães domésticos presentes na plataforma Ensembl (HOWE et al., 2021) para a confecção dos *primers* realizada no programa online Primer3 (KORESSAAR & REMM, 2007; UNTERGASSER et al., 2012). Os *primers* utilizados neste trabalho estão descritos no quadro 5. Em todas as reações foram utilizados primers com a concentração de 20uM e 35 ciclagens como parâmetro para a PCR no termociclador.

Quadro 5: Descrição dos *primers* utilizados na PCR.

Nome	Sequência	Temperatura de Anelamento
L3_Exon3Canis_fw	TTGGCTGATCTGGATGGAAT	58 °C
L3_Exon3Canis_rv	CCTTGGGACAAATTGCTGTT	58 °C
L4_Exon4Canis_fw	CTGTCAGCCCTTCTCTCCAG	59 °C
L4_Exon4Canis_rv	ATCCTACAATTCCTTCGGGG	59 °C
L1_Exon5Canis_fw	CTGGGATACAGAGGCAGGAG	65 °C
L1_Exon5Canis_rv	CCTTTCAGAGTCTTGGCCTG	65 °C
S1_Exon1Canis_fw	GGGGCTTGGACAGCTCTAAT	63 °C
S1_Exon1Canis_rv	GAGTGGGTCCCTAAAGAGGC	63 °C

Em todos os protocolos realizados, foram utilizados os parâmetros descritos na figura 19.

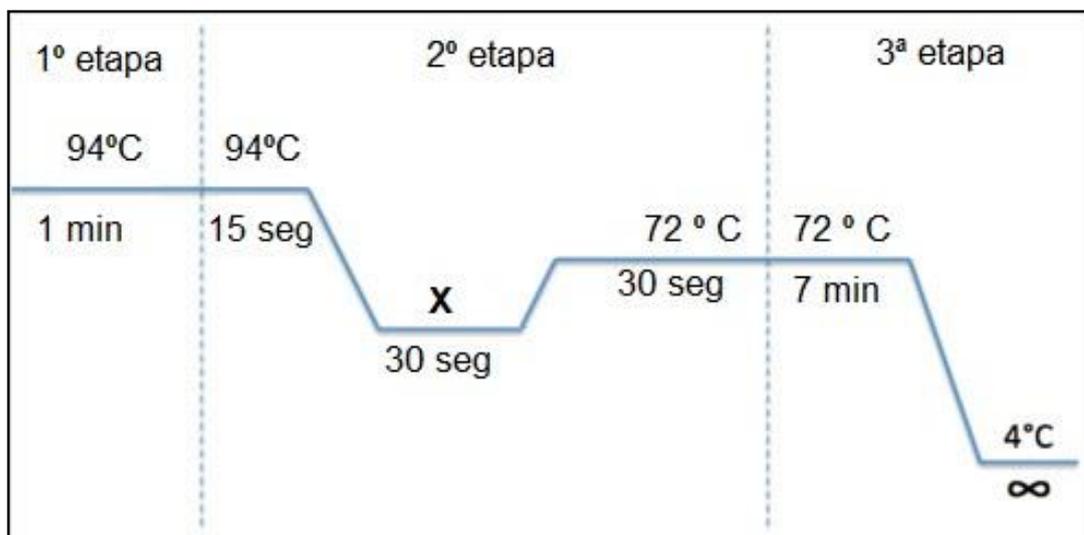


Figura 19: Ilustração esquemática do protocolo de PCR utilizado no termociclador Veriti da ThermoFisher Scientific para o desenvolvimento deste trabalho. A imagem apresenta divisão das três etapas de variação de temperatura para o processamento do método. Acima da linha do gráfico em azul, são indicadas as temperaturas utilizadas, e abaixo dessa linha é indicada a duração de tempo em minutos (min) e segundos (seg) de cada etapa. O "X" indica que a temperatura utilizada para a realização do anelamento variou de acordo com os primers utilizados na reação. Modificado de GenScript, disponível em: <https://www.genscript.com/pcr-protocol-pcr-steps.html>.

Após a PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose. Nesse processo, as sequências amplificadas são coradas e dispostas em um gel de agarose dentro de uma cuba com corrente elétrica, contendo um polo negativo e outro positivo. As amostras de DNA possuem carga negativa, e por isso, são dispostas na região de polo também negativo, para que assim, migrem ao polo positivo. A velocidade da migração das sequências irá depender do protocolo utilizado na eletroforese, do tamanho da sequência e da concentração do gel utilizado.

Neste trabalho, foi utilizado 1ul do produto da PCR ao qual foi adicionado 9ul do tampão de corrida *BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X)* da ThermoFisher Scientific. A concentração do gel de agarose utilizada foi de 2%, e os parâmetros utilizados para a eletroforese foram: 90 volts, e 35 minutos. Em seguida, os resultados foram visualizados através de luz ultravioleta (UV) utilizando um transiluminador da marca UVTRANS (figura 20). Utilizou-se o tampão TAE 1x para a confecção do gel de agarose e como meio para a corrida na cuba de eletroforese.

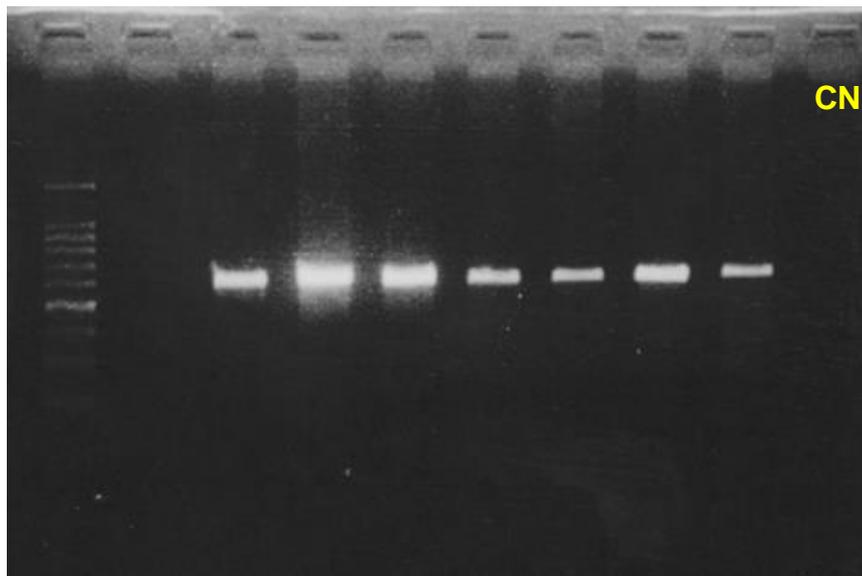


Figura 20: Resultado da PCR após eletroforese em gel de agarose (2%). Na primeira canaleta está o ladder de 100pb, em seguida, as canaletas onde as amostras são pipetadas no gel. É possível observar as bandas que indicam a amplificação do material genético a partir da terceira canaleta. Na décima canaleta se encontra o controle negativo, indicado como CN em amarelo na imagem, esse é utilizado para verificar se houve contaminação durante a reação de PCR.

Após a eletroforese, o produto de PCR foi mantido à -20°C até o momento de ser purificado. Para purificação utilizou-se o kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band purification* (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram armazenadas à -20°C para posterior sequenciamento.

4.4 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado com o kit *Big Dye Terminator* (Life Technologies) e sequenciador 3500xL (Life Technologies) do Instituto Israelita de Ensino Albert Einstein (IIEPAE), em São Paulo.

Além disso, também contamos com o serviço terceirizado de sequenciamento Sanger do projeto Genoma USP.

4.5 Análise de dados

As sequências de nucleotídeos obtidas após o sequenciamento foram comparadas com sequências de genes de opsinas de outras espécies de canídeos, felinos e outros mamíferos já depositadas no Genbank (NCBI), utilizando o programa BioEdit v7.2.5. Para o gene *lws* foram utilizadas as

sequências de humano (GenBank:AH005298.2), boi (*Bos taurus*-NM_174566.1), cavalo (*Equus caballus*-NM_001081845.1), coelho (*Oryctolagus cuniculus*-NM_001322264.1), Gato (*Felis catus*-AF132040.1) e cachorro (*Canis l. familiaris*-NM_001197072.1). Os alinhamentos foram realizados separadamente para cada um dos três éxons amplificados.

Para o gene *sws1* foram utilizadas as sequências de Boi (*Bos taurus*-NM_174567.1), elefante (*Loxodonta africana*-NM_001280859.1), porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*-NM_001172758.1), camundongo (*Mus musculus*-AF190671.2), tigre-siberiano (*Panthera tigris altaica*-XM_007078061.2), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*-KT221562.1), cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*-KT221593.1), Feneco (*Vulpes zerda*-KT221601.1), raposa-do-ártico (*Vulpes lagopus*-KT221600.1), raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*-XM_026010889.1), dingo (*Canis lupus dingo*-XM_025471586.1) e cachorro (*Canis lupus familiaris*-XM_539386.6).

Os sítios importantes para inferir o pico de sensibilidade espectral das opsinas do gene *lws* são: 180, 197, 277, 285 e 308, tendo como referência o gene *lws* de humano (GenBank:AH005298.2), (Yokoyama e Radlwimmer, 2001). Em relação as opsinas do gene *sws1*, os sítios importantes para inferir seu pico de sensibilidade espectral em vertebrados são: 46, 49, 52, 86, 90, 93, 114 e 118, e a referência utilizada no alinhamento foi o gene da rodopsina bovina (GenBank: NM_001014890.2) (SHI et al., 2001; YOKOYAMA & SHI, 2000; HAUSER et al., 2014).

4.6 Modelagem das proteínas

Para inferir as estruturas dos fotopigmentos, utilizou-se a técnica de modelagem comparativa utilizando a plataforma *Swissplot* (WATERHOUSE et al., 2018; BIENERT, et al., 2017; GUEx et al., 2009; STUDER et al., 2020; BERTONI et al., 2017). A plataforma utiliza uma sequência como molde e desenvolve um modelo em 3D da proteína a partir da sequência de aminoácidos fornecida pelo usuário.

Neste projeto, foi utilizada como sequência molde a estrutura cristalográfica da rodopsina bovina. Além disso, utilizou-se as sequências

completas de aminoácidos para o SWS1 (XM_539386.6) de cães domésticos presentes nos bancos de dados do NCBI.

Optou-se por utilizar as sequências de cães domésticos disponíveis nos bancos de dados pois: (I) no presente trabalho, realizou-se a amplificação parcial dos genes. (II) Observou-se alta similaridade das sequências dos cães domésticos com os outros canídeos analisados.

6 RESULTADOS

As informações completas referentes as amostras que foram amplificadas, sequenciadas e analisadas, tanto para o LWS quanto para o SWS1 se encontram nos apêndices IV e V respectivamente.

6.1 LWS

6.1.1 Cães domésticos

A amplificação e sequenciamento dos cinco sítios importantes para inferir o pico de sensibilidade espectral do LWS foi possível de ser realizada em 12 animais, contemplando cinco cães sem raça definida (SRD), três Pequinês, um Akita, um King Charles Spaniel, um Pug e um Whippet. Além desses, também foi realizada amplificação e sequenciamento parcial dos éxons desse gene em outros animais (apêndice IV).

Para o éxon 3, foi observada uma Alanina no sítio 180 (A180). O próximo sítio importante é o 197, localizado no éxon 4, observou-se a presença do aminoácido Histidina (H197). No éxon 5, pode-se observar a presença de uma Tirosina no sítio 277, uma Treonina no sítio 285 e uma Alanina no sítio 308 (Y277, T285 e A308) completando assim os cinco sítios importantes para o ajuste espectral do pigmento LWS (figura 21), estabelecendo, portanto, o perfil AHYTA para o fotopigmento LWS das amostras analisadas.

