

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE PSICOLOGIA**

**Juliana Hiromi Tashiro**

**Estudos comparativos da morfologia da retina de**

*Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus*

**(Serpentes, Viperidae)**

**São Paulo**

**2020**

**JULIANA HIROMI TASHIRO**

**Estudos comparativos da morfologia da retina de  
*Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus* (Serpentes, Viperidae)**

**Versão Original**

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

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dra. Dora Fix Ventura

Coorientação: Dra. Einat Hauzman

**São Paulo**

**2020**

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)

Tashiro, Juliana Hiromi

Estudos comparativos da morfologia da retina de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus* (Serpentes, Viperidae) / Juliana Hiromi Tashiro; orientadora Dora Selma Fix Ventura; co-orientadora Einat Hauzman. -- São Paulo, 2020.

100 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento) -- Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2020.

1. Retina. 2. Serpentes. 3. Variação ontogenética. 4. Acuidade visual. 5. Ecologia visual. I. Fix Ventura, Dora Selma, orient. II. Hauzman, Einat, co-orient. III. Título.

**Juliana Hiromi Tashiro**

**Estudos comparativos da morfologia da retina de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus* (Serpentes, Viperidae).**

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

Aprovado em: 26 de novembro de 2020

Banca Examinadora

Profa. Dra. Dora Fix Ventura

Instituição: Instituto de Psicologia, USP

Assinatura:

Profa. Dra. Carola Anabel Mariana Yovanovich

Instituição: Instituto de Biociências, USP

Assinatura:

Prof. Dr. Marcio Roberto Costa Martins

Instituição: Instituto de Biociências, USP

Assinatura:

## **Agradecimentos**

A conclusão desta dissertação só foi possível devido ao apoio e participação de pessoas e instituições as quais tem meus sinceros agradecimentos.

Agradeço imensamente às minhas orientadoras, Dra. Einat Hauzman e Prof<sup>a</sup>. Dra. Dora Fix Ventura, por me acolherem no laboratório, pelos preciosos ensinamentos e também pela dedicação integral, gentileza, simpatia, doçura, paciência, respeito e atenção que têm com seus alunos. Estes aspectos foram a base para que a aprendizagem e desenvolvimento de cada etapa deste projeto seguissem de maneira fluida e com menos momentos de estresse, me dando forças para seguir em frente e concretizar o mestrado, que antes era algo distante e apenas almejado.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo n<sup>o</sup> 2018/13910-9, pela bolsa concedida. Declaro ainda que as opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Agradeço à Universidade de São Paulo e ao Instituto de Psicologia pelo suporte e disponibilização do espaço para a conclusão desta pesquisa.

Agradeço ao Instituto Butantan por todo apoio e pela concessão das serpentes *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus*, mas agradeço especialmente à:

- Adriana Mezini, pela atenciosidade e gentileza durante as coletas das serpentes na Recepção de Animais do Instituto Butantan
- Valdir Germano, por todo o seu carinho e apoio conosco e com as serpentes.
- Médica veterinária, Dra. Kalena Barros, por dedicar seu tempo e conhecimento com a eutanásia dos animais.
- Doutoranda Karina Banci e Me. Lucas Siqueira, do Laboratório de Ecologia e Evolução, e ao Dr. Felipe Grazziotin e seus alunos do Laboratório de Coleções Zoológicas, pela generosidade e gentileza de nos ceder os olhos de alguns de seus animais para este projeto.
- Dra. Kathleen F. Grego e ao Jarbas, do Laboratório de Herpetologia por toda a ajuda com os filhotes de *C. durissus*.

Agradeço aos membros da banca de qualificação e da defesa pelas correções, críticas e sugestões para o aprimoramento deste estudo.

Agradeço ao Prof<sup>o</sup> Dr. Marcelo Costa pelo apoio com as análises estatísticas.

Agradeço ao Dr. Leonardo Henriques pela formatação das planilhas que facilitaram as análises dos dados estereológicos.

Agradeço à Prof<sup>a</sup> Dra. Dânia E. Hamassaki e seus alunos pela amabilidade de conceder-nos alguns materiais do Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Biociências da USP.

Agradeço a todos os queridos professores e colegas do Laboratório de Psicofisiologia Sensorial pela agradável convivência e pelas trocas diárias de conhecimento.

Agradeço especialmente à Maju, Vitor e Lucas que dividiram comigo inúmeros momentos de angústia e de alegria, pela parceria e por sempre estarem disponíveis todas as vezes em que precisei de ajuda ao longo de todos esses anos.

Agradeço também a cada serpente que cedeu sua vida para que este trabalho pudesse ser executado.

## **Apoio Financeiro**

Este projeto recebeu auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), com a concessão de bolsa de mestrado, processo n° 2018/13910-9.

O projeto também teve apoio financeiro da FAPESP, com o financiamento de projetos do Laboratório de Psicofisiologia Sensorial (Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo), concedidos à Dra. Dora Fix Ventura: Projeto Temático 2014/26818-2 e Equipamento Multiusuários 2016/08976-5.

Declaro que as opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

## Resumo

O sistema visual das serpentes apresenta adaptações associadas ao ritmo circadiano, uso de habitat, estratégias de caça e dieta adotada pelas espécies. As serpentes da família Viperidae, *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus*, ocupam ambientes florestados e de campo aberto, respectivamente. *B. jararaca* apresenta variações ontogenéticas na dieta e uso de habitat: filhotes se alimentam de vertebrados ectotérmicos e utilizam estrato arbóreo, enquanto adultos se alimentam de roedores e ocupam estrato terrestre. Por outro lado, *C. durissus* tem hábitos terrestres e se alimentam de roedores ao longo de toda a vida. Tais diferenças inter- e intraespecíficas fazem destas serpentes um sistema-modelo ideal para testar hipóteses de correlação entre características da retina e aspectos ecológicos das espécies. Neste trabalho foram comparadas a densidade e distribuição de neurônios das retinas, e a acuidade visual de *B. jararaca* e *C. durissus* adultas e filhotes. Serpentes *B. jararaca* (n=24) e *C. durissus* (n=26) foram obtidas junto ao Instituto Butantan, eutanasiadas com dose letal do anestésico Thionembutal (100 mg/kg), e os olhos foram enucleados e fixados em paraformaldeído 4%. Este projeto teve a aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo (CEUA-IP nº 1805090417). As retinas foram dissecadas e processadas por imunohistoquímica para marcação de opsinas L/M e S e para a identificação dos diferentes tipos de fotorreceptores, ou coradas pela técnica de coloração de Nissl para identificação das células da camada de células ganglionares (CCG). Análises da densidade celular foram realizadas a partir das retinas íntegras com o software *Stereo Investigator*, utilizando o método estereológico de fracionamento óptico. As bordas das retinas foram desenhadas e cerca de 200 caixas de amostragem foram dispostas por toda sua extensão, de forma uniforme e randomizada. A acuidade visual foi estimada a partir do pico de densidade de células da CCG e da distância focal dos olhos. O teste estatístico não-paramétrico de *Mann-Whitney* foi aplicado para a comparação dos valores obtidos. Os resultados mostraram densidade de fotorreceptores maior em filhotes ( $135.300 \pm 29.765$  e  $133.096 \pm 11.496$  células/mm<sup>2</sup> em *B. jararaca* e *C. durissus*, respectivamente), comparada aos adultos ( $72.871 \pm 16.053$  e  $75.267 \pm 11.483$  células/mm<sup>2</sup> em *B. jararaca* e *C. durissus*, respectivamente). Em ambas espécies a população de fotorreceptores é dominada por bastonetes (90-95% dos fotorreceptores). A proporção de cones foi maior em *C. durissus* ( $9,8 \pm 0,9\%$  em adultos e  $10,9 \pm 0,8\%$  em filhotes), comparada a *B. jararaca* ( $6,5 \pm 0,7\%$  em adultos e  $7,5 \pm 1,4\%$  em filhotes). Em ambas espécies a população de cones é composta predominantemente por cones L/M (cones simples e duplos), e os cones S perfazem cerca de 10% dos cones. Os valores de densidade média de células da CCG também foram maiores em filhotes ( $9.773 \pm 878$  e  $9.691 \pm 1.005$  células/mm<sup>2</sup> em *B. jararaca* e em *C. durissus*, respectivamente), comparado aos adultos ( $4.877 \pm 1.086$  e  $4.640 \pm 722$  células/mm<sup>2</sup> em *B. jararaca* e *C. durissus*, respectivamente). Os mapas de isodensidade de fotorreceptores mostraram que em adultos de *B. jararaca*, cones e bastonetes apresentam uma distribuição em faixa horizontal. Em filhotes foi observada maior densidade de bastonetes na retina dorsal e maior densidade de cones na região ventral. Em adultos e filhotes de *C. durissus*, os mapas de distribuição de cones mostraram uma faixa horizontal, e os bastonetes apresentaram maior concentração na retina dorsal. Nas duas espécies, os cones L/M acompanharam a distribuição de cones totais, enquanto os cones S apresentaram distribuição do tipo *area* na retina central ou ventral. Os mapas de células da CCG mostraram uma faixa horizontal pouco definida e pico de densidade na região temporal em retinas de *B. jararaca* adultas, e em filhotes foi observada *area* anisotrópica ventral. Adultos de *C. durissus* também apresentaram uma faixa horizontal pouco definida e pico de densidade temporal, e filhotes apresentaram uma distribuição difusa, e pico de densidade na região temporal. A acuidade visual estimada foi maior em adultos de *C. durissus* ( $2.9 \pm 0.2$  ciclos por grau, cpg), comparada aos filhotes e a *B. jararaca* adultas e filhotes, todos com cerca de 2.3 cpg. Os resultados deste estudo apontam para uma plasticidade morfológica das retinas de *B.*