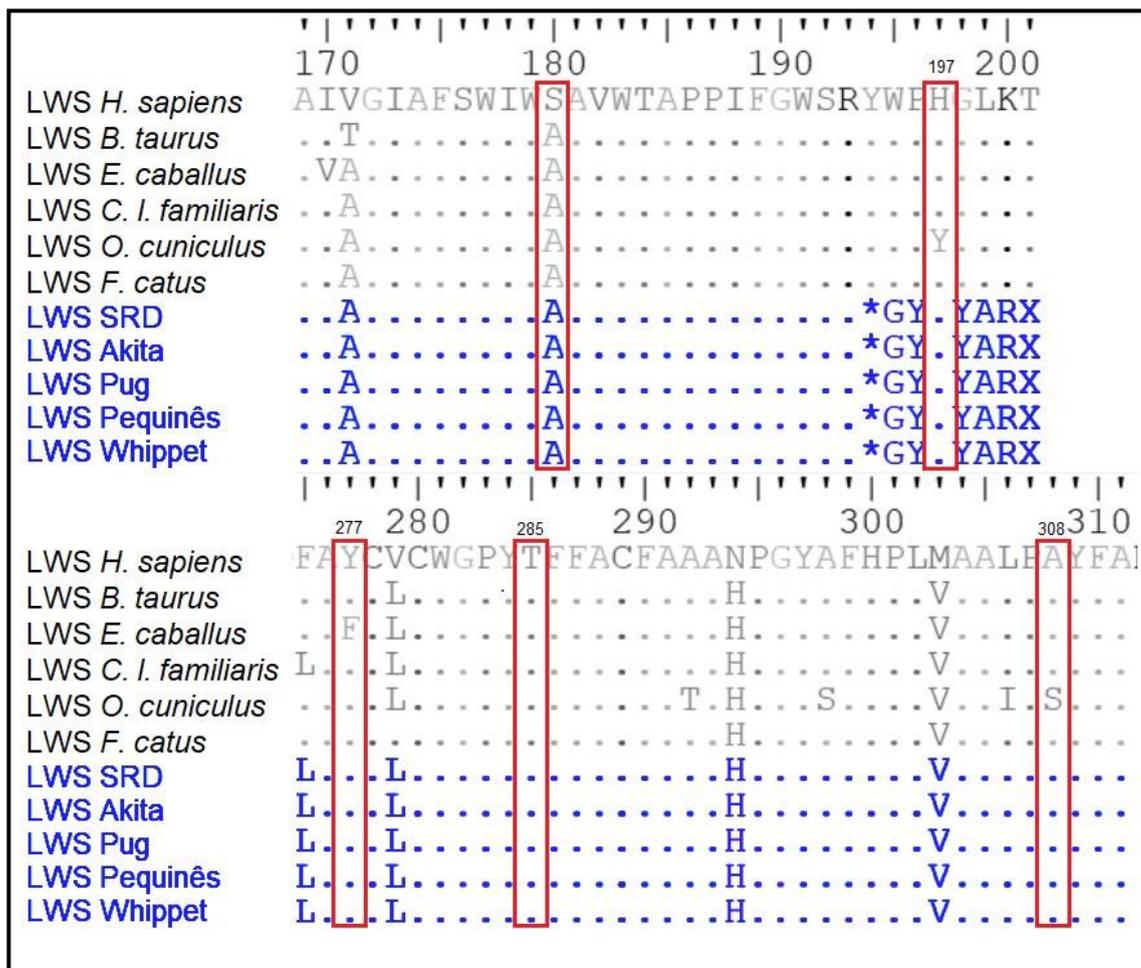


Figura 21: Alinhamentos das seqüências de aminoácidos do gene *lws* de Humano (*Homo sapiens*, GenBank:AH005298.2); Boi (*Bos taurus*, NM_174566.1); Cavallo (*Equus caballus*, NM_001081845.1); Cão doméstico (*Canis lupus familiaris*, NM_001197072.1); Coelho (*Oryctolagus cuniculus*, NM_001322264.1) e Gato (*Felis catus*, AF132040.1), além das amostras das raças: SRD (sem raça definida), Akita, Pug, Pequinês e Whippet. Os pontos na imagem indicam que os aminoácidos são idênticos aos da primeira seqüência (*H. sapiens*). Quando diferente, os aminoácidos aparecem em forma de letra. Em azul estão as seqüências de cães domésticos que foram sequenciadas neste projeto. Os destaques em vermelho correspondem aos sítios 180, 197, 277, 285 e 308, importante para inferir o pico de sensibilidade espectral do fotopigmento LWS.

As amostras que foram parcialmente sequenciadas, ou seja, que não foi possível analisar todas as regiões de interesse, também foram submetidas ao processo de análise por alinhamento de seqüências. Os resultados parciais dessas amostras indicam um resultado semelhante ao que foi observado nas demais raças, em que todos os éxons 3 apresentaram uma Alanina no sítio 180, e os éxons 4 apresentaram uma Histidina no sítio 197.

6.1.2 Canídeos silvestres

No caso dos canídeos silvestres, foi possível realizar a amplificação e o sequenciamento das cinco regiões importantes para a inferência do pico de sensibilidade espectral do LWS em duas espécies, sendo elas a *Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*.

Com o alinhamento (figura 22) é possível observar que essas espécies também apresentaram a conformação de aminoácidos AHYTA nos cinco sítios importantes para a inferência do pico de sensibilidade espectral do fotorpigmento LWS.

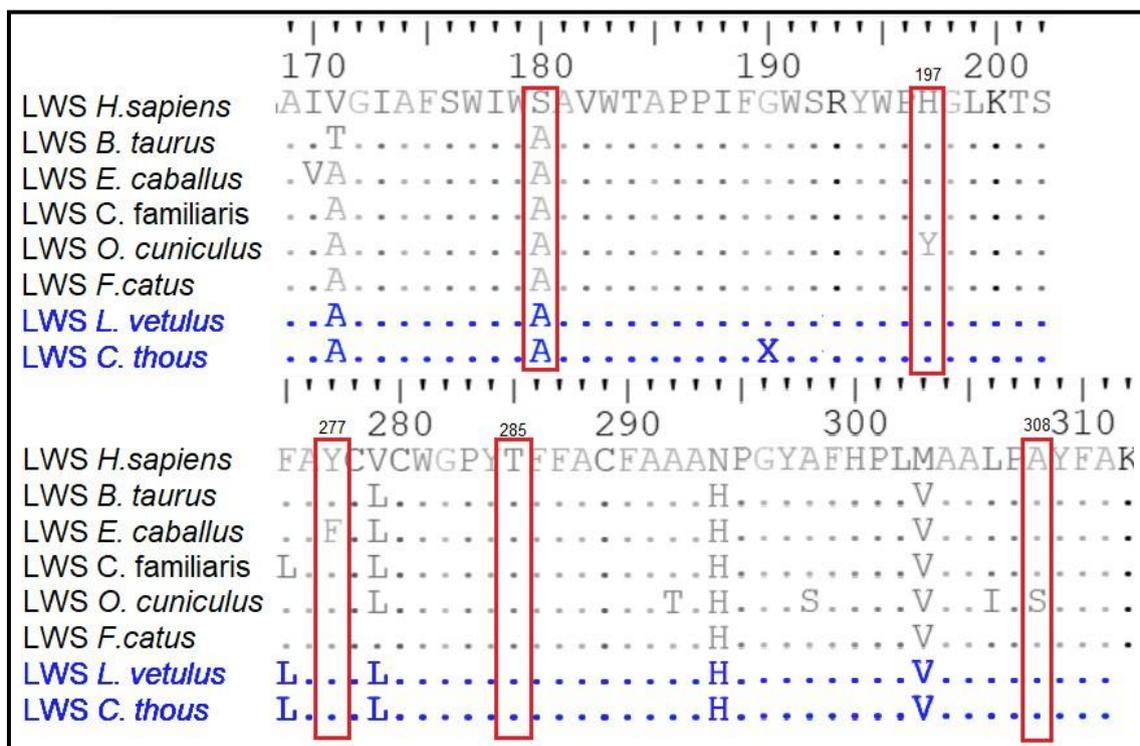


Figura 22: Alinhamentos das sequências de aminoácidos do gene *lws* de Humano (*Homo sapiens*, GenBank:AH005298.2); Boi (*Bos taurus*, NM_174566.1); Cavalo (*Equus caballus*, NM_001081845.1); Cão doméstico (*Canis lupus familiaris*, NM_001197072.1); Coelho (*Oryctolagus cuniculus*, NM_001322264.1) e Gato (*Felis catus*, AF132040.1), além das amostras das espécies *Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*. Os pontos na imagem indicam que os aminoácidos são idênticos aos da primeira sequência (*H. sapiens*). Quando diferente, os aminoácidos aparecem em forma de letra. Em azul estão as sequências dos canídeos que foram sequenciadas neste projeto. Os destaques em vermelho correspondem aos sítios 180, 197, 277, 285 e 308, importante para inferir o pico de sensibilidade espectral do fotorpigmento LWS.

No caso da espécie *Speothos venaticus* foi realizado o sequenciamento apenas dos éxons 4 e 5, e da *Chrysocyon brachyurus* foi realizado o sequenciamento para os éxons 3 e 4. Os aminoácidos presentes nos sítios analisados dessas regiões foram semelhantes aos observados no caso das espécies *L. vetulus* e *C. thous*.

Para a espécie *C. brachyurus*, não foi possível sequenciar o éxon 5 devido esgotamento das amostras presentes no laboratório. Entretanto, no caso da *S. venaticus* houve amplificação de sequência, porém a qualidade do sequenciamento ficou baixa, impossibilitando assim a realização de análise.

6.2 SWS1

6.2.1 Cães domésticos

Foram amplificadas as sequências de 27 cães domésticos, dentre eles um Akita, dois Golden retriever, um King Charles Spaniel, quatro Pequinês, quatro Pugs, um Shih-tzu, dois Splitz, sete SRD, um Teckel, três Whippets e dois Yorkshires.

Em todos os indivíduos observou-se a conformação de aminoácidos FFTYSTAS nos sítios selecionados para inferência do pico de sensibilidade espectral do ftopigmento SWS1 (figura 23). Além disso, quando essas amostras foram alinhadas com sequências de outros mamíferos, observou-se uma *gap* de aminoácidos no sítio 89 da opsina SWS1 nos cães domésticos e as demais espécies de canídeos.

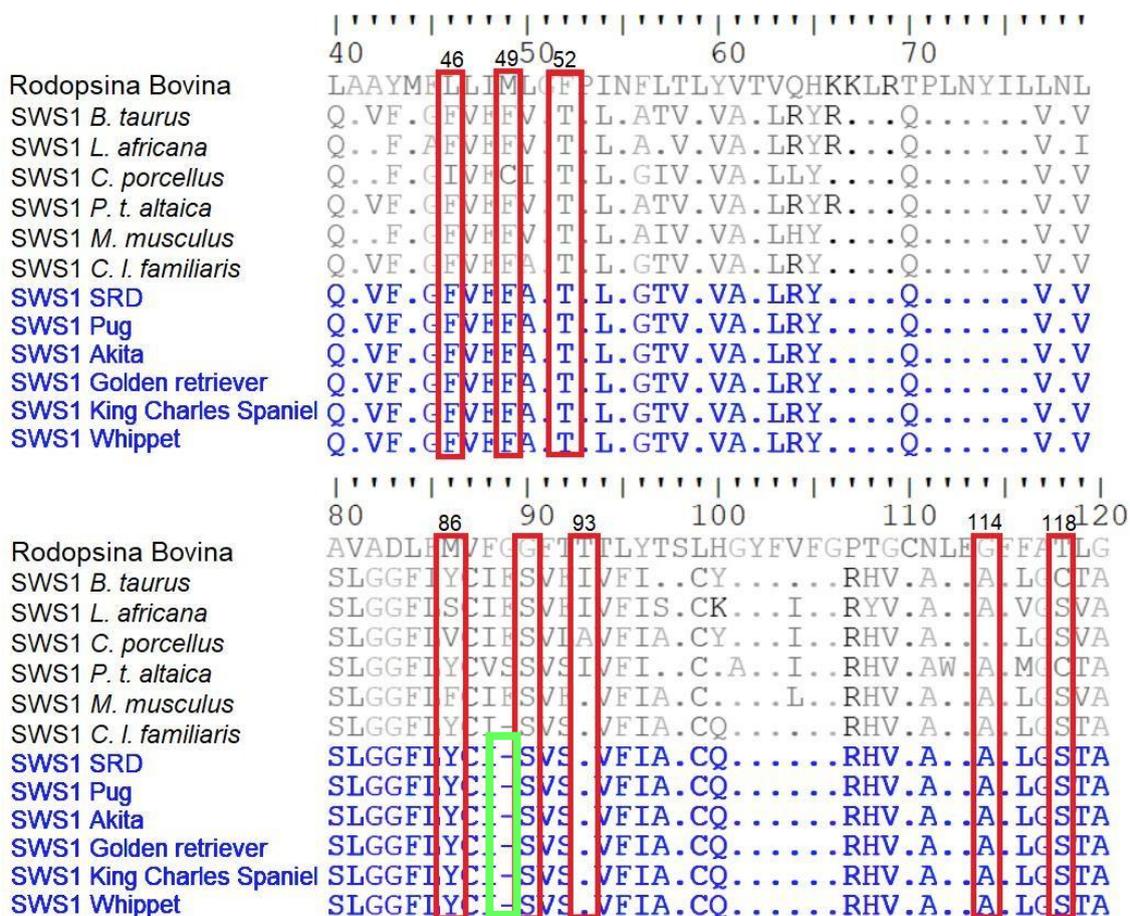


Figura 23: Alinhamento das seqüências de aminoácidos da rodopsina bovina (GenBank: NM_001014890.2), e o gene *sws1* de boi (*Bos taurus*, NM_174567.1); elefante (*Loxodonta africana*, NM_001280859.1); porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*, NM_001172758.1); tigre-siberiano (*Panthera tigris altaica*, XM_007078061.2); camundongo (*Mus musculus*, AF190671.2) e cão doméstico (*Canis lupus familiaris*, XM_539386.5), além das raças SRD, Pug, Akita, Golden retriever, King Charles Spaniel e Whippet. Em azul estão as seqüências de cães domésticos que foram sequenciadas neste projeto. Os pontos na imagem indicam que os aminoácidos são idênticos aos da primeira seqüência (Rodopsina Bovina). Quando diferente, os aminoácidos aparecem em forma de letra. Os destaques em vermelho correspondem aos sítios 46, 49, 52, 86, 90, 93, 114, e 118, importantes para inferir o pico de sensibilidade espectral do SWS1. O destaque em verde corresponde a um *gap* de aminoácidos.

Verificando o alinhamento das seqüências de DNA também foi possível observar o *gap* de nucleotídeos nos canídeos (figura 24). Ao analisar o cromatograma dos cães domésticos (figura 25), não há indícios de que esse *gap* seja decorrente de problemas no sequenciamento. Além disso, devido ao fato dele estar presente em diferentes seqüências de diferentes raças e espécies de canídeos, a chances de ter ocorrido erro no sequenciamento são inviáveis.

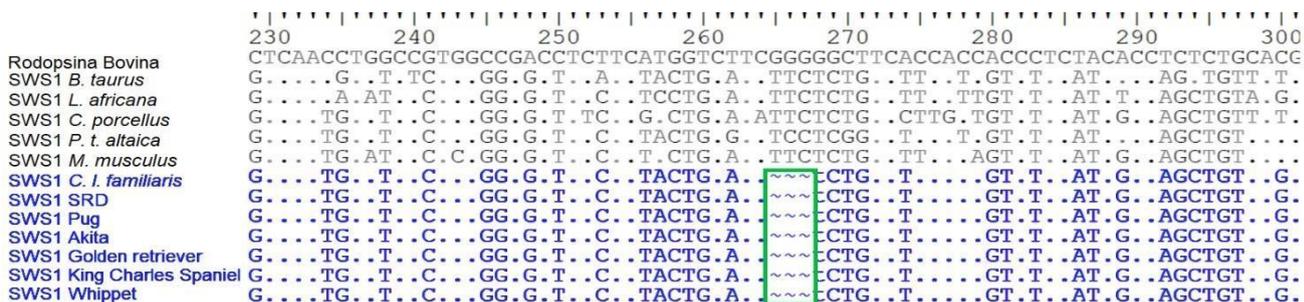


Figura 24: Alinhamentos das seqüências de nucleotídeos correspondente ao éxon 1 do gene *sws1* de Boi (*Bos taurus*, NM_174567.1); Elefante (*Loxodonta africana*, NM_001280859.1); Porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*, NM_001172758.1); Camundongo (*Mus musculus*, AF190671.2); Tigre-siberiano (*Panthera tigris altaica*, XM_007078061.2); Cão doméstico (*Canis lupus familiaris*, XM_539386.5), além das raças SRD, Pug, Akita, Golden retriever, King Charles Spaniel e Whippet. Em azul estão as seqüências de cães domésticos que foram sequenciadas neste projeto. Os pontos na imagem indicam que os nucleotídeos são idênticos aos da primeira seqüência (Rodopsina bovina). Quando diferente, os nucleotídeos aparecem em forma de letra. O destaque em verde corresponde a um *gap* de três nucleotídeos, referentes ao *gap* de aminoácidos encontrado no sítio 89.

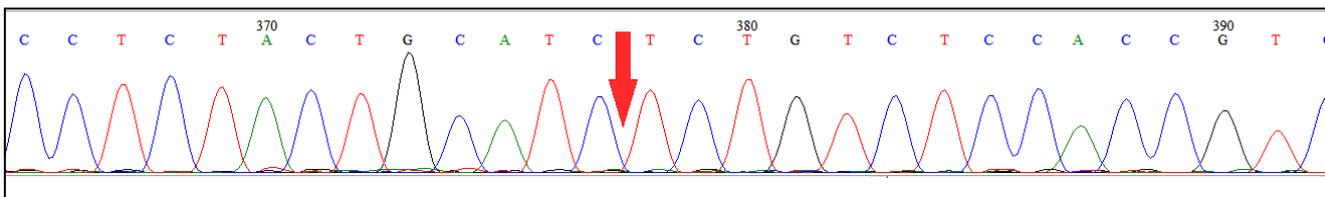


Figura 25: Eletroferograma de uma seqüência parcial de nucleotídeos do gene *sws1* de cão doméstico. As curvas indicam a presença de determinado nucleotídeo, identificado durante o sequenciamento. Curvas azuis indicam citosinas, pretas indicam guaninas, vermelhas indicam timinas e verdes adeninas. A seta em vermelho indica a posição na qual estão faltando os três nucleotídeos que codificam o aminoácido da posição 89.

6.2.2 Canídeos silvestres

Em relação a espécie *L. vetulus*, fora realizada a amplificação e sequenciamento da região de interesse. Parte do eletroferograma obtido no sequenciamento pode ser observado na figura 26.

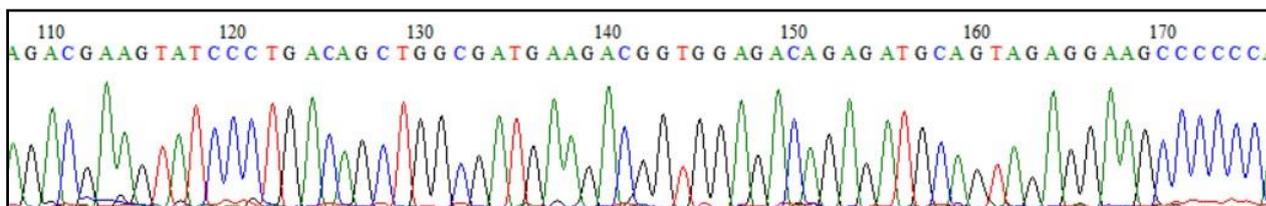


Figura 26: Eletroferograma obtido a partir do sequenciamento realizado no éxon 1 do gene *sws1* da espécie *L. vetulus*. As curvas indicam a presença de determinado nucleotídeo, identificado durante o sequenciamento. Curvas azuis indicam citosinas, pretas indicam guaninas, vermelhas

indicam timinas e verdes adeninas. Na parte superior está a sequência de DNA e os números correspondem a posição dos nucleotídeos na sequência.

Quando submetida ao processo de análise por alinhamento de sequências, a sequência do éxon 1 do gene *sws1* da espécie *L. vetulus* não teve resultado satisfatório, uma vez que não houve pareamento com as demais amostras e também apresentou um padrão de nucleotídeos diferente das espécies de canídeos e outros mamíferos utilizados no alinhamento.

Utilizando a plataforma BLAST, fora identificada similaridade com a sequência do gene *sws1* de espécies de raposas como *Vulpes vulpes*, *Vulpes lagopus* e *Vulpes zerda* (figura 27). Porém, ao realizar o alinhamento das sequências do gene *sws1* dessas espécies, também não fora encontrada similaridade (figura 28).

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Vulpes vulpes opsin 1, short wave sensitive (OPN1SW), mRNA	Vulpes vulpes	340	340	100%	2e-89	99.47%	1047	XM_026010889.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Vulpes zerda short wavelength-sensitive opsin 1 (SWS1) gene, partial cds	Vulpes zerda	340	340	100%	2e-89	99.47%	352	KT221601.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Vulpes lagopus short wavelength-sensitive opsin 1 (SWS1) gene, partial cds	Vulpes lagopus	340	340	100%	2e-89	99.47%	352	KT221600.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Vulpes lagopus opsin 1, short wave sensitive (OPN1SW), mRNA	Vulpes lagopus	340	340	100%	2e-89	99.47%	1071	XM_041727980.1

Figura 27: Resultado da busca por sequências similares realizada na plataforma BLAST a partir dos dados obtidos através do sequenciamento do éxon 1 da espécie *L. vetulus*. Do lado esquerdo para o direito pode-se observar as sequências que apresentaram similaridade, o nome científico das espécies, os dados que informam o grau de similaridade dessas sequências com os dados obtidos no sequenciamento da *L. vetulus* e por fim o código de acesso para essas sequências no banco de dados do NCBI. XM_041727980.1. As informações contidas na imagem são: Description – O nome de identificação das sequências encontradas, Scientific Name – Indica o nome científico das espécies referentes as sequências encontradas, Max e Total Scores – Indicam o grau de similaridade entre a sequência procurada e as sequências encontradas, Query Cover – Indica em porcentagem o quanto da sequência procurada é coberta pelas sequências encontradas, E Value – É um parâmetro de confiança utilizado pela plataforma, Per. Identity – Indica em porcentagem o quanto a sequência procurada é idêntica as sequências encontradas, Acc. Len – Indica a quantidade de nucleotídeo ou aminoácidos presentes nas sequências,

Accession – O código de identificação das sequências encontradas.

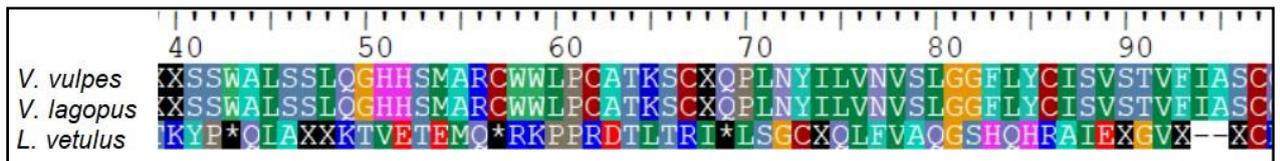


Figura 28: Alinhamento de aminoácidos realizado no BioEdit a partir de seqüências de nucleotídeos do éxon 1 do gene *sws1* das espécies *V. vulpes*, *V. lagopus* e *L. vetulus*. As seqüências das duas primeiras espécies foram retiradas do banco de dados do NCBI (XM_026010889_1 e XM_041727980.1, respectivamente), enquanto a seqüência da espécie *L. vetulus* fora obtida por meio de sequenciamento Sanger, realizado para este trabalho. Cada letra que representa um aminoácido diferente, está destacada por uma cor diferente.

No caso da espécie *C. thous*, foi possível amplificar e sequenciar o éxon 1 do gene *sws1*.

Em relação a análise por alinhamento, também foram utilizadas seqüências do gene *sws1* de outras espécies de canídeos (figura 29) obtidas vida banco de dados do NCBI, sendo elas: Dingo (*C. lupus dingo*), Lobo-guará (*C. brachyurus*), Cachorro-vinagre (*S. venaticus*), Raposa-do-ártico (*V. lagopus*) e Raposa-vermelha (*V. vulpes*) e Feneco (*V. zerda*).