*jararaca* ao longo da vida, e importantes diferenças estruturais das retinas duas espécies. A maior densidade de cones em *C. durissus* pode estar associada a utilização de campos abertos, com maior luminosidade em comparação com ambientes florestados ocupados por *B. jararaca*. A faixa visual de cones e bastonetes em adultos de *B. jararaca* deve favorecer uma visualização panorâmica do ambiente e auxiliar no forrageamento em condições fotópicas e escotópicas. Em filhotes de *B. jararaca*, as diferenças na distribuição de cones e bastonetes podem estar associadas ao uso do estrato arbustivo e a estratégia de caça por espreita: a maior densidade de bastonetes na região dorsal deve proporcionar maior sensibilidade no campo de visão inferior, enquanto a maior densidade de cones na retina ventral deve proporcionar melhor acuidade do campo de visão superior em condições fotópicas, e favorecer a visualização de potenciais predadores aéreos. Em adultos e filhotes de *C. durissus*, a maior densidade de bastonetes na retina dorsal também deve proporcionar maior sensibilidade do campo de visão inferior em condições de baixa luminosidade, enquanto a faixa visual formada por cones pode favorecer o forrageamento em condições fotópicas ou mesópicas. O pico de densidade de células da CCG na retina temporal de *B. jararaca* adultas e de *C. durissus* adultas e filhotes deve beneficiar a resolução espacial no campo de visão frontal, e auxiliar no comportamento de bote para defesa ou captura de presas endotérmicas. Por outro lado, em filhotes de *B. jararaca*, a maior densidade de células da CCG na retina ventral deve beneficiar a observação de objetos no campo de visão superior. Este trabalho é pioneiro em identificar diferenças na morfologia da retina de serpentes viperídeas a partir de uma abordagem ontogenética e interespecífica. Com base nos resultados obtidos, é possível inferir como a plasticidade morfológica deste tecido neural pode estar associada a aspectos diversos da ecologia comportamental das espécies. Este estudo abre uma série de possibilidades para novas investigações relacionadas a ecologia visual e comportamental de serpentes.

**Palavras-chave:** Serpentes, retina, ecologia visual, variação ontogenética, acuidade visual, fotorreceptores, células ganglionares, análises estereológicas.

## Abstract

The visual system of snakes has adaptations associated with the circadian rhythm, habitat use, hunting strategies and diet of the different species. The snakes from the Viperidae family, *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus* occupy forested and open field environments, respectively. *B. jararaca* displays ontogenetic changes in diet and habitat use: juveniles feed on ectothermic vertebrates and use arboreal strata, while adults feed on rodents and occupy terrestrial strata. On the other hand, *C. durissus* has terrestrial habits and feeds on rodents throughout its entire life. Considering such inter- and intraspecific differences, these snakes represent an ideal model system to test hypotheses of correlation between the characteristics of the retina and ecological aspects of the species. In this study, we compared the density and distribution of neurons and the visual acuity of adults and juveniles of *B. jararaca* and *C. durissus*. *B. jararaca* (n=24) and *C. durissus* (n=26) were obtained at the Butantan Institute, euthanized with a lethal dose of the Thionembatal anesthetic (100 mg/kg), and the eyes were enucleated and fixed in 4% paraformaldehyde. This project was approved by the Ethics Committee on Animal Research of the Institute of Psychology, University of São Paulo (CEUA-IP n° 1805090417). The retinas were dissected and processed by immunohistochemistry to label L/M and S opsins and identify different types of photoreceptors, or stained by the Nissl technique to identify the ganglion cell layer (GCL) cells. Analyzes of neuron density were performed from whole-mounted retinas, using a stereological approach and the optical fractionation method, with the *Stereo Investigator* software. The edges of the retinas were drawn and about 200 counting frames were positioned in a uniform and randomized fashion. The visual acuity was estimated from the peak density of GCL cell and the focal distance of the eyes. A non-parametric statistical test (*Mann-Whitney*) was used to compare the values obtained. The results showed higher photoreceptor density in juveniles ( $135,300 \pm 29,765$  and  $133,096 \pm 11,496$  cells/mm<sup>2</sup> in *B. jararaca* and *C. durissus*, respectively), compared to adults ( $72,871 \pm 16,053$  and  $75,267 \pm 11,483$  cells/mm<sup>2</sup> in *B. jararaca* and *C. durissus*, respectively). In both species, the photoreceptor population is dominated by rods (90-95% of the photoreceptors). The proportion of cones was higher in *C. durissus* ( $9.8 \pm 0.9\%$  in adults and  $10.9 \pm 0.8\%$  in juveniles), compared to *B. jararaca* ( $6.5 \pm 0.7\%$  in adults and  $7.5 \pm 1.4\%$  in juveniles). In both species, the population of cones is composed predominantly by L/M cones (single and double cones), and S cones make up about 10% of the cones. The mean density of cells in the GCL was also higher in juveniles ( $9,773 \pm 878$  and  $9,691 \pm 1,005$  cells/mm<sup>2</sup> in *B. jararaca* and in *C. durissus*, respectively), compared to adults ( $4,877 \pm 1,086$  and  $4,640 \pm 722$  cells/mm<sup>2</sup> in *B. jararaca* and *C. durissus*, respectively). The photoreceptor isodensity maps showed that in adults of *B. jararaca*, cones and rods are distributed in a visual streak. In juveniles, a higher density of rods was observed in the dorsal retina, while a higher density of cones is located in the ventral region. In adults and juveniles of *C. durissus*, cones are distributed in a visual streak, and rods showed a higher concentration in the dorsal retina. In both species, the L/M cones define the distribution of cones, while the S cones are distributed in an *area centralis*, with higher density in the central or ventral retina. The distribution of GCL cells of *B. jararaca* showed a poorly defined visual streak and a peak density in the temporal region in adults, while juveniles had an anisotropic ventral *area centralis*. In *C. durissus*, adults also had a poorly defined visual streak and a peak density in the temporal region. Juveniles had a diffuse distribution, also with peak density in the temporal region. The estimated visual acuity was higher in adults of *C. durissus* ( $2.9 \pm 0.2$  cycles per degree, cpd), compared to juveniles, and to adults and juveniles of *B. jararaca*, all with about 2.3 cpd. The results of this study point to the morphological plasticity of the retinas throughout the life of *B. jararaca*, and important structural differences in the retinas of both species. The higher density of cones in *C. durissus* may be associated with the use of open field

environments, with higher luminosity in relation to the forested environment occupied by *B. jararaca*. The visual streak of cones and rods in adults of *B. jararaca* might favor a panoramic view of the environment and benefit active foraging under photopic and scotopic conditions. In juveniles of *B. jararaca*, differences in the distribution of cones and rods may be associated with the use of the arboreal strata and hunting strategy: higher density of rods in the dorsal retina may provide higher sensitivity in the lower visual field, while a higher density of cones in the ventral retina may provide a better acuity of the upper field under photopic conditions, and improve the view of potential aerial predators. In adults and juveniles of *C. durissus*, the higher density of rods in the dorsal retina might also provide higher sensitivity of the lower visual field under low light conditions, while the visual streak formed by cones may favor active foraging under photopic or mesopic conditions. The peak density of GCL cells in the temporal retina of adult *B. jararaca* and adults and juveniles *C. durissus* should benefit spatial resolution in the frontal visual field, and improve striking to capture endothermic prey. On the other hand, in juveniles of *B. jararaca*, the higher density of GCL cells in the ventral retina might benefit the observation of objects in the upper visual field. This study is pioneer in identifying differences in the retinal morphology of viperid snakes from an ontogenetic and interspecific perspective. Based on the results, it is possible to highlight how the morphological plasticity of this neural tissue can be associated with different aspects of the species' behavioral ecology. This study opens up a range of possibilities for new investigations related to the visual and behavioral ecology of snakes.