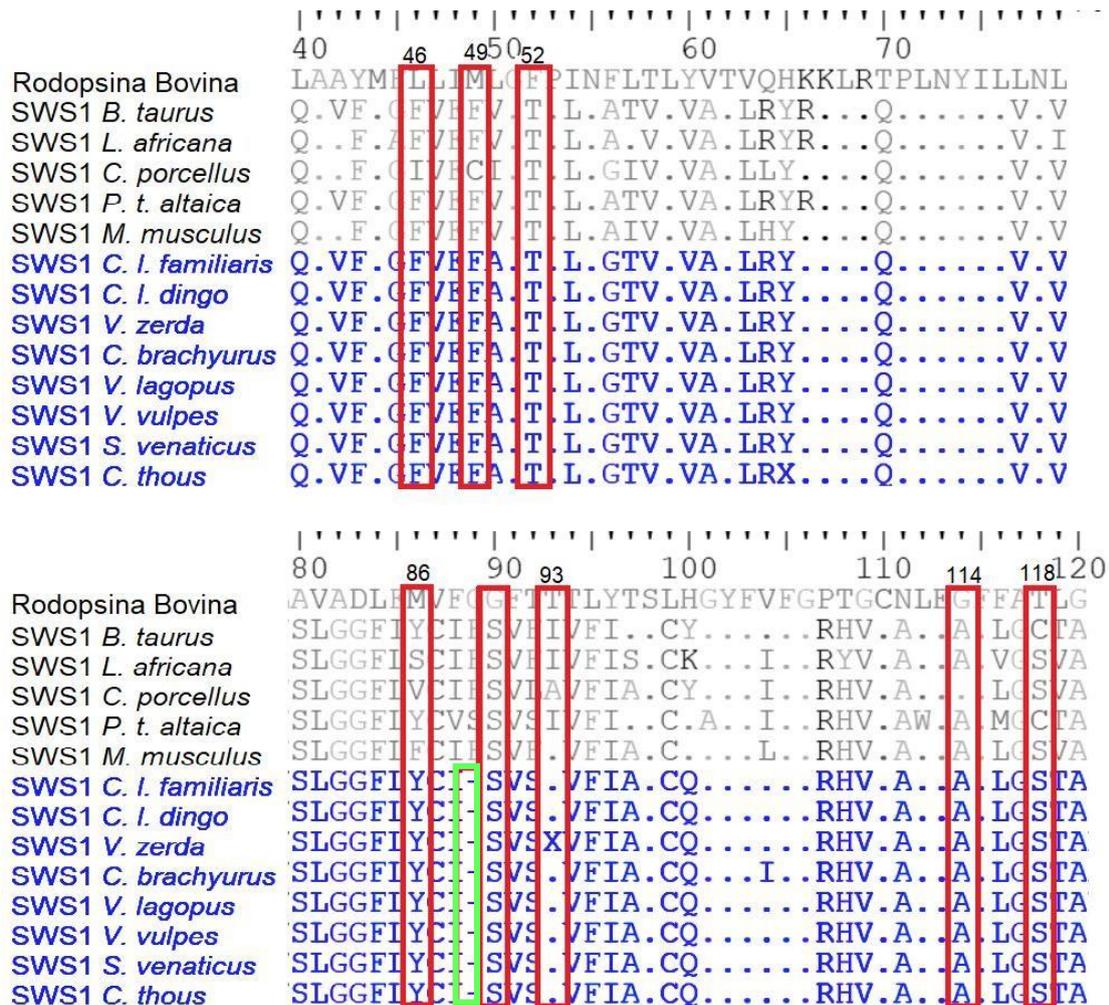


Figura 29: Alinhamentos das sequências de aminoácidos da rodopsina bovina (GenBank: NM_001014890.2), e o gene *sws1* de Boi (*Bos taurus*, NM_174567.1); Elefante (*Loxodonta africana*, NM_001280859.1); Porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*, NM_001172758.1); Tigre-siberiano (*Panthera tigris altaica*, XM_007078061.2); Camundongo (*Mus musculus*, AF190671.2); Cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*, KT221593.1); Raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*, XM_026010889.1); Raposa-do-ártico (*Vulpes lagopus*, KT221600.1); Lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*, KT221562.1); Feneco (*Vulpes zerda*, KT221601.1); Dingo (*Canis lupus dingo*, XM_025471586.1) e Cão doméstico (*Canis lupus familiaris*, XM_539386.5). Os pontos na imagem indicam que os aminoácidos são idênticos aos da primeira sequência (Rodopsina Bovina). Quando diferente, os aminoácidos aparecem em forma de letra. Em azul estão as sequências de espécies de canídeos obtidos através do banco de dados do NCBI. Os destaques em vermelho correspondem aos sítios 46, 49, 52, 86, 90, 93, 114 e 118, importantes para inferir o pico de sensibilidade espectral do SWS1. O destaque em verde corresponde a um *gap* de aminoácidos. Em cima se encontra o alinhamento com os sítios 46, 49 e 52, embaixo se estão os demais sítios.

Assim como os cães domésticos, os canídeos silvestres também apresentaram a conformação de aminoácidos FFTYSTAS nos sítios selecionados para a inferência do pico de sensibilidade espectral do fotopigmento SWS1. A única exceção é observada na sequência da espécie *V.*

zerda, uma vez que não foi possível observar o aminoácido presente no sítio 93 devido a qualidade da sequência obtida.

6.2.3 Modelagem SWS1

Com a utilização da plataforma *Swissplot*, utilizando a estrutura cristalográfica da rodopsina bovina como molde e a sequência de SWS1 de *C. l. familiaris* (XM_539386.6) presentes no banco de dados do NCBI, foi possível modelar a estrutura representativa do ftopigmento em questão (figura 30).

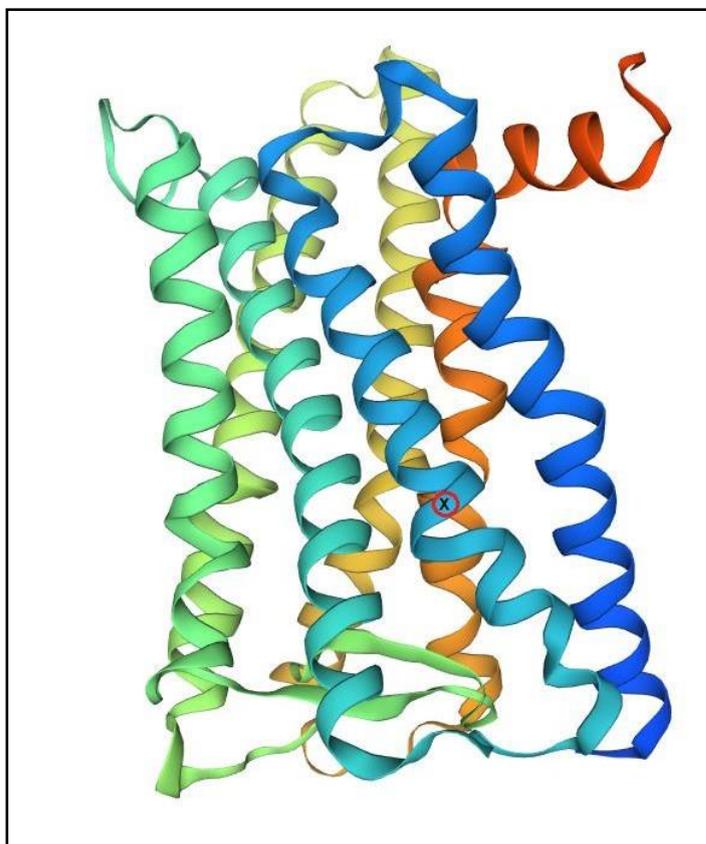


Figura 30: Modelo representativo do ftopigmento SWS1 da espécie *C. l. familiaris* obtido através do método de modelagem de proteínas por comparação de sequências utilizando a plataforma *Swissplot*. Modelagem realizada utilizando a sequência de aminoácidos da proteína presente no banco de dados do NCBI (XM_539386.6). Cada um dos sete domínios transmembrânicos da proteína estão destacados de cores diferentes. Destacado com um círculo em vermelho e dentro um "X", está o local do *gap* no sítio 89.

7 DISCUSSÃO

7.1 LWS

Os resultados obtidos corroboram com as informações já descritas a respeito do gene *lws* e sua opsina em cães domésticos (*C. l. familiaris*).

Todas as amostras sequenciadas são idênticas ao gene depositado no GenBank: NM_001197072.1. Quando as sequências desses animais são alinhadas, é observada a conformação AHYTA, assim como descrito por Yokoyama e Radlwimmer (2001) em cão doméstico. Sendo assim, pode-se deduzir que todos os animais que tiveram todos os cinco sítios analisados neste trabalho, apresentam a opsina expressa a partir do gene *lws* com o pico de sensibilidade espectral em ~555nm (figura 31).

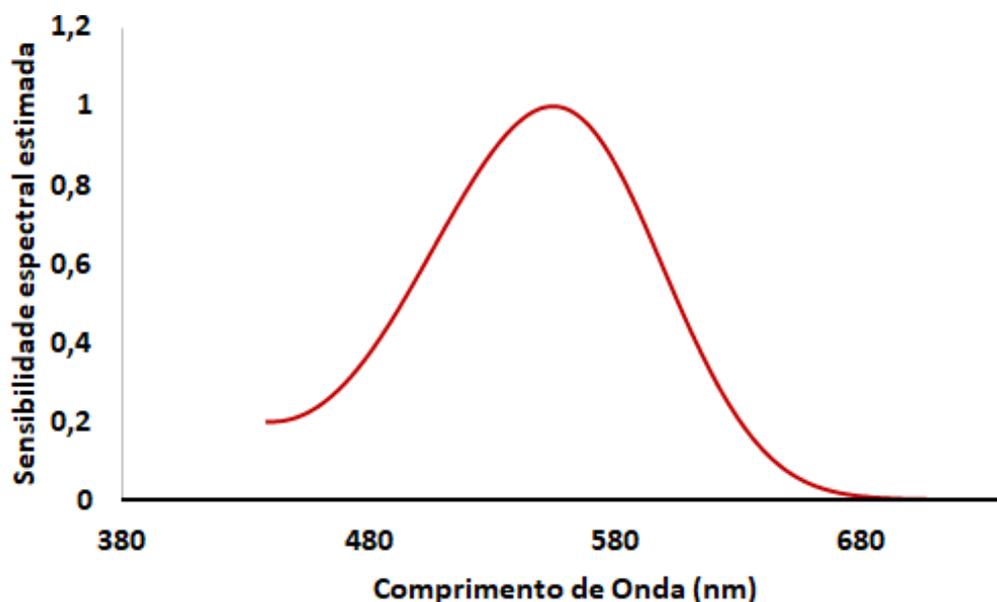


Figura 31: Gráfico indicando a curva de sensibilidade espectral do fotopigmento LWS de todas as amostras de canídeos analisadas neste trabalho. O pico de sensibilidade espectral se encontra em aproximadamente 555nm.

Dentre as amostras de cães domésticos analisadas no presente trabalho, há raças de diferentes origens, anatomias e funções, porém os resultados em relação aos aminoácidos presentes nos cinco sítios importantes foram similares,

apresentando o perfil AHYTA. Yokoyama e Radwimmer (2001) descreveram essa conformação de aminoácidos na espécie *C. l. familiaris*, porém os autores não indicaram a raça de cão utilizada no estudo. Por outro lado, o resultado concluído pelos autores corresponde aos dados descritos no trabalho de comportamento realizado por Neitz et al. (1989), em que foram utilizados dois cães de diferentes raças, Galgo italiano e Poodle toy. Essa conservação pode ser explicada pela possível origem recente dessa subespécie de canídeo, entre 14.000 e 6.400 anos atrás (FRANTZ et al., 2016).

O trabalho eletrorretinograma de Jacobs et al. (1992) também apontou que o cone L do cão doméstico e diferentes espécies de raposas apresentaram um pico de sensibilidade espectral em ~555nm. Para as diferentes raças de cães domésticos e espécies de canídeos analisados no presente trabalho foi inferido um pico de sensibilidade espectral semelhante, devido a conformação AHYTA em seus sítios importantes para inferir o pico de sensibilidade espectral do ftopigmento LWS. Com as informações obtidas até o presente momento, pode-se deduzir que a conformação AHYTA nos cinco sítios importantes para inferir o pico de sensibilidade espectral nas opsinas expressas a partir do gene *lws* se mantem conservada entre as diferentes espécies de canídeos.

7.2 SWS1

Até o momento, não há trabalhos que informem sobre a inferência do pico de sensibilidade espectral do ftopigmento SWS1 a partir da conformação de aminoácidos em espécies de canídeos.