**Keywords:** Snakes, retina, visual ecology, ontogenetic variation, visual acuity, photoreceptors, ganglion cells, stereological analysis.

## Lista de figuras

- Figura 1.** Fotografia da cabeça de *Bothrops jararaca*, com destaque para a fosseta loreal (seta vermelha). ..... 20
- Figura 2.** Distribuição geográfica de *C. durissus* (acima) e *B. jararaca* (abaixo) no Brasil..... 22
- Figura 3.** Filhote de *B. jararaca* se alimentando de um anfíbio anuro. Nota-se a coloração da ponta da cauda mais clara em relação à coloração corporal. .... 23
- Figura 4.** Representação esquemática de corte transversal do olho de serpente. .... 24
- Figura 5.** Corte histológico de retina da serpente *Philodryas olfersii* corado com hematoxilina-eosina com as dez camadas características da retina dos vertebrados. CEP, camada o epitélio pigmentado; CF, camada dos fotorreceptores; MLE, membrana limitante externa; CNE, camada nuclear externa; CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CCG, camada de células ganglionares; CFN, camada de fibras nervosas; MLI, membrana limitante interna..... 25
- Figura 6.** Representação morfológica das estruturas dos fotorreceptores de serpentes. A, F: cones duplos; B, E: cones simples grandes; C, D: cones simples pequenos; G: bastonete longo e H: bastonete curto..... 26
- Figura 7.** Representação esquemática da relação filogenética entre as opsinas de vertebrados e suas faixas de sensibilidade espectral. A opsina sensível a comprimento de onda longo/médio (LWS/MWS) é a mais antiga, seguido das opsinas sensíveis a comprimentos de onda curtos do ultravioleta (SWS1) ao violeta (SWS2) e das opsinas RH2 e RH1, sensíveis a comprimentos de onda médios, sendo esta última a mais recente na escala evolutiva. Fonte: Modificado de “Visual pigments in a living areaa, the Australian lungfish *Neoceratodus fosteri*” de H. J. Bailes et al., 2007, BMC Evolutionary Biology, p 7. .... 26
- Figura 8.** Representação esquemática do segmento externo de um bastonete (à esquerda) e opsinas (magenta) acopladas aos seus discos membranosos bilipídicos (abaixo e à direita). Cada opsina é formada por uma proteína transmembrânica e um comóforo, o retinal. .... 27
- Figura 9.** À esquerda, mapa topográfico de células da CCG da retina do porco-do-mato (*Pecari tajacu*). Observa-se uma faixa visual horizontal formada por uma alta densidade celular. O disco branco representa a posição do nervo óptico na retina. N, nasal; T, temporal..... 30
- Figura 10.** À esquerda, mapa de linhas das células da CCG da retina do macaco-rhesus (*Macaca mulatta*) com as linhas delimitando a sua distribuição de forma concêntrica com maior densidade caracterizada por uma *area centralis* na região central da retina. T, temporal; V, ventral. .... 31
- Figura 11.** Mapas topográficos de células da CCG das retinas do peixe *C. gunnari* (A) e *A. butcheri* (B) com o deslocamento da *area* em relação a variação ontogenética ecológica e comportamental. A. Acima: *area* localizada na retina temporal de indivíduos jovens de *C. gunnari*. Abaixo, *area* localizada na região ventral-temporal da retina em indivíduos adultos de *C. gunnari*. Barras de escala: 1mm. Fonte: De “The position of the retinal *area centralis* changes with age in *Champscephalus gunnari* (Channichthyidae), a predatory fish from coastal Antarctic waters” de T. Miyazaki et al., 2011, *Polar Biology*, p. 1117-1123. Fonte das

imagens: Filhote: disponível em: <a href="http://fishesofaustralia.net.au/home/species/4878">fishesofaustralia.net.au/home/species/4878</a> ; Adulto: disponível em: .....	32
<b>Figura 12.</b> Corte histológico corado com hematoxilina-eosina destacando a fóvea da retina da ave <i>Halcyon sancta</i> . Barra de escala: 200 $\mu\text{m}$ . .....	32
<b>Figura 13.</b> Imagens de campo claro das áreas amostradas com o mosaico de fotorreceptores das retinas de indivíduo adulto (A) e filhote (B) de <i>B. jararaca</i> retratando os critérios morfológicos utilizados para distinguir cones (contorno vermelho tracejado) de bastonetes (contorno preto contínuo). Barras de escala: 8 $\mu\text{m}$ . .....	40
<b>Figura 14.</b> A, B. Imagens dos campos de contagem amostrados de retinas planas de <i>C. durissus</i> com os segmentos externos dos fotorreceptores marcados com anticorpos anti-opsina S (A) e anti-opsina L/M (B) revelados com TRITC. Em B, observa-se cones simples e cones duplos (setas). Barras de escala, 25 $\mu\text{m}$ . C. Imagem de retina plana de <i>B. jararaca</i> , com segmentos externos dos fotorreceptores marcados por marcação dupla, com os anticorpos anti-opsina S, revelados com TRITC (vermelho) e anti-opsina L/M revelados com FITC (verde). Pode-se observar a presença de cones L/M duplos (setas). Barra de escala, 8 $\mu\text{m}$ . .....	41
<b>Figura 15.</b> Imagem das células da CCG da serpente <i>B. jararaca</i> indicando os critérios morfológicos usados para distinguir as células ganglionares (cg), que apresentam corpo celular poligonal e marcação abundante no citoplasma, de outras populações celulares (ngc, <i>non ganglion cell</i> ) que apresentam formato circular bem definido e núcleo denso. Barra de escala: 10 $\mu\text{m}$ . .....	41
<b>Figura 16.</b> Caixa de contagem de células sobre um campo de amostragem de células da CCG de <i>C. durissus</i> corado pela técnica de coloração de Nissl, destacando os critérios estereológicos para inclusão das células na contagem. Linhas verdes (superior e lateral direita) = linhas de inclusão; Linhas vermelhas (inferior e lateral esquerda) = linhas de exclusão. Os marcadores indicam as células da CCG incluídas na contagem. ....	42
<b>Figura 17.</b> Corte transversal do olho de <i>C. durissus</i> . A linha vermelha representa a distância posterior nodal (PND). Barra de escala: 1mm. ....	43
<b>Figura 18:</b> Boxplots mostrando as variações dos valores da área da retina e do diâmetro do olho de indivíduos adultos e filhotes de <i>B. jararaca</i> e de <i>C. durissus</i> . Os grupos que apresentaram diferenças significativas com base no teste U de Mann-Whitney, estão representados por um asterisco (*). O círculo representa o valor de <i>outlier</i> . ....	47
<b>Figura 19:</b> Densidade média e população total de fotorreceptores, bastonetes e cones totais nas retinas de <i>B. jararaca</i> adultas (●) e filhotes (◆), e de <i>C. durissus</i> adultas (■), jovens (⊗) e filhotes (▲). ....	54
<b>Figura 20:</b> Boxplots mostrando as variações de densidade média e de população de fotorreceptores, bastonetes e cones totais de indivíduos adultos e filhotes de <i>B. jararaca</i> e de <i>C. durissus</i> . Os grupos que apresentaram diferenças significativas com base no teste U de Mann-Whitney, estão representados por um asterisco (*). ....	56
<b>Figura 21:</b> Densidade média e população de cones S e de cones L/M de retinas de <i>B. jararaca</i> adultos (●) e filhotes (◆) e de <i>C. durissus</i> adultos (■), jovens (⊗), e filhotes (▲). ..	58
<b>Figura 22:</b> Boxplots mostrando as variações de densidade média e de população de cones S e cones L/M de indivíduos adultos e filhotes de <i>B. jararaca</i> e de <i>C. durissus</i> . Os grupos que apresentaram diferenças significativas com base no teste U de Mann-Whitney, estão representados por um asterisco (*). ....	59

**Figura 23:** Mapas de isodensidade de fotorreceptores totais, bastonetes e cones totais de retinas de *B. jararaca* adulta (Bjar180803-2) e filhote (Bjar191213-26). Os gradientes de cinza com tonalidades mais escuras representam as áreas com maior densidade. Barras de escala de cinza indicam densidade de células/mm<sup>2</sup>. Os discos brancos representam a posição do nervo óptico na retina. D, dorsal; T, temporal..... 61

**Figura 24:** Mapas de isodensidade de fotorreceptores totais, bastonetes e cones totais das retinas de *C. durissus* adulto (Cdurt181213-7), jovem (Cdurt181213-9) e filhote (Cdurt200124-21). Os gradientes de cinza com tonalidades mais escuras representam as áreas com maior densidade. Barras de escala de cinza indicam densidade de células/mm<sup>2</sup>. Os discos brancos representam a posição do nervo óptico na retina. D, dorsal; T, temporal..... 62