Levando em consideração os resultados obtidos neste trabalho, os cães domésticos e silvestres apresentam a conformação FFTYSTAS em seus sítios importantes (46, 49, 52, 86, 90, 93, 114 e 118 respectivamente) para inferir o pico de sensibilidade espectral da opsina expressa a partir do gene *sws1*.

Dentre todas as sequências utilizadas na análise por alinhamento, o camundongo (*M. musculus*) é a única espécie que compartilha com os canídeos os mesmos aminoácidos em sete dos oito sítios importantes. As espécies divergem unicamente em relação ao sítio 86, em que o camundongo apresenta uma Fenilalanina (F86) e o canídeos apresentam uma Tirosina (Y86).

Fasick et al. (2002) realizaram uma substituição de aminoácidos no sítio 86 da opsina produzida a partir do gene *sws1* de camundongo. Os autores substituíram a Fenilalanina encontrada nessa posição por uma Tirosina (F>Y86). Com essa alteração, a proteína apresentou um pico de sensibilidade espectral de ~424nm. Com essa alteração, os oito sítios importantes para inferir o pico de sensibilidade espectral do fotopigmento SWS1 ficaram semelhantes entre as sequências de aminoácidos dos canídeos e do camundongo mutado. Dessa maneira, pode-se inferir que os canídeos também apresentam essa opsina com o pico de ~424nm.

Entretanto, esse resultado diverge em relação ao que já foi descrito na literatura. Os testes comportamentais realizados em cães domésticos por Neitz et al. (1989) indicam que esse fotopigmento apresenta pico de sensibilidade em ~429nm, juntamente, o trabalho de eletrorretinograma realizado em cães domésticos e diferentes espécies de raposa por Jacobs et al. (1993) informa que o pico desse fotopigmento é de ~431,5nm (figura 32). Portanto, os dados obtidos a partir dos sítios selecionados neste trabalho para inferir o pico de sensibilidade espectral do SWS1 teve resultado discrepante em relação aos dados obtidos com testes de comportamento e eletrorretinograma.

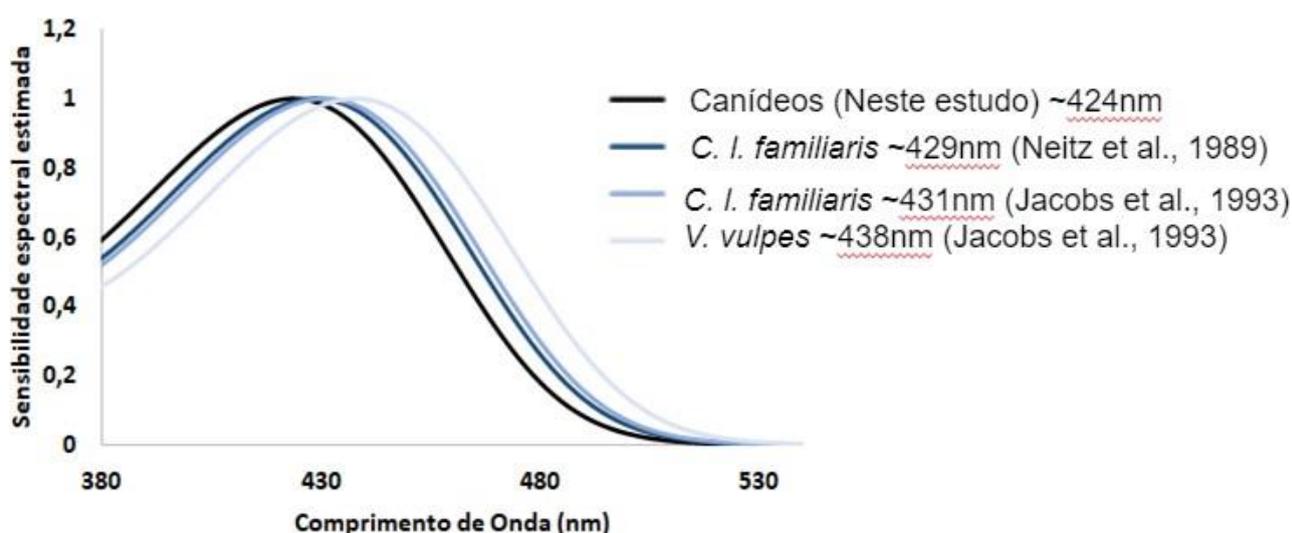


Figura 32: Gráfico indicando a curva de sensibilidade espectral do fotopigmento SWS1 das amostras de canídeos analisadas neste trabalho, além dos picos descritos na literatura, por testes de comportamento em cães domésticos (Neitz et al., 1989) e de eletrorretinograma em cães domésticos e raposas (Jacobs et al., 1993). O pico de sensibilidade espectral inferida no

presente trabalho é de aproximadamente 424nm, diferente dos demais trabalhos que indicaram um pico de aproximadamente 429nm, 431nm e 438nm.

Essa situação pode ter acontecido pois, o método de inferência do pico de sensibilidade espectral por alinhamento de sequências de DNA se baseia em observar os aminoácidos presentes em determinadas regiões da proteína. O processamento das informações que ocorre além do DNA, como a expressão do gene e processamento da informação pelo sistema nervoso dos animais, não pode ser observado. Diferente do ERG, por exemplo, que avalia os sinais apresentados pela retina a diferentes estímulos luminosos, e assim é possível inferir o pico de sensibilidade espectral dos fotorreceptores já expressos. E com isso, faz-se importante a necessidade de utilizar diferentes métodos nos estudos das espécies, para que assim, seja possível obter um resultado mais acurado.

Além disso, os oito sítios selecionados aqui para inferir o pico de sensibilidade do SWS1 podem não ter sido o suficiente para as diferentes espécies de canídeos. Hauser et al. (2014) informam que em mamíferos prever os picos de sensibilidade espectral do fotorreceptor SWS1 a partir dos aminoácidos pode ser uma tarefa difícil, pois há uma variação nos sítios importantes para o ajuste espectral, e a importância de determinados sítios pode variar até mesmo em linhagens estreitamente relacionadas.

Para solucionar essa questão, é necessário identificar as diferenças entre os sítios de aminoácidos presentes na estrutura do opsina das espécies de canídeos, e juntamente com outros métodos, como por exemplo, edição genômica, ERG, comportamento e morfologia, inferir de forma mais precisa o pico de sensibilidade espectral do fotorreceptor SWS1 nas diferentes espécies presentes na família Canidae.

Apesar disso, o sítio 86 pode apresentar papel importante para inferir o pico de sensibilidade espectral do SWS1 em mamíferos (HAUSER et al., 2014; HUNT et al., 2009). Todos os canídeos alinhados apresentaram uma Tirosina nesse sítio (Y86). De acordo com Cowing et al. (2002) e Fasick et al. (2002), a presença de uma Tirosina nesse sítio confere à opsina uma sensibilidade para o espectro violeta, o que indica que esses animais não apresentam uma visão

ultravioleta. Esse resultado corrobora com o que é descrito por de Emerling et al. (2015), uma vez que é descrito que as espécies *C. brachyurus* e *S. venaticus* apresentam fotopigmento SWS1 sensíveis à estímulos de comprimentos de onda do espectro violeta.

Em relação ao *gap* identificado na posição 89 da opsina, apesar da sua proximidade com regiões importantes para inferir o pico de sensibilidade espectral do fotopigmento SWS1, podemos deduzir que esse *gap* não interfere na habilidade de visão de cores dos animais, visto que, já é descrito na literatura que diferentes espécies de canídeos, inclusive dentre as espécies utilizadas aqui para o método de alinhamento de sequências, apresentam a habilidade de perceber cores de comprimentos de onda curtos (NETITZ et al., 1989; JACOBS et al., 1993). Uma vez que esse *gap* se manteve nas sequências dos demais canídeos, pode-se inferir que essa é uma característica conservada da família Canidae. Provavelmente houve uma deleção em um ancestral em comum dentre os canídeos, levando em consideração que os demais mamíferos alinhados neste trabalho não apresentam esse *gap* na mesma região.

Com o método de modelagem de proteína foi possível criar um modelo em 3D de nossa proteína de interesse por técnicas de bioinformática. Nesse caso, utilizamos esse método para observar se *gap* presente na posição 89 do fotopigmento SWS1 poderia interferir na morfologia da proteína. Contudo, essa técnica de modelagem não nos permite analisar essa informação, uma vez que o modelo elaborado pela plataforma nos informa o formato da proteína a partir das informações de aminoácidos que o usuário submete. Como nossas informações de aminoácidos desse fotopigmento dos canídeos já possui esse *gap*, não é possível comparar com uma amostra de canídeos sem essa característica, e assim não é possível analisar se essa característica altera ou não o formato da proteína devido sua presença.

A respeito da sequência obtida da espécie *L. vetulus*, observou-se via eletroforese a amplificação de uma banda de tamanho que corresponde ao que se esperaria do éxon 1 do gene *sws1*, além disso, o eletroferograma obtido através do sequenciamento apresentou boa qualidade, uma vez que não apresentou quantidade expressiva de ruídos, e por fim, a sequência apresentou

similaridade com outras sequências do gene *sws1* de outras espécies de raposas via plataforma BLAST. Por esses motivos, pode-se aqui deduzir que a disparidade encontrada no momento de análise por alinhamento de sequências é explicada pela baixa especificidade do par de *primers* utilizados para amplificação da região de interesse dessa espécie. Por esse motivo faz-se necessário o desenho de novos *primers* para identificar a sequência do éxon 1 do gene *sws1* para a espécie *L. vetulus*.

8 CONCLUSÃO

Com os dados levantados no presente trabalho, é possível observar que os genes *lws* e *sws1* estão presentes no genoma de todas as espécies analisadas.

Com as informações obtidas, pode-se inferir que independente da origem, anatomia, e função das raças, todos indivíduos da espécie *Canis lupus familiaris* apresentam os cones L com uma opsina com o pico de sensibilidade espectral em aproximadamente 555nm.

Além dos cães domésticos, os canídeos silvestres estudados aqui também apresentaram resultado semelhante em todos os cinco sítios importantes para a inferência do pico de sensibilidade espectral do fotopigmento LWS, e assim podemos deduzir que seus cones L também apresentam um pico em aproximadamente 555nm.

Com os resultados semelhantes entre espécies diferentes, podemos observar um indício de que esse pico de sensibilidade espectral é uma característica conservada entre diferentes espécies presentes na família dos canídeos.

Em relação ao fotopigmento SWS1, o pico de sensibilidade espectral estimado (~424nm) não se aproximou dos picos obtidos a partir de outros experimentos com canídeos, como por exemplo, experimentos de comportamento e eletrorretinograma. A diferença observada pode indicar a existência de outros sítios, além dos selecionados aqui, que possam influenciar no pico de sensibilidade espectral desse fotopigmento.

Apesar de não ter sido possível inferir o pico de sensibilidade espectral do SWS1 nas diferentes espécies estudadas aqui, pode-se deduzir que essas apresentam esse fotopigmento com o pico de sensibilidade voltado para o espectro do violeta, devido a presença do aminoácido Tirosina no sítio 86.

Uma vez que todas as espécies de canídeos analisadas nesse trabalho apresentaram as mesmas conformações de aminoácidos para inferência do pico de sensibilidade espectral dos fotopigmentos, não foi possível relacionar o papel e importância da habilidade de visão de cores para a sobrevivência desses animais que ocupam nichos ecológicos diferentes.