**Figura 25:** Mapas de distribuição de cones S em retinas de adultos e filhotes de *B. jararaca* (Bjar191213-29 e Bjar191213-30, respectivamente) e de *C. durissus* (Cdurt191213-17 e Cdurt191213-22, respectivamente). Os gradientes de cinza com tonalidades mais escuras representam as áreas com maior densidade de células. Barras de escala de cinza indicam densidade de células/mm<sup>2</sup>. Os círculos brancos representam a posição do nervo óptico na retina. D, dorsal; T, temporal..... 63

**Figura 26:** Mapas de distribuição de cones L/M em retinas de adultos e filhotes de *B. jararaca* (Bjar191213-29 e Bjar191213-30, respectivamente) e de *C. durissus* (Cdurt191213-17 e Cdurt191213-22, respectivamente). Os gradientes de cinza com tonalidades mais escuras representam as áreas com maior densidade de células. Barras de escala de cinza indicam densidade de células/mm<sup>2</sup>. Os círculos brancos representam a posição do nervo óptico na retina. D, dorsal; T, temporal..... 64

**Figura 27:** Densidade média e população de células da CCG nas retinas de *B. jararaca* adultos (●) e filhotes (◆) e de *C. durissus* adultos (■) e filhotes (▲). ..... 67

**Figura 28:** Boxplots mostrando as variações de densidade média e de população de células da CCG de indivíduos adultos e filhotes de *B. jararaca* e de *C. durissus*. Os grupos que apresentaram diferenças significativas com base no teste U de Mann-Whitney, estão representados por um asterisco (\*). O círculo representa o valor de *outlier*. ..... 67

**Figura 29:** Mapas de isodensidade das células da CCG de retinas de indivíduos adultos e filhotes de *B. jararaca* (Bjar180803-3 e Bjar190312-11, respectivamente) e de *C. durissus* (Cdurt180220-2 e Cdurt200124-25, respectivamente). Os gradientes de cinza com tonalidades mais escuras representam as áreas com maiores densidades de células. Barras de escala de cinza indicam a densidade de células/mm<sup>2</sup>. Os discos brancos representam a posição do nervo óptico na retina. D, dorsal; T, temporal..... 68

**Figura 30:** Corte transversal do olho de indivíduo adulto (A) e filhote (C) de *B. jararaca* e adulto (B) e filhote (D) de *C. durissus*. Barras de escala: 1 mm. .... 69

**Figura 31:** Boxplots mostrando as variações da acuidade visual estimadas com base no pico de densidade de células da camada de células ganglionares (CCG), considerando um arranjo quadrado (esquerda) ou um arranjo hexagonal (direita), em indivíduos adultos e filhotes de *B. jararaca* e de *C. durissus*. Os grupos que apresentaram diferenças significativas com base no teste U de Mann-Whitney estão representados por um asterisco (\*). cpg, ciclos por grau. 72

## Lista de Tabelas

Tabela 1 .....	39
Tabela 2 .....	40
Tabela 3 .....	45
Tabela 4 .....	46
Tabela 5 .....	47
Tabela 6 .....	48
Tabela 7 .....	53
Tabela 8 .....	55
Tabela 9 .....	57
Tabela 10 .....	58
Tabela 11 .....	65
Tabela 12 .....	66
Tabela 13 .....	67
Tabela 14 .....	69
Tabela 15 .....	71
Tabela 16 .....	71

## Sumário

Prefácio .....	18
1. Introdução .....	19
1.1. Subordem Serpentes .....	19
1.2. Família Viperidae .....	20
1.3. Estruturas Oculares e Morfologia da Retina .....	23
1.4. Fotorreceptores, fotopigmentos e o início do processamento visual .....	25
1.5. Células Ganglionares e o Poder de Resolução Espacial .....	28
1.6. Especializações da Retina .....	29
1.7. A Retina de Serpentes .....	33
2. Justificativa .....	35
3. Objetivos .....	36
3.1. Objetivo Geral .....	36
3.2. Objetivos Específicos .....	36
4. Material e Métodos .....	37
4.1. Procedimentos com os Animais .....	37
4.2. Imunohistoquímica para Marcação de Fotorreceptores .....	38
4.3. Técnica de coloração de Nissl para Marcação de Células Ganglionares ....	39
4.4. Análise da Densidade e Distribuição das Células da Retina .....	40
4.5. Estimativa da Acuidade Visual .....	43
4.6. Análises Estatísticas .....	44
5. Resultados .....	45
5.1. Dados das Serpentes Coletadas .....	45
5.2. População de Fotorreceptores .....	47
Bastonetes .....	49
Cones Totais .....	50
Cones S e Cones L/M .....	51

5.3	Topografia de Fotorreceptores .....	59
5.4.	Densidade e Topografia das Células da CCG.....	64
5.5.	Estimativa da Acuidade Visual.....	68
6.	Discussão .....	73
6.1.	Densidade e Topografia de Fotorreceptores .....	74
	<i>Densidade e Topografia de Cones S</i> .....	77
	<i>Densidade e Topografia de Cones L/M</i> .....	79
6.2.	Densidade e Topografia das Células da CCG .....	80
6.3.	Estimativa da Acuidade Visual.....	82
7.	Conclusões .....	84
8.	Referências Bibliográficas .....	86
9.	Anexo .....	101

## Prefácio

Nos vertebrados, o sistema visual é um dos principais sistemas sensoriais que mediam a interação do organismo com o ambiente, permitindo respostas rápidas para comportamentos vitais que garantem sua sobrevivência na natureza. Diferenças ecológicas e comportamentais entre as espécies podem refletir em adaptações visuais adequadas a cada nicho ocupado. Estas adaptações podem ser observadas em diferentes níveis, desde os genéticos, como substituições de aminoácidos que alteram a sensibilidade espectral dos fotopigmentos visuais, até em níveis morfológicos, incluindo os tipos e regiões de especializações da retina que apresentam maior densidade de neurônios específicos, favorecendo certas áreas do campo visual do animal. Desta maneira, é imprescindível o conhecimento sobre a plasticidade deste sistema atrelado às características ecológicas dos animais e sua história evolutiva, para compreender como a visão dos animais está adaptada a diferentes tarefas comportamentais.

Dentre os vertebrados, as serpentes formam um grupo altamente diverso e as espécies que compõem a família Viperidae, como a *Crotalus durissus* e a *Bothrops jararaca* despertam grande interesse para testar hipóteses acerca da sua ecologia visual, uma vez que estas serpentes exibem alta diversidade ecológica inter- e intraespecífica. Poucos são os estudos que investigam a morfologia de retinas íntegras de serpentes e a distribuição dos neurônios que compõem a organização deste tecido neural. Diante disso, esta dissertação contribui com importantes informações a partir de um estudo comparativo da densidade e distribuição de neurônios das retinas, e da acuidade visual de *B. jararaca* e *C. durissus* adultas e filhotes. Resultados inéditos sobre a plasticidade morfológica da retina destas serpentes revelaram que a distribuição de células acompanha as variações interespecíficas e ontogenéticas ecológicas e comportamentais adotadas por estes répteis.

## 1. Introdução

### 1.1. Subordem Serpentes

As serpentes apresentam como principais características morfológicas o alongamento do corpo e de órgãos internos, ausência de pálpebras móveis, de ouvido externo e de membros, bem como a presença de língua bifurcada e de corpo recoberto por escamas (Coates & Ruta, 2000; Lema, 2002; Melgarejo, 2003). As serpentes fazem parte da ordem Squamata, a mais diversa do grupo dos répteis (Uetz et al., 2020) e podem ser subdivididas nas superfamílias *Scolecophidia* e *Alethinophidia* (Vidal et al., 2007). O grupo *Scolecophidia* apresenta menor diversidade de espécies, é composto por serpentes fossoriais com olhos reduzidos, porte pequeno e corpo cilíndrico recoberto por escamas lisas (Kley, 2003; Vidal et al., 2007). O grupo *Alethinophidia* apresenta grande diversidade de espécies com adaptações aos mais variados habitats (Pough et al., 2003).

O grupo das serpentes, altamente diversificado e de grande sucesso evolutivo, se destaca por ocupar os mais diversos ambientes: terrícolas, arborícolas, subterrâneos e aquáticos (Cadle & Greene, 1993), com exceção de regiões polares, algumas ilhas e águas oceânicas mais profundas (Greene, 1992; Lillywhite & Henderson, 1993; Franco, 2003). Segundo Toft (1985), um dos principais fatores associados à ocupação destes diferentes nichos ecológicos é a dieta. Exclusivamente carnívoras, as serpentes podem se alimentar de uma ampla variedade de presas, como moluscos, artrópodes, peixes, anfíbios, aves, mamíferos, outros répteis e ovos (Greene, 1997). Diferentes artifícios são utilizados pelas serpentes para capturar suas presas, como a constrição muscular ou a inoculação de toxinas que são utilizadas tanto para imobilização, morte e digestão da presa, quanto para defesa contra predadores (Kardong, 1983; Mebs, 1999). As serpentes podem apresentar atividade predominantemente noturna ou diurna, entretanto, o padrão de atividade pode variar conforme a disponibilidade de alimento, os períodos do ciclo reprodutivo e a busca por locais para desovar ou parir (Salomão et al., 1995; Sazima, 1991; Marques & Sazima, 2003; Gibbons & Slemlitsch, 1987; Reinert, 1993).