Ressalva-se aqui uma carência de informações sobre a habilidade de visão de cores dentre as diferentes espécies de canídeos. Uma vez que os canídeos domésticos e silvestres apresentam diversos papéis sociais e ecológicos, entender como esses animais interpretam o mundo através da visão pode nos auxiliar além do âmbito de curiosidade. Com essas informações podemos entender a história evolutiva das espécies, além de propiciar o desenvolvimento de métodos de adestramento, manejo e estratégias de conservação e preservação de espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADW. Animal Diversity Web. ***Canis lupus familiaris***, 2019. Disponível em: <https://animaldiversity.org/accounts/Canis_lupus_familiaris/>. Acesso: em 14 de Maio de 2019.
- AKC. American Kennel Club. **Dog breeds**, 2020. Disponível em: <<https://www.akc.org/dog-breeds/>>. Acesso em: 28 de Julho de 2020.
- AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. **Fundamentos da Biologia Moderna**: Volume único. 4ª Edição. São Paulo: Moderna, 2006.
- AMANN, B.; HIRMER, S.; HAUCK, S. M.; KREMMER, E.; UEFFING, M.; DEEG, C. A. True blue: S-opsin is widely expressed in different animal species. **J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)**, v. 98, n. 1, p. 32–42, 2014.
- ARAÚJO, I. C.S.; FURTADO, A. P.; ARAÚJO, G. C. P.; ROCHA, C. G. Efeito do tipo de alimentação de cães saudáveis sobre análises clínicas e aspectos comportamentais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.70, n.3, p.689-698, 2018. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v70n3/0102-0935-abmvz-70-03-00689.pdf>> Acesso em: 14 de Maio de 2019.
- BAILES, H. J.; DAVIES, W. L.; TREZISE, A. E. O.; COLIN, S.P. Visual pigments in a living fóssil, the Australian lungfish *Neoceratodus forsteri*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 200, 2007.
- BEISIEGEL, B. M.; ADES, C. Behavior of the bush dog in the field The Behavior of the Bush Dog (*Speothos venaticus* Lund, 1842) in the Field: a Review. **Revista de Etologia**, v. 4, n. 1,p. 17- 23, 2002. Disponível em:<http://www.etologiabrasil.org.br/media/upload/publicacoes_revista/vol4_1_3_cesar.pdf> Acesso: em 14 de Maio de 2019.
- BEISIEGEL, B. M.; LEMOS, F. G.; AZEVEDO, F. C.; QUEIROLO, D.; JORGE, R. S. P. Avaliação do risco de extinção do Cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v.3, p. 138– 145, 2013.
- BEISIEGEL, B. M.; ZUERCHER, G.L. *Speothos venaticus*. **MAMMALIAN SPECIES**, v. 783, p. 1–6, 2005.
- BERTA, A. *Cerdocyon thous*. **Mammalian Species**, n. 186, p. 1-4, 1982.
- BERTONI, M., KIEFER, F., BIASINI, M., BORDOLI, L., SCHWEDE, T. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.
- BIENERT, S., WATERHOUSE, A., DE BEER, T.A.P., TAURIELLO, G., STUDER, G., BORDOLI, L., SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Repository - new features and functionality. **Nucleic Acids Res.** v. 45, p. 313-319, 2017.
- BOWMAKER, J. K. Evolution of vertebrate visual pigments. **Vision research**, v. 48, n. 20, p. 2022-2041, 2008.

- BOWMAKER, J. K. The evolution of vertebrate visual pigments and photoreceptors. In: R; Croly-Dillon, J& Gregory(Ed.) Vision and visual dysfunction. **Macmillan Press**, 1991.
- BYOSIERE, S.; CHOUINARD, P.A.; HOWELL, T.J.; BENNETT, P. C. What do dogs (*Canis familiaris*) see? A review of vision in dogs and implications for cognition research. **Psychon Bull Rev.**, v. 25, p.1798–1813, 2018.
- CAINE, N. G., MUNDY, N. I. Demonstration of a foraging advantage for trichromatic marmosets (*Callithrix geoffroyi*) dependent on food colour. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1442, p. 439–444, 2000.
- CBKC. Confederação Brasileira de Cinofilia. **Raças**, 2020. Disponível em:<<https://cbkc.org/raças/page>>. Acesso em: 28 de Julho de 2020.
- COPPINGER, L.; COPPINGER, R. Dogs: A New Understanding of Canine Origin, Behavior and Evolution. **University of Chicago Press**. 1ª Edição, 2002.
- COWING, J. A.; POOPALASUNDARAM, S.; WILKIE, S. E.; ROBINSON, P. R.; BOWMAKER, J. K.; HUNT, D. M. The molecular mechanism for the spectral shifts between vertebrate ultraviolet- and violet-sensitive cone visual pigments. **The Biochemical journal**, v. 367, p. 129–135, 2002.
- DALPONTE, J.C. *Lycalopex vetulus* (Carnivora: Canidae). **Mammalian Species**, v. 847, p.1-7, 2009. Disponível em:<<https://pdfs.semanticscholar.org/024d/1bb79a1f90be73122394bf89250765d3c556.pdf>>. Acesso em: 05 de Julho de 2019.
- DAVIES, W. I. L., COLLIN, S. P. & HUNT, D. M. Molecular ecology and adaptation of visual photopigments in craniates. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 3121–3158, 2012.
- DEEB, S. S. The molecular basis of variation in human color vision. **Clinical Genetics**, v. 67, n.5, p. 369-377, 2005.
- DIETZ, J. M. Ecology and Social Organization of the Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **SMITHSONIAN CONTRIBUTIONS TO ZOOLOGY**, n. 392, 1984.
- EMERLING, C. A.; HUYNH, H. T.; NGUYEN, M. A.; MEREDITH, R. W.; SPRINGER, M. S. Spectral shifts of mammalian ultraviolet-sensitive pigments (short wavelength-sensitive opsin 1) are associated with eye length and photic niche Evolution. **Proc. R. Soc.**, 2015. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/957800837>>. Acesso em 14 de Maio de 2019.
- ENSEMBL. Ensembl genome browser, 2020. Disponível em:<<https://www.ensembl.org/index.html>>. Acesso em 08 de Abril de 2020.
- EVERGREEN. **DOGS**, 2011. Disponível em: <http://archives.evergreen.edu/webpages/curricular/20112012/m2o1112/web/dogs.html#cite_ref-Zigler_1-0>. Acesso em: 03 de Abril de 2020.

- FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O.. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.19, n. 1, p. 59-65, 2004.
- FASICK, J. L.; APPLEBURY, M. L.; OPRIAN, D. D. Spectral tuning in the mammalian short-wavelength sensitive cone pigments. **Biochemistry**, v. 41, n. 21, 2002.
- FRANTZ, L. A. F.; MULLIN, V. E.; CAPITAN, M. P.; LEBRASSEUR, O.; OLLIVIER, M.; PERRI, A.; LINDERHOLM, A.; MATTIANGELI, V.; TEASDALE, M. D.; DOMIPOULOS, E. A.; TRESSET, A.; DUFFRAISSE, A.; MCCORMICK, F.; BARTOSIEWICZ, L.; GÁL, E.; NYERGES, E. A.; SABLIN, M. V.; NRÉHARD, S.; MASHKOUR, M.; BALASESCU, A.; GILLET, B.; HUGHES, S.; CHASSAING, O.; HITTE, C.; VIGNE, J. D.; DOBNEY, K.; HANNI, C.; BARDLEY, D. G.; LARSON, G. Genomic and archaeological evidence suggests a dual origin of domestic dogs. **Science Mag**, v. 352, n. 6290, 2016.
- FREEDMAN, A. H.; GRONAU, I.; SCHWEIZER, R. M.; VECCHYO, D. O. D.; HAN, E.; SILVA, P. M.; GALAVERNI, M.; FAN, Z.; MARX, P.; GALDOS, B; L; BAELE, H.; RAMIREZ, O.; HORMOZDIARI, F.; ALKAN, C.; VILÁ, C.; SQUIRE, K.; GEFFEM, E.; KUSAK, J.; BOYKO, A. R.; PARKER, H. G.; LEE, C.; TADIGOTLA, V.; SIEPEL, A.; BUSTAMANTE, C. D.; HARKINS, T. T.; NELSON, S. F.; OSTRANDER, E. A.; BONET, T. M.; WAYNER, R. K.; NOVEMBRE, J. Genome Sequencing Highlights the Dynamic Early History of Dogs. **PLoS Genet**, v. 10, n. 1, 2014.
- GREGG, F. M.; JAMISON, E.; WILKIE, R.; RADINSKY, T. Are dogs, cats, and raccoons color blind? **Journal of Comparative Psychology**, v.9, n. 6, p. 379-395, 1929. Disponível em: <<https://psycnet.apa.org/record/1930-01031-001>>. Acesso em 14 de Maio de 2019.
- GRIEBEL, U. Color vision in marine mammals: a review. **The Vienna school of marine biology: a tribute to Jörg Ott. Facultas Universitätsverlag: Wien**, 2002.
- GUEx, N., PEITSCH, M.C., SCHWEDE, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. **Electrophoresis**, v. 30, p. 162-173, 2009.
- HASIWA, N.; BAILEY, J.; CLAUSING, P.; DANESHIAN, M.; EILERAAS, M.; FARKAS, S.; GYERTYÁN, I.; HUBRECHT, R.; KOBEL, W.; KRUMMENACHER, G.; LEIST, M.; LOHI, H.; MIKLÓSI, A.; OHL, F.; OLEJNICZAK, K.; SCHMITT, G.; SINNETT-SMITH, P.; SMITH, D.; WAGNER, K.; YAGER, D. J.; ZURLO, J.; HARTUNG, T. Critical Evaluation of the Use of Dogs in Biomedical Research and Testing in Europe. **ALTEX**, v. 28, n. 4, p. 326-340, 2011.
- HAUSER, F. E.; HAZEL, I. V.; CHANG, B. S. W. Spectral Tuning in Vertebrate Short Wavelength-Sensitive 1 (SWS1) Visual Pigments: Can Wavelength Sensitivity be Inferred From Sequence Data? **J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)** v.322 p.529–539, 2014.

HOWE, L. K.; ACHUTJHA, P.; ALLEN, J.; ALLEN, J.; ALVAREZ-JARRETA, J.; AMODE, M. R.; ARMEAN, M. I.; AZOVI, A. G.; BENNETT, R.; BHAI, J.; BILIS, K.; BODDU, S.; CHARKHCHI, M.; CUMMINS, C.; FIORETTO, R. D. L.; DAVIDSON, C.; DODIYA, K.; HOUDAIGUI, E. B.; FATIMA, R.; GALL, A.; GIRON, G. C.; GREGO, T.; GUIJARRO-CLARKE, C.; HAGGERTY, L.; HEMROM, A.; HOURLIER, T.; IZUOGU, G. O.; JUETTEMANN, T.; KAIKALA, V.; KAY, M.; LAVIDAS, I.; LE, T.; LEMOS, D.; MARTINEZ, J. G.; MARUGÁN, J. C.; MAUREL, T.; MCMAHON, A. C.; MOHANAN, S.; MOORE, B.; MUFFATO, M.; OHEH, D. N.; PARASCHAS, D.; PARKER, A.; PARTON, A.; PROSOVETSKAIA, I.; SAKTHIVEL, M. P.; SALAM, A. I. A.; SCHMITT, B. M.; SCHUILENBURG, H.; SHEPPARD, D.; STEED, E.; SZPAK, M.; SZUBA, M.; TAYLOR, K.; THORMANN, A.; THREADGOLD, G.; WALTZ, B.; WINTERBOTTOM, A.; CHAKIACHVILI, M.; CHAUBAL, A.; SILVA, N. D.; FLINT, B.; FRANKISH, A.; HUNT, S. E.; IISLEY, G. R.; LANGRIDGE, N.; LOVELAND, J. E.; MARTIN, F. J.; MUDGE, J. M.; MORALES, J.; PERRY, E.; RUFFIER, M.; TATE, J.; THYBERT, D.; TREVANION, S. J.; CUNNINGHAM, F.; YATES, A. D.; ZERBINO, D. R.; FLICEK, P. *Ensembl* 2021. **Nucleic Acids Res.** v. 49, n. 1, p. 884–891, 2021.

HUNT, D. M.; CARVALHO L. S.; COWING J. A.; DAVIES W. L. Evolution and spectral tuning of visual pigments in birds and mammals. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, v. 364, n. 1531, p. 2941-2955, 2009.

HUNT, D. M.; LI, W. H. Molecular genetics of spectral turning in New World Monkey Colour Vision. **Journal of Molecular Evolution**, v. 46, p. 697-702, 1998.

HUNTER, L.; BARRETT, P. **Field Guide To Carnivores Of The World**. 2. ed. United Kingdom: A&C Black, 2018.

ICMBIO. **Mamíferos-Carnívoros**, 2020. Disponível em: <<https://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/estado-de-conservacao/2787-mamiferos-carnivoros>>. Acesso em 31 de Março de 2020.

JACOBS, G. H. Colour vision in animals. **Endavour, New Series**, v. 7, n. 3, p. 137-140, 1983.

JACOBS, G. H. Evolution of colour vision in mammals. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 364, p. 2957-2967, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2781854/pdf/rstb20090039.pdf>>. Acesso em: 08 de Maio de 2019.

JACOBS, G. H.; DEEGAN, J. F.; CROGNALE, M. A.; FENWICK, J. A. Photopigments of dogs and foxes and their implications for canid vision. **Visual Neuroscience**, n. 10, p. 173-180, 1993.

JACOBS, G. H.; ROWE, M. P. Evolution of vertebrate color vision. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 87, n. 4-5, p. 206-216, 2004.

JACOBS, G.; DEEGAN, J. F. II. Uniformity of colour vision in Old World monkeys. **Proceedings of the royal Society B**, v. 266, p. 2023-2028, 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1690314/pdf/10584339.pdf>>. Acesso em: 08 de Maio de 2019.

- JORGE, R. P. S.; BEISIEGEL, B. M.; LIMA, E. S.; JORGE, M. L. S. P.; PITMAN, M. R. P. L.; PAULA, R. C. Avaliação do estado de conservação do Cachorro-vinagre. **Biodiversidade Brasileira**, v.3, n. 1, p, 179-190, 2013. Disponível em:<http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/avaliacao-do-risco/carnivoros/cachorro-vinagre_speothos_venaticus.pdf> Acesso: em 14 de Maio de 2019.
- JOSELEVITCH, C. Human retinal circuitry and physiology. **Psychology & Neuroscience**, v. 1, n. 2, p. 141 – 165, 2008.
- JOTTA, P. A. C. V. **Análise comportamental e genética da visão de cores do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*)**. 2012. Dissertação (Mestre em Biologia Animal) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2012.
- KASPARSON, A. A.; BADRIDZE, J.; MAXIMOV, V. V. Colour cues proved to be more informative for dogs than brightness. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.280, n.1766, 2013.
- KAWAMURA, S. Rhodopsin phosphorylation as a mechanism of cyclic GMP phosphodiesterase regulation by S-modulin. *Nature*, v. 362, p. 855-857, 1993.
- KITAGAWA, B. Y.; COUTINHO, S. D. Benefícios advindos da interação homem-cão. **Rev. Inst. Ciênc. Saúde**, v.22, n.2, p.123- 128, 2004.
- KORESSAAR T, REMM M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. **Bioinformatics**, v. 15, n. 10, p. 289-1291, 2007. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17379693>>. Acesso em 04/07/2021.
- KOTB, A. M., IBRAHIM, I. A., ALY, K. H., & ZAYED, A. E. Histomorphometric analysis of the choroid of donkeys, buffalos, camels and dogs. **International ophthalmology**, v. 39, n. 6, p. 1239–1247, 2019.
- LAM, K.; SEFTON, A. J.; BENNETT, M.R. Loss of exons from the optic nerve of the rat during early postnatal development. **Brain Res.**, v. 255, n. 3, p. 487-491, 1982
- LANTYER-ARAUJO, N.L.; SILVA, D.N.; ESTRELA-LIMA, A.; MURAMOTO, C.; LIBÓRIO, F.A.; SILVA, É.A.D.; ORIÁ, A.P. Anatomical, histological and computed tomography comparisons of the eye and adnexa of crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) to domestic dogs. **PLoS One**, v. 14, n. 10, 2019.
- LEONARD, J. A.; WAYNE, R. K.; WHEELER, J.; VALADEZ, R.; GUILLÉN, S.; VILÀ, C. Ancient DNA Evidence for Old World Origin of New World Dogs. **Science**, v. 298, n. 5598, p. 1613, 2002.
- LESIUK, T. P.; BRAEKEVELT, C. R. Fine structure of the canine tapetum lucidum. **J. Anat.**, v. 136, n. 1, p. 157-164, 1983. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1171936/pdf/janat00209-0159.pdf>>. Acesso em 14 de Maio de 2019.
- LHÉRITEAU, E.; LIBEAU, L.; STIEGER, K.; DESCHAMPS, J.Y.; MENDES-MADEIRA, A.; NATHALIE, P.; FRANCOISE, L.; MELLERSH, C.; ELLINWOOD, N.; CHEREL, Y.; MOULLIER, P.; ROLLING, F. The RPGRIP1-deficient dog, a

promising canine model for gene therapy. **Molecular vision**. v. 15, p. 349-61. 2009

LINDBLAB-TOH, K.; WADE, C. M.; MIKKELSEN, T. S.; KARLSSON, E. K.; JEFFE, D. B.; KAMAL, M.; CLAMP, M.; CHANG, J. L.; KULKOKAS, E. J.; ZODY, M. C.; MAUCELI, E.; XIE, X.; BREEN, M.; WAYNE, R. K.; OSTRANDER, E. A.; PONTING, C. P.; GALIBERT, F.; SMITH, D. R.; deJONG, P. J.; KIRKNESS, E.; ALVAREZ, P.; BIAGI, T.; BROCKMAN, W.; BUTLER, J.; CHIN, C.; COOK, A.; COOK, A.; CUFF, J.; DALY, M. J.; DeCaprio, D.; GNERRE, S.; GRABHERR, M.; KELLIS, M.; KLEBER, M.; BERDELEBEN, C.; GOODSTADT, L.; HENGER, A.; HITTE, C.; KIM, L.; KOEPFLI, K.P.; PARKER, H. G.; POLLINGER, J. P.; SEARLE, S. M. J.; SUTTER, N. B.; THOMAS, R.; WEBBER, C.; LANDER, E. S. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, v. 438, p. 803–819, 2005.

LOPES, K. R. F.; SILVA, A. R. Considerações sobre a importância do cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) dentro da sociedade humana. **Acta Veterinaria Brasílica**, v. 6, n. 3, p. 177-185, 2012.

MALKEMPER, P.; PEICHL, L. Retinal photoreceptor and ganglion cell types and topographies in the red fox (*Vulpes vulpes*) and Arctic fox (*Vulpes lagopus*). **Journal of Comparative Neurology**. v.526, p. 2078-2098, 2018.

MCGREEVY, P.; GRASSI, T. D.; HARMAN, A. M. A strong correlation exists between the distribution of retinal ganglion cells and nose length in the dog. *Brain Behav Evol*, v. 63, n. 1, p. 13-22, 2004.

MECH, L. D. *Canis Lupus*. **Mammalian Species**, n. 37, p. 1-6, 1974. Disponível em:
<<https://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1362&context=usgsnpwrc>>. Acesso: em 01 de Maio de 2019.

MILLER, P. E.; MURPHY, C. J. Vision in Dogs. **JAVMA**, v. 207, n. 12, 1995

MOWAT, F. M., PETERSEN-JONES, S. M., WILLIAMSON, H., WILLIAMS, D. L., LUTHERT, P. J., ALI, R. R., & BAINBRIDGE, J. W. Topographical characterization of cone photoreceptors and the area centralis of the canine retina. **Molecular vision**, v. 14, p. 2518–2527, 2008.

MURPHY, C. J.; SAMUELSON, D.A.; POLLOCK, R.V. The Eye. In: EVANS, H; LAHUNTA, A. **Miller's Anatomy of the Dog**, 2012.

NAMAN, M. J. V. **Estudo da morfologia retiniana e genética de opsinas do bentevizinhode-asa-ferrugínea (*Myiozetetes cayanensis*, Tyrannidae)**, 2018

NEITZ, J.; GEIST, T.; JACOBS, G. H. Color vision in the dog. **Visual Neuroscience**, v. 3, n. 2, p. 119–125, 1989.

NISHIDA, S. M. **Sentido da Visão**. Departamento de Fisiologia, IB Unesp-Botucatu, 2012. Disponível em:
http://www.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/Fisiologia/Neuro/08.sentido_visao.pdf. Acesso em: 08 de Maio de 2019.

- OLIVEIRA, H. M. **Notas sobre os mecanismos da visão de seres**, 2019. Disponível em: <http://www2.ee.ufpe.br/codec/eye_seminar.pdf>. Acesso em 14 de Maio de 2019.
- OYAMADA, M. K. Fototransdução: Ativação, inativação e adaptação. *RBM Revista Brasileira de Medicina*, v. 20, p. 11, 2015.
- PARKER, H. G.; DREGER, D. L.; RIMBAULT, M.; DAVIS, B. W.; MULLEN, A. B.; CARPINTERO-RAMIREZ, G.; OSTRANDER, E. A. Genomic Analyses Reveal the Influence of Geographic Origin, Migration, and Hybridization on Modern Dog Breed Development. *Cell reports*, v.19, n.4, p. 697–708. 2017. Disponível em: <[https://www.cell.com/cell-reports/pdfExtended/S2211-1247\(17\)30456-4](https://www.cell.com/cell-reports/pdfExtended/S2211-1247(17)30456-4)>. Acesso em 31 de Março de 2020.
- PAULA, R. C.; MEDICI, P.; MORATO, R. G. **Plano de ação para conservação do lobo-guará**: análise de viabilidade populacional e de hábitat (PHVA). Brasília: Ibama, 2007.
- PEICH, L.; BEHRMANN, G.; KROGER, R. H. H. For whales and seals the ocean is not blue: a visual pigment loss in marina mammals. *European Journal of Neuroscience*, v. 13, p. 1520-1528, 2001.
- PEICHL, L. Catecholaminergic amacrine cells in the dog and wolf retina. *Visual Neuroscience*, v. 7, p. 575–587, 1991.
- PEICHL, L. Diversity of mammalian photoreceptor properties: Adaptations to habitat and lifestyle? *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, v. 287A, n. 1, p. 1001–1012, 2005.
- PEICHL, L. Topography of ganglion cells in the dog and wolf retina. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 324, n. 4, p. 603–620, 1992.
- PESSUTTI, C.; SANTIAGO, M.; OLIVEIRA, L. Order Carnivora, Family Canidae (Dogs, Foxes, Maned Wolves). In: FOWLER, M.; CUBAS, Z. **S. Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. 1ª Edição. Wiley-Blackwell, 2001.
- PRETTERET, G.;. Brightness discrimination in the dog. *Journal of Vision*, v. 4, p. 241-249, 2004. Disponível em: <<https://jov.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2121581>>. Acesso em: 08 de Maio de 2019.
- PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L. C.; LAMANTIA, A. S.; MCNARA, J. O.; WILLIAMS, S. **Neuroscience**. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2001.
- RAMÓN Y CAJAL, S. La rétine des vertébrés. *La Cellule*, 1893.
- REED, C. A. Animal Domestication in the Prehistoric Near East: The origins and history of domestication are beginning to emerge from archeological excavations. *Science*. v.130, p. 1629-1639, 1959.
- ROSS, C; BLOCK, J. K-9 Narcotics Detection Training. *Police Chief*, v. 55, n.5, p, 53-54, 1988.

- RUSSO, A. cGMP in Phototransduction, 2008. Disponível em:<<http://flipper.diff.org/app/items/info/1385>>. Acesso em 15 de Janeiro de 2020.
- SCHWARTZ, S. H. **Visual perception: A clinical orientation**, 2009.
- SHI, Y.; RADLWIMMER, F. B.; YOKOYAMA, S. Molecular genetics and the evolution of ultraviolet vision in vertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 20, p. 11731–11736, 2001.
- SILVA, K. V. K. A. **Ocorrência, tamanho populacional e atividade do cão doméstico (Canis lupus familiaris) no Parque Nacional da Tijuca, RJ**. 2017. Dissertação (Mestre em Ciências) - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO DE FLORESTAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E FLORESTAIS, Seropédica, RJ, 2017. Disponível em:<<http://r1.ufrj.br/wp/ppgcaf/files/2018/06/DISSERTA%C3%87%C3%83O-MESTRADO-KATYUCHA-CORRIGIDA-2018.pdf>>. Acesso: em 14 de Maio de 2019.
- SOUSA, A. R. Fototransdução. Modelo de transmissão do sinal através de membranas celulares. **Acta Oftalmológica**, n. 11, p. 19-30, 2001. Disponível em:<http://www.spoftalmologia.pt/wp-content/uploads/2002/01/acta_oftam_n11_2001_pp.19-30.pdf>. Acesso em: 08 de Maio de 2019.
- STAIN, H. J.; LARIVIERE, S. **Carnivore: Mammal order**, 2020. Disponível em:< <https://www.britannica.com/animal/carnivore-mammal>>. Acesso em 31 de Março de 2020.
- STUDER, G., REMPFER, C., WATERHOUSE, A.M., GUMIENNY, G., HAAS, J., SCHWEDE, T. QMEANDisCo - distance constraints applied on model quality estimation. **Bioinformatics**, v.36, p. 1765-1771, 2020.
- TANAKA, T.; WATANABE, T.; EGUCHI, Y.; YOSHIMOTO, T. Color Discrimination in Dogs. **Nihon Chikusan Gakkaiho**, v.71, n. 3, p. 300-304, 2000.
- UNTERGASSER, A., CUTCUTACHE, I., KORESSAAR, T., YE, J., FAIRCLOTH, B. C., REMM, M., & ROZEN, S. G. Primer3--new capabilities and interfaces. **Nucleic acids research**, v. 40, n.15, 2012. Disponível em:<<https://doi.org/10.1093/nar/gks596>>. Acesso em 04/07/2021.
- VERHULST, S.; MAES, F. W. Scotopic vision in colour-blinds. **Vision Research**, v. 38, p. 3387-3390, 1998. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042698997003398>>. Acesso em: 08 de Maio de 2019.
- VILÀ, C.; SAVOLAINEN, P.; MALDONADO, J. E.; AMORIM, I. R.; RICE, J. E.; HONEYCUTT, R. L.; CRANDALL, K. A.; LUNDEBERG, J.; WAYNE, R. K. Multiple and ancient origins of the domestic dog. **Science**, v. 276, p 1687-1689, 1997.