A presença de secreções tóxicas pode estar associada a diferentes denticões que auxiliam na inoculação do veneno. Quatro tipos de denticões podem ser observadas em serpentes: áglifa, opistóglifa, proteróglifa e solenóglifa (Klemmer, 1968; Melgarejo, 2003; Vidal, 2002). As denticões proteróglifa e solenóglifa estão presentes em serpentes de famílias que possuem maior importância médica, uma vez que o veneno é altamente tóxico para os seres humanos (Frezzatti & Silveira, 2011; Warrel, 2004). Particularmente, a denticão solenóglifa está presente em

serpentes da família Viperidae e este tipo de dentição é composto por um par de presas caniculadas retráteis que se comunicam diretamente com a glândula de veneno (Greene, 1992). Em virtude deste mecanismo, serpentes desta família são capazes de inocular grande quantidade de veneno (Greene, 1992, 1997). As serpentes podem realizar caça ativa, na qual se locomovem em busca de suas presas em meio ao substrato (Bernarde & Kokobum, 2000; Sazima & Marques, 2007), ou realizam a caça por espreita que é comumente realizada pelas serpentes que compõem a família Viperidae (Cardoso, 2011; Sazima, 1992; Turci & Miranda, 2009).

## 1.2. Família Viperidae

A família Viperidae é subdividida em três subfamílias: Azemiopinae, Viperinae e Crotalinae (McDiarmid et al., 1999; Pyron et al., 2011). A subfamília Crotalinae é um grupo monofilético e apresenta como sinapomorfia a fosseta loreal, orifício localizado entre o olho e a narina, que consiste em um órgão termossensível (Figura 1) (Kraus, 1996). Os terminais das células presentes na fosseta loreal se projetam para o teto óptico no mesencéfalo. Desta forma, estas serpentes são capazes de combinar os sinais visuais aos sinais infravermelhos (Goris, 1995; Moiseenkova et al., 2003; Newman & Hartline, 1982). A capacidade de percepção de pequenas alterações de temperatura pela fosseta loreal, somado ao processamento das informações das moléculas odoríferas pelo órgão de Jacobson, situado no céu da boca, auxilia na detecção de presas independentemente das condições de luminosidade do ambiente (Franco, 2003; Van Dyke & Grace, 2010).



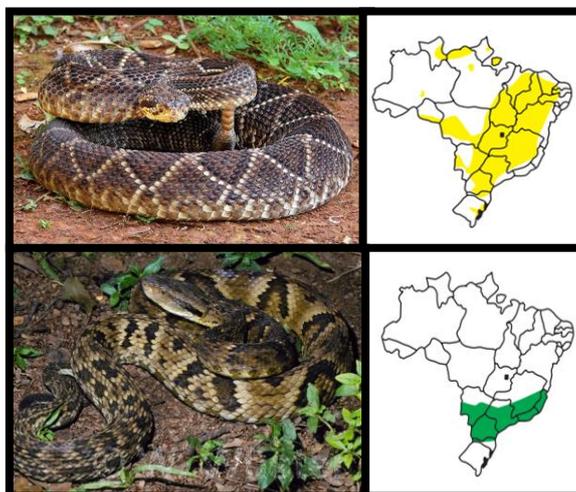
**Figura 1.** Fotografia da cabeça de *Bothrops jararaca*, com destaque para a fosseta loreal (seta vermelha).  
Foto: Otávio Marques

A subfamília Crotalinae possui 21 gêneros descritos, incluindo os gêneros *Crotalus* e *Bothrops* (Uetz et al., 2020). As espécies que compõem estes gêneros são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos no Brasil por conta da produção de peçonha altamente tóxica, elaborado mecanismo de inoculação de veneno e a ampla distribuição geográfica (Azevedo-Marques, 1992; Melgarejo, 2003; Warrel, 2004).

As serpentes do gênero *Crotalus* são popularmente conhecidas como cascavéis, e a principal característica que diferencia este gênero dos demais é a presença de um chocalho na ponta da cauda, que aumenta de tamanho a cada troca de pele e produz um som característico (Campbell & Lamar, 1989). Serpentes do gênero *Crotalus* são encontradas desde o Canadá até a América do Sul (Fitch, 1970), e no Brasil são representadas por apenas uma espécie: *Crotalus durissus* (França & Araújo, 2006). Esta espécie é subdividida em cinco subespécies encontradas em regiões semiáridas, áreas desmatadas, áreas abertas e/ou cerrados do Brasil (Figura 2): *C. d. cascavella*, no nordeste, *C. d. collilineatus*, nas regiões sudeste e centro-oeste, *C. d. ruruima*, nos cerrados do estado de Roraima, *C. d. marajoensis*, exclusiva da Ilha de Marajó, no norte do Brasil e *C. d. terrificus*, encontrada nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil (Bastos et al., 2005; Benicício & Martins, 2018; Fiorillo et al., 2020; Ferri, 1992; Freitas, 2003; Melgarejo, 2003; Vanzolini & Calleffo, 2002; Sawaya et al., 2008). Estas serpentes são pouco ágeis, possuem porte robusto e podem atingir até 160 cm (Melgarejo, 2003). São ativas durante todo o ano, mas os machos podem apresentar um pico de atividade entre abril e junho devido a temporada de acasalamento (Sawaya et al., 2008; Tozetti & Martins, 2013), são vivíparas e geram entre 6 e 22 filhotes (Melgarejo, 2003). Tanto indivíduos adultos quanto filhotes podem realizar caça por espreita (Tozetti, 2006) e a base de sua dieta é composta por pequenos roedores como *Cavia* sp, *Rattus* sp e *Mus* sp (Salomão et al., 1995). Apresentam hábito predominantemente crepuscular e noturno, são terrícolas (Ferri, 1992; Freitas, 2003; Sawaya et al., 2008) e tem como principais predadores as aves de rapina (Costa et al., 2014; Specht et al., 2008; Tozetti, 2006).

As serpentes do gênero *Bothrops* são popularmente conhecidas como jararacas, jararacuços e cotiaras, e podem ocupar ambientes de florestas tropicais decíduas, cerrados, florestas subtropicais de altitude, regiões cultivadas, áreas impactadas, áreas urbanas e algumas ilhas (Barbo et al., 2016; Cupo et al., 1990; Fiorillo et al., 2020a; Marques, 2010; Marques et al., 2012; Martins et al., 2002; Sazima, 1992). Além da diversidade com relação ao ambiente ocupado, as cerca de 40 espécies que compõem este gênero também apresentam uma grande variação com relação ao padrão de coloração, tamanho corporal e dieta (Uetz et al., 2020). A serpente *Bothrops jararaca* ocupa predominantemente áreas florestadas (Figura 2) (Marques &

Sazima, 2004; Ministério da Saúde, 2001). São vivíparas, e geram entre 12 e 18 filhotes que nascem em meio à estação chuvosa (Almeida-Santos, 2005; Marques & Sazima, 2001; Marques & Sazima, 2004; Sazima, 1992). Assim como as cascavéis, serpentes do gênero *Bothrops* tem como principais predadores as aves de rapina (Costa et al., 2014; Tozetti, 2006).



**Figura 2.** Distribuição geográfica de *C. durissus* (acima) e *B. jararaca* (abaixo) no Brasil. Fonte: Mapas modificados de “Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos” de Ministério da Saúde, 2001. P. 53. Fotos: *C. durissus* (Mário Sacramento); *B. jararaca* (Disponível em:<calphotos.berkeley.edu>).