VOROBIEV, M. Ecology and evolution of primate colour vision. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 87, n. 4-5, p. 230–238, 2004.

WALLS, G. L. **The vertebrate eye and its adaptive radiation**, 1942.

Disponível

em:<<https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/7369#/summary>>. Acesso em: 08 de Maio de 2019.

WASSLE H, BOYCOTT BB. Functional architecture of the mammalian retina. **Physiol Rev.** v.71, n.2, p. 447-480, 1991.

WATERHOUSE, A., BERTONI, M., BIENERT, S., STUDER, G., TAURIELLO, G., GUMIENNY, R., HEER, F.T., DE BEER, T.A.P., REMPFER, C., BORDOLI, L., LEPORE, R., SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Res.** v. 46, n.1, p. 296-303, 2018.

WEBVISION. **The Organization of the Retina and Visual System**, 2020.

Disponível em< <https://webvision.med.utah.edu/>>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2020.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference.** 3ª Edição. Johns Hopkins University Press, 2005. Disponível em:<<http://www.press.jhu.edu>>. Acesso em 31 de Março de 2020.

WILSON, D.E.; ARMSTRONG, D. M.; JONES, J. K. **Mammal**, 2020. Disponível em:<<https://www.britannica.com/animal/mammal>>. Acesso em 31 de Março de 2020.

YOKOYAMA, S. **Molecular evolution of color vision in vertebrates.**

Department of Biology, Biological Research Laboratories, Syracuse University, College Place, Syracuse, NY, USA, 2002. Disponível em:

<http://pages.ucsd.edu/~dmacleod/221/color%20papers/yokoyama.pdf>. Acesso em: 28 out. 2017.

YOKOYAMA, S.; RADLWIMMER, F. B. The “Five-Sites” Rule and the Evolution of Red and Green Color Vision in Mammals. **Mol. Biol. Evol.**, v.15, n. 5, p. 560–567, 1998.

YOKOYAMA, S.; RADLWIMMER, F. B.; KAWAMURA, S. Regeneration of ultraviolet pigments of vertebrates. **FEBS**, v. 423, p. 155-158, 1998.

YOKOYAMA, S.; SHI, Y. Genetics and evolution of ultraviolet vision in vertebrates. **FEBS**, v. 486, p. 167-172, 2000.

ZIMEN, E. The wolf, a species in danger. **Delacorte Press.** New York, 1981.

ANEXO I



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 71236-1	Data da Emissão: 17/10/2019 07:36:02	Data da Revalidação*: 17/10/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Lucas de Oliveira Andrade	CPF: 444.515.858-56
Título do Projeto: ESTUDO GENÉTICO DOS PIGMENTOS VISUAIS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE CARNÍVOROS.	
Nome da Instituição: Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo	CNPJ: 63.025.530/0010-03

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Carnívoros)	Sangue, Outras amostras biológicas(Soro e saliva)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo	Laboratório

ANEXO II



INSTITUTO DE PSICOLOGIA
 www.ip.usp.br

Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO GENÉTICO DOS PIGMENTOS VISUAIS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE CARNÍVOROS (CARNIVORA: CANIDAE E FELIDAE).", protocolada sob o CEUA nº 8595300719 (ID 000228), sob a responsabilidade de **Daniela Maria Oliveira Bonci** e equipe; *Lucas de Oliveira Andrade; Dora Selma Fix Ventura; Einat Hauzman; Francisco Manuel Moreno Carmona; Maria Júlia Vilani Naman* - 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 do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (CEUA/IPUSP) na reunião de 25/10/2019.

We certify that the proposal "GENETIC STUDY OF VISUAL PIGMENTS IN DIFFERENT SPECIES OF CARNIVORS (CARNIVORA: CANIDAE AND FELIDAE).", utilizing 100 Dogs (males and females), 30 Cats (males and females), protocol number CEUA 8595300719 (ID 000228), under the responsibility of **Daniela Maria Oliveira Bonci** and team; *Lucas de Oliveira Andrade; Dora Selma Fix Ventura; Einat Hauzman; Francisco Manuel Moreno Carmona; Maria Júlia Vilani Naman* - 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 - Universidade de São Paulo (CEUA/IPUSP) in the meeting of 10/25/2019.

Finalidade da Proposta: *Pesquisa (Acadêmica)*

Vigência da Proposta: de 09/2019 a 08/2022

Área: *Psicologia Experimental*

APÊNDICE I

Termo de Ciência e Concordância

Eu, _____ portador(a) do RG: _____ e CPF: _____ declaro estar ciente e de acordo em contribuir com a doação de amostras biológicas (saliva e/ou sangue) do meu animal de estimação para o projeto de pesquisa **Estudo genético dos pigmentos visuais em diferentes espécies de carnívoros (Carnivora: Canidae)**, do *Laboratório de Psicofisiologia Sensorial do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo*.

Para coleta de amostras de saliva é necessário a realização de uma raspagem bucal com um swab. Com esse procedimento realiza-se uma raspagem na mucosa bucal do animal com um instrumento com cerdas. Os únicos requisitos são que o animal não tenha se alimentado ou bebido água 30 minutos antes da realização da raspagem bucal. O procedimento é indolor, sem riscos e será realizado pelo pesquisador.

Para coleta de amostra de sangue será necessário utilização de uma seringa para coleta do material, por isso, faz-se necessário que o procedimento seja realizado por um médico veterinário. Em alguns casos específicos, será necessário fazer tricotomia (raspagem do pelo) no local da coleta. Os acessos de eleição para coleta são as veias jugular externa, cefálica e a safena. Após o procedimento de antisepsia serão coletados 3ml de sangue para garantir boa quantidade para posterior análise. Os riscos deste procedimento podem ser: Dor momentânea e hematoma leve.

Em ambos os procedimentos o animal será contido de forma gentil, para evitar o estresse. Não serão utilizados sedativos ou anestésicos. O animal não será submetido a qualquer procedimento cirúrgico.

As amostras coletadas têm a finalidade de pesquisa. Não haverá nenhum custo financeiro para o tutor do cão que participar desta pesquisa.

Sua participação é totalmente voluntária, podendo desistir no momento em que desejar.

Sua assinatura neste termo de consentimento indica que você leu o mesmo e decidiu permitir que seu cão participasse do estudo.

Nome do animal: _____

Idade: _____ Microchip: _____

Espécie: Canina Raça: _____

Sexo: _____ Cor da pelagem: _____

Assinatura do tutor: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Assinatura do médico veterinário: _____

São Paulo, _____ de _____ de 2019.

APÊNDICE II

Quadro com as informações de concentração de pureza do material genético extraído a partir de amostras de saliva em cães domésticos. SRD: Sem raça definida.

Raça	Concentração	A260/280	A260/230
Akita	117,8	1,75	1,05
Borzoí	123,6	1,67	0,75
Bulldog francês	20,4	1,32	0,69
Galgo italiano	807,9	1,69	0,9
Galgo italiano	163,6	1,66	0,78
Golden retriever	117,2	1,61	0,82
Golden retriever	555,4	1,74	0,89
Golden retriever	40,9	1,47	1,1
Greyhound	31	1,52	2,16
King Charles Spaniel	2268	1,81	1,64
Lhasa apso	48,1	1,66	3,24
Lhasa apso	20,3	1,73	0,58
Lhasa apso	31,4	1,73	0,68
Pastor Australiano	4,9	0,75	-2,67
Pastor Australiano	28,6	1,28	0,39
Pequinês	97,88	1,71	0,92
Pequinês	1027	1,61	0,86
Pequinês	223,9	1,29	0,52
Pequinês	549,5	1,66	0,83
Pug	103,7	1,6	0,84
Pug	10607	1,73	1,37
Pug	2478,4	1,74	0,94
Pug	115,6	1,63	0,9
Shih-tzu	444,4	1,8	1,18
Shih-tzu	8,6	1,67	0,5
Spitz	208,2	1,7	1,13
Spitz	97,7	1,64	0,92
SRD	124,4	1,84	1,17
SRD	113,4	1,73	1,39
SRD	213,6	1,22	0,8
SRD	204,8	1,31	4,9
SRD	695,1	1,68	0,91
SRD	173,7	1,52	0,49
SRD	97,6	1,64	0,67
SRD	879,6	1,83	1,5

Raça	Concentração	A260/280	A260/230
Teckel	8,8	1,18	3,09
Whippet	123,6	1,51	0,97
Whippet	170,6	1,76	1,23
Whippet	319,2	1,81	1,18
Whippet	3,6	1,44	0,8
Yorkshire	31,5	1,84	1,17

APÊNDICE III

Quadro com as informações de concentração de pureza do material genético extraído a partir de amostras de saliva em canídeos silvestres. Não foi possível realizar a mensuração das espécies *L. vetulus* e *S. venaticus* pois o equipamento Nanodrop não estava disponível após a realização de extração. Devido a pandemia causada devido ao novo coronavírus as atividades no laboratório ficaram restritas e o equipamento ainda voltou a operar.

Espécie	Concentração	A260/280	A260/230
<i>C.thous</i>	14,1	1,62	0,19
<i>C. Brachyurus</i>	9,4	0,89	0,17

APÊNDICE IV

Quadro com as relações entre as ampliações dos sítios importantes para a inferência do pico de sensibilidade espectral do fotopigmento LWS e as amostras das diferentes raças e espécies coletadas neste projeto.

As células em verde indicam que os sítios foram amplificados, sequenciados e analisados. Em amarelo é indicado que os sítios foram amplificados, mas não foi realizado o sequenciamento e análise, e em vermelho é indicado os sítios que não foram amplificados, sequenciados e analisado.

Cães domésticos:

Raça	180	197	277	285	308
Akita	A	H	Y	T	A
Borzoi					
Galgo italiano		H			
Galgo italiano					
Golden retriever	A	H			
Golden retriever	A	H			
Golden retriever		H			
Greyhound					
King Charles Spaniel	A	H	Y	T	A
Pastor australiano		H			
Pastor australiano					
Pequines	A	H	Y	T	A
Pequines	A	H	Y	T	A
Pequines	A	H			
Pequinês	A	H	Y	T	A
Pug	A	H	Y	T	A
Pug	A	H			
Pug	A	H			
Pug	A	H			
Shih-tzu	A	H			
Splitz	A	H			
Splitz	A	H			
SRD	A	H	Y	T	A
SRD	A	H	Y	T	A
SRD	A	H			

Raça	180	197	277	285	308
SRD	A	H	Y	T	A
SRD	A	H			
SRD	A	H	Y	T	A
SRD	A	H	Y	T	A
Teckel	A				
Whippet	A	H			
Whippet	A	H	Y	T	A
Whippet	A				
Yorkshire	A	H			

Canídeos silvestres:

Espécie	180	197	277	285	308
<i>C. brachyurus</i>	A	H		Faltou amostra	
<i>C. thous</i>	A	H	Y	T	A
<i>L. vetulus</i>	A	H	Y	T	A
<i>S. venaticus</i>	Não sequenciou	H	Y	T	A

*SRD: Sem raça definida

Lucas O. Andrade

Lucas de Oliveira Andrade

Daniela M. Bonci

Prof^a Dr^a Daniela Maria Oliveira Bonci