Indivíduos da espécie *B. jararaca* apresentam variação ontogenética da dieta e de aspectos da ecologia comportamental, diferente de *C. durissus* (Andrade & Abe, 1999; Marques et al., 2001; Zelanis et al., 2010; Tozetti & Martins, 2008). Os indivíduos filhotes de *B. jararaca* ocupam predominantemente o estrato arborícola e predam animais ectotérmicos, como anfíbios anuros, que são atraídos pelo engodo caudal (Hartmann, 2005; Hartmann, Hartmann, & Giasson, 2003; Sazima, 1992; Sazima, 1991). Nesta fase da vida serpentes desta espécie apresentam a ponta da cauda com tonalidade amarelada ou esbranquiçada (Figura 3) (Sazima, 1992; Sazima, 2006) e realizam movimentos que remetem a larvas, com o objetivo de atrair os anuros que fazem parte da sua dieta, como *Hyla* sp., *Oloolygon fuscovarius* e *Physalaemus* sp. (Hartmann et al., 2003, 2009; Sazima, 1992). Na fase adulta, as serpentes *B. jararaca* perdem o engodo caudal, passam a ocupar o estrato terrestre e, ocasionalmente, o estrato arbóreo (Martins et al., 2001). Alterações substanciais também são observadas no padrão alimentar da espécie, que quando adultas predam roedores como *Nectomys* sp., *Rattus* sp., e *Bolomys* sp (Antunes et al., 2010; Sazima & Haddad, 1992; Sazima, 1992; Fiorillo et al., 2020a). Além disso, indivíduos adultos apresentam padrão de atividade predominantemente noturno (Fiorillo et al., 2020a; Martins et al., 2001), enquanto os filhotes podem estar ativos tanto à noite, quanto durante o dia (Hartmann, 2005; Hartmann, Hartmann & Giasson, 2003). Estas mudanças ontogenéticas dos itens alimentares de *B. jararaca* devem estar associadas com alterações da composição do veneno

(Antunes et al, 2010; Andrade & Abe, 1999), locais de forrageamento (Mushinsky, Hebrard, & Vodopich, 1982), demanda energética (Nagy, 2005), restrições fisiológicas e redução da competição trófica entre indivíduos filhotes e adultos (Hampton, 2014; Richard & Wainwright, 1995; Robinson et al., 2002).



**Figura 3.** Filhote de *B. jararaca* se alimentando de um anfíbio anuro. Nota-se a coloração da ponta da cauda mais clara em relação à coloração corporal.

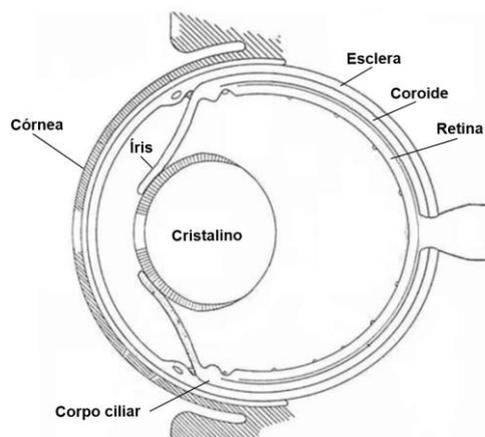
Fonte: [reptiledatabase.reptarium.cz/species?genus=Bothrops&species=jararaca](http://reptiledatabase.reptarium.cz/species?genus=Bothrops&species=jararaca)

A diversidade de habitats ocupados pelas diferentes espécies de serpentes Crotalinae, bem como as variações ontogenéticas da dieta, do comportamento e do ambiente ocupado, podem implicar em adaptações do sistema visual, e variações tanto interespecíficas quanto intraespecíficas. O sistema visual é um dos sistemas sensoriais mais importantes para a percepção do ambiente em situações que requerem respostas comportamentais rápidas, como a fuga de predadores, busca por abrigo, por alimento ou por parceiros para acasalamento (Yokoyama, 2002). Aspectos ecológicos e comportamentais adotados pelas espécies de serpentes em diferentes fases da vida implicam em diferentes demandas do sistema visual, o que pode resultar em variações morfológicas nas estruturas que compõem este sistema sensorial.

### 1.3. Estruturas Oculares e Morfologia da Retina

O sistema visual dos animais é responsável por captar e processar as informações luminosas do ambiente (Hargrave & McDowell, 1992). Os olhos dos vertebrados apresentam uma série de homologias, e são formados por três camadas de tecido organizadas de forma concêntrica (Figura 4). A esclera é a camada mais externa, formada por um tecido rígido e fibroso, composto principalmente por fibras colágenas, que fornece sustentação e proteção mecânica ao olho. A córnea consiste em uma lente transparente localizada na parte anterior do olho que permite a passagem da luz. A camada média ou úvea é formada pela íris, corpo ciliar e coroide. A retina, camada mais interna do olho, é um fino tecido neural que faz parte do

sistema nervoso central, e é formada por uma rede de células nervosas e gliais que captam e processam a energia contida nos fótons (Ramón y Cajal, 1983). Em serpentes, as principais variações das estruturas oculares estão associadas ao formato da pupila, diversidade de células da retina, e ao tamanho relativo do cristalino (Walls, 1942).

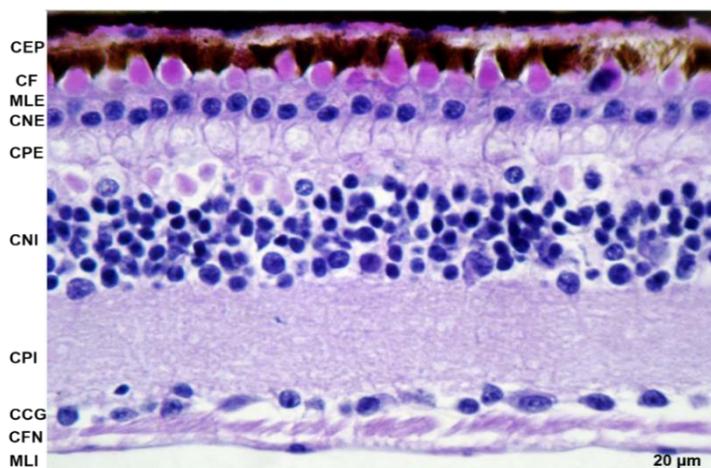


**Figura 4.** Representação esquemática de corte transversal do olho de serpente.

Fonte: Modificado de “The vertebrate eye and its adaptive radiation” de G. L. Walls, 1942, doi.org/10.5962/bhl.title.7369.

A retina dos vertebrados é dividida em dez camadas bem definidas compostas por núcleos celulares, plexos nervosos e membranas limitantes (Figura 5). Da região mais externa, em contato com a coróide, para a região mais interna, em contato com o humor vítreo, pode-se listar: 1. Camada do epitélio pigmentado (CEP), formada por células epiteliais contendo grânulos de pigmentos responsáveis por uma série de funções fisiológicas vitais para a retina, incluindo o aporte de oxigênio, de nutrientes e a ciclagem do cromóforo (Kolb et al., 2013); 2. Camada dos fotorreceptores (CF), com os segmentos externos e internos dos cones e bastonetes; 3. Membrana limitante externa (MLE), formada pelos prolongamentos das células de Müller; 4. Camada nuclear externa (CNE), com os núcleos dos fotorreceptores; 5. Camada plexiforme externa (CPE), com os axônios dos cones e dos bastonetes, e os dendritos das células horizontais e bipolares; 6. Camada nuclear interna (CNI), com os corpos das células horizontais, bipolares, amácrinas e de Müller; 7. Camada plexiforme interna (CPI), que contém os axônios das células amácrinas e bipolares e dendritos das células ganglionares; 8. Camada de células ganglionares (CCG), com diferentes subpopulações de células ganglionares, incluindo as células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis (ipRGCs), além de uma população de células amácrinas deslocadas; 9. Camada de fibras nervosas (CFN), formada pelos axônios das células ganglionares que se unem para formar o nervo óptico e se projeta para os centros superiores de processamento visual; 10. Membrana limitante interna (MLI), formada pelos prolongamentos das células de Müller. As células de Müller possuem uma variedade de funções importantes

para os neurônios da retina, como fornecimento de nutrientes, eliminação de resíduos neurais, reciclagem de aminoácidos, proteção contra excesso de neurotransmissores, síntese de ácido retinoico e controle homeostático (Cormack, 2003; Kolb, 2013).

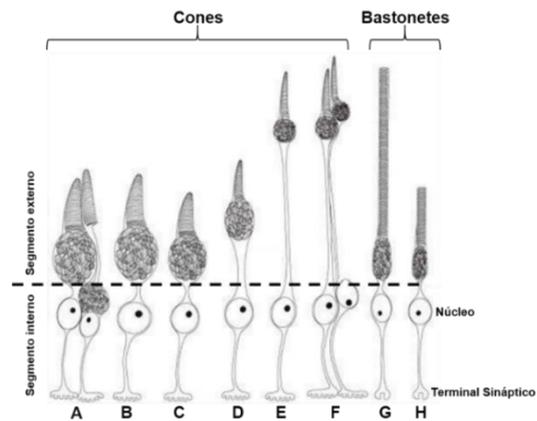


**Figura 5.** Corte histológico de retina da serpente *Philodryas olfersii* corado com hematoxilina-eosina com as dez camadas características da retina dos vertebrados. CEP, camada do epitélio pigmentado; CF, camada dos fotorreceptores; MLE, membrana limitante externa; CNE, camada nuclear externa; CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CCG, camada de células ganglionares; CFN, camada de fibras nervosas; MLI, membrana limitante interna.

Fonte: Modificado de “Comparative study of photoreceptor and retinal ganglion cell topography and spatial resolving power in dipsadidae snakes” de E. Hauzman et al., 2014, *Brain, Behavior and Evolution*, p. 197-213. doi: 10.1159/000365275.

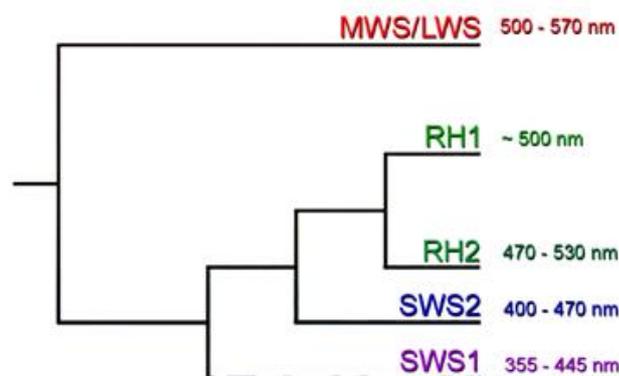
#### 1.4. Fotorreceptores, fotopigmentos e o início do processamento visual

O processamento visual na retina dos vertebrados se inicia a partir da captação da energia luminosa pelos fotorreceptores da retina externa, que podem ser classificados em cones ou bastonetes. Os bastonetes são células mais sensíveis a luz e atuam na visão em condições de baixa luminosidade, escotópica. Os cones são células menos sensíveis à luz, atuam predominantemente na visão diurna, fotópica, são responsáveis por uma maior acuidade visual e pela visão de cores diurna (Bowmaker, 1991; Lamb, 2013; Joselevitch, 2008). Cones e bastonetes apresentam quatro regiões distintas: segmento externo, segmento interno, núcleo e terminal sináptico (Figura 6) (Ramón y Cajal, 1983). O terminal sináptico (Figura 6) é responsável pela transmissão da informação do sinal luminoso para células horizontais e bipolares, via liberação de neurotransmissores na camada plexiforme externa (Ali & Klyne, 1985). O segmento interno (Figura 6) contém as organelas citoplasmáticas e o elipsoide, região próxima à base do segmento externo que possui grande quantidade de mitocôndrias (Bowmaker, 1991). O segmento externo é formado por discos membranosos empilhados, onde estão inseridos os fotopigmentos visuais (Figura 6) (Bowmaker, 1991).



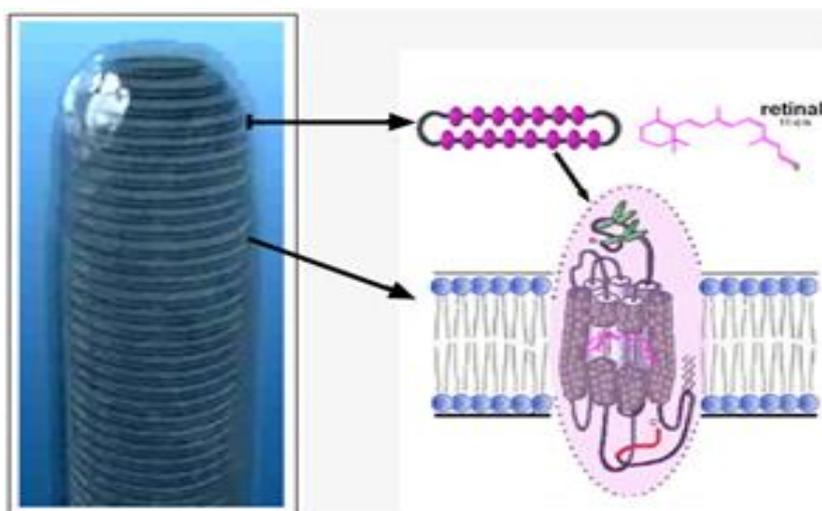
**Figura 6.** Representação morfológica das estruturas dos fotorreceptores de serpentes. A, F: cones duplos; B, E: cones simples grandes; C, D: cones simples pequenos; G: bastonete longo e H: bastonete curto. Fonte: Modificado de “Conquering the cold shudder: the origin and evolution of snakes eyes” de C. L. Caprette, 2005.

Diferentes tipos de fotorreceptores visuais estão presentes em classes distintas de fotorreceptores, e são responsáveis pela captação de fótons com determinados comprimentos de onda, variando dentro de uma faixa espectral de 300 nm a 700 nm (Bowmaker, 1991). Os pigmentos visuais e seu pico de sensibilidade espectral variam entre as espécies e geralmente estão associados aos ambientes ocupados (Bowmaker, 1991). Em vertebrados, cinco classes de pigmentos visuais são codificados por diferentes genes de opsinas: *sws1*, *sws2*, *rh1*, *rh2*, e *lws/mws* (Yokoyama, 2000; Yokoyama, 1997; Yokoyama & Yokoyama, 1996) (Figura 7). A presença de mais de um tipo de cone na retina, cada um contendo fotorreceptor visual específico sensível a determinada faixa de comprimentos de onda, somado a uma rede neural de processamento pós-receptor que possibilita a comparação dos sinais gerados pelos fotorreceptores, e que se estende da retina até o sistema de processamento superior, no cérebro, resulta na sensação de cor (Bowmaker, 1991).



**Figura 7.** Representação esquemática da relação filogenética entre as opsinas de vertebrados e suas faixas de sensibilidade espectral. A opsina sensível a comprimento de onda longo/médio (LWS/MWS) é a mais antiga, seguido das opsinas sensíveis a comprimentos de onda curtos do ultravioleta (SWS1) ao violeta (SWS2) e das opsinas RH2 e RH1, sensíveis a comprimentos de onda médios, sendo esta última a mais recente na escala evolutiva. Fonte: Modificado de “Visual pigments in a living area, the Australian lungfish *Neoceratodus forsteri*” de H. J. Bailes et al., 2007, BMC Evolutionary Biology, p 7.

Os fotopigmentos são formados por uma porção proteica, a opsina ou rodopsina, que é um receptor de membrana da família dos receptores acoplados à proteína G, ligado covalentemente a um cromóforo retinal, derivado da vitamina A (Strader et al., 1994; Yokoyama & Starmer, 1996). Ao absorver um fóton, o retinal sofre isomerização da forma 11-*cis* para a forma *all-trans* retinal, e com isso a opsina adquire sua forma ativada (Figura 8) (McBee et al., 2001; Hargrave & McDowell, 1992). A ativação da proteína desencadeia uma série de reações enzimáticas no fotorreceptor, que resulta na redução da concentração citoplasmática do monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), levando ao fechamento de canais de membrana da célula, a consequente diminuição do influxo de íons e a hiperpolarização da membrana do fotorreceptor. Esta alteração da polaridade induz uma queda na liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, de forma que o sinal gerado por estes neurônios de primeira ordem é então transmitido para os neurônios de segunda ordem, na camada nuclear interna. O sinal visual segue sendo transmitido verticalmente pela retina, através das células bipolares, para a camada de células ganglionares, cujos axônios conduzem a informação através do trato retino-hipotalâmico aos centros superiores de processamento visual. Modulações laterais da transmissão dos sinais ocorrem por meio das células horizontais, localizadas no extremo distal da CNI, próximas à camada plexiforme externa, e das células amácrinas, localizadas na porção proximal da CNI, próximas à camada plexiforme interna (Bowmaker, 1991; Kawamura, 1993).



**Figura 8.** Representação esquemática do segmento externo de um bastonete (à esquerda) e opsinas (magenta) acopladas aos seus discos membranosos bilipídicos (abaixo e à direita). Cada opsina é formada por uma proteína transmembrânica e um cromóforo, o retinal.

Fonte: De “The organization of the retina” de H. Kolb, Fernandez, & Nelson, 2013, <http://webvision.org.es/wp-content/uploads/2014/06/rhodop12.jpg>.

### 1.5. Células Ganglionares e o Poder de Resolução Espacial

Diferentes tipos de células ganglionares são responsáveis pelo processamento de componentes da cena visual, como por exemplo, variações de brilho, de matiz, de forma e tamanho dos objetos, além de aspectos do movimento, como direção e velocidade (Kolb et al., 2013; Nelson, 2013). Uma pequena subpopulação de células ganglionares são intrinsecamente fotossensíveis, as ipRGCs (*intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*), devido a presença do fotopigmento melanopsina, e estão envolvidas no processamento de informação luminosa para gerar uma série de respostas à luz, como controle do ritmo circadiano, reflexo pupilar (Berson et al., 2002), e também participam nas vias de processamento visual, incluindo a percepção de cores (Lucas et al., 2020).

Com a utilização da técnica de coloração de Golgi, Ramón y Cajal (1983) classificou uma grande variedade de células ganglionares de alguns vertebrados, como sapos e cães, com base na sua morfologia, extensão do corpo da célula e pelo tamanho e estratificação da árvore dendrítica na camada plexiforme interna (Ramón y Cajal, 1983 apud Kolb et al., 2013). Em primatas, as variações morfofisiológicas de células ganglionares são bem conhecidas, assim como as vias de processamento da informação visual. Os axônios das células ganglionares se projetam para o núcleo geniculado lateral (NGL) que por sua vez, é composto por seis camadas que dão origem a três vias principais de processamento visual denominadas magnocelular, parvocelular e koniocelular (Hendry & Yoshioka, 1994). Células ganglionares pequenas (*midget*) estão conectadas à via parvocelular e apresentam baixa sensibilidade ao contraste e ao movimento, o que resulta em respostas lentas e de longa duração. Atuam na visão de cores pela otonância vermelho e verde através dos cones L e M e possuem alta resolução espacial devido ao menor tamanho do seu campo receptivo em relação aos campos receptivos magnocelulares (Livingstone & Hubel, 1987). As células ganglionares grandes (*parasol*) se conectam à via magnocelular e atuam a partir de respostas fásicas. Estas células geram respostas rápidas a estímulos de alta frequência temporal, sendo sensíveis ao movimento e ao contraste de luminância em baixas frequências espaciais. Entretanto, apresentam campos receptivos grandes, que geram baixa resolução espacial (Kolb et al., 2013; Dacey et al., 2003). Já as células ganglionares biestratificadas conectam-se à via koniocelular e possuem moderada resolução espacial, alta resolução ao estímulo em movimento e velocidade de condução intermediária. Seus campos receptivos recebem informações dos cones S, com a característica de otonância azul/amarelo (Van Essen, 1992).

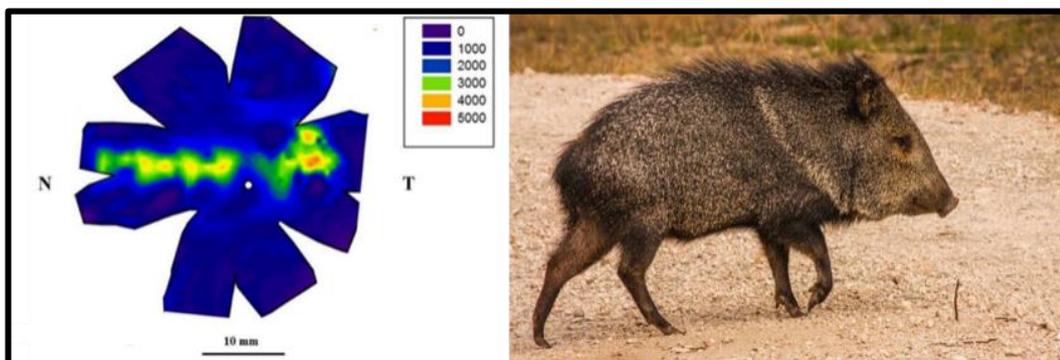
O número de fotorreceptores geralmente é muito maior em relação aos de células ganglionares da retina. Deste modo, existe uma convergência da camada de fotorreceptores para as células ganglionares, e como consequência, as células ganglionares recebem informações resultantes da somação espacial dos fotorreceptores via sinais transmitidos verticalmente pelas células bipolares, e modulados lateralmente pelas células horizontais e amácrinas (Joselevitch, 2008; Kaplan et al., 1990). As células ganglionares transmitem as informações das vias visuais por longas distâncias por meio de potenciais de ação, até os centros visuais no cérebro, onde as informações são retransmitidas e integradas com outros canais de processamento de informações (Joselevitch, 2008; Masland & Howard, 2001). Desta forma, a densidade de células ganglionares é um fator limitante para o poder de resolução espacial do olho. Diversos estudos demonstraram que a capacidade de resolução espacial pode ser estimada a partir da distância focal do olho e do pico de densidade das células ganglionares (Coimbra et al., 2012; Coimbra et al., 2009; Coimbra et al., 2006; Collin, 2008; Fernández-Juricic et al., 2011; Hart, 2012; Coimbra et al., 2012; Hauzman et al., 2014). Mesmo com a presença de diferentes subpopulações de células ganglionares na retina, nem todas envolvidas no processamento da resolução espacial, a comparação das estimativas da acuidade visual obtidas a partir de dados anatômicos se mostra consistente com os valores obtidos a partir de medidas eletrofisiológicas e comportamentais para muitas espécies de vertebrados (Arrese et al., 2000; Hemmi & Mark, 1998; Reymond, 1987).

### **1.6. Especializações da Retina**

Geralmente a distribuição das células da retina não é homogênea e apresenta regiões específicas de maior densidade celular, as chamadas áreas de especializações (Hughes, 1977). As especializações têm importantes implicações funcionais, uma vez que podem estar alinhadas com determinados componentes da cena visual, e aspectos específicos do ambiente ocupado pelas espécies, e devem auxiliar, por exemplo, na identificação de predadores ou de presas em certas áreas do campo visual (Moore et al., 2017; Fernández-Juricic et al., 2011).

Diferentes especializações da retina foram descritas para um grande número de vertebrados. A **faixa visual** (Figura 9) é uma especialização caracterizada por uma área alongada de maior densidade de células que pode se estender ao longo do eixo vertical ou mais comumente, ao longo do eixo horizontal da retina (Brown, 1969; Fernández-Juricic et al., 2011; Hughes, 1977). Em geral, esta especialização pode ser observada em animais que ocupam ambientes de campo aberto, sem obstrução do campo visual pela vegetação, de forma que a faixa visual fica alinhada com a linha do horizonte, como observado no porco-do-mato (*Pecari*

*tajacu*) (Costa et al., 2020) (Figura 9), ou em animais que habitam intermediações entre terra e água, como a tartaruga-de-orelha-vermelha (*Trachemys scripta elegans*) (Grötzner et al., 2019). A faixa horizontal permite, portanto, uma visão panorâmica do ambiente sem a necessidade da movimentação da cabeça (Lisney et al., 2013).



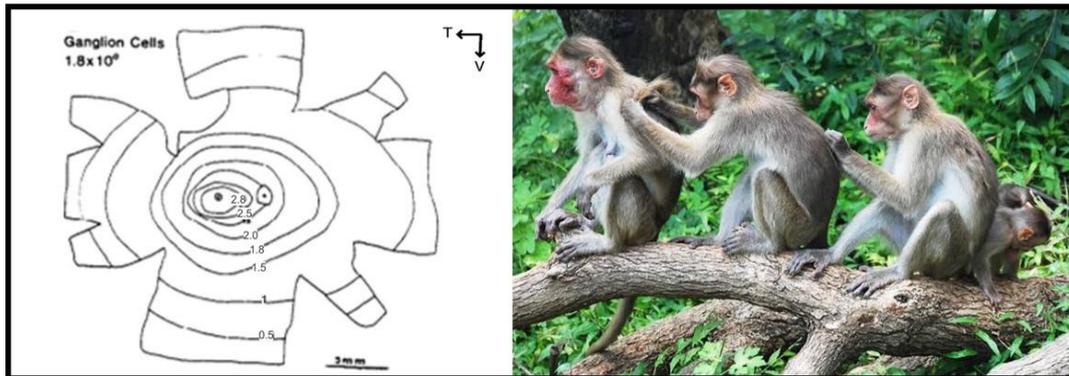
**Figura 9.** À esquerda, mapa topográfico de células da CCG da retina do porco-do-mato (*Pecari tajacu*). Observa-se uma faixa visual horizontal formada por uma alta densidade celular. O disco branco representa a posição do nervo óptico na retina. N, nasal; T, temporal.

Fonte: “Ganglion cells and displaced amacrine cells density in the retina of the collared peccary (*Pecari tajacu*)” de Costa et al., 2020, PLOS One, p. 11.

À direita, porco-do-mato *Pecari tajacu* em um ambiente de campo aberto.

Fonte: [www.flickr.com/30rea30/atthewall/31949192570](http://www.flickr.com/30rea30/atthewall/31949192570).

Uma segunda especialização é a *area centralis*, que consiste em uma região de maior densidade de células disposta de forma concêntrica, e apesar da sua nomenclatura, esta especialização pode estar posicionada em diferentes locais além da retina central, incluindo na região temporal, nasal, ventral ou dorsal (Figura 10) (Collin, 1999; Ito & Murakami, 1984; Mass & Supin, 2003). A *area centralis* pode apresentar funções distintas dependendo da composição de neurônios e sua localização na retina, como para detectar objetos em movimento ou estáticos, próximos ou distantes, além de contribuir para a identificação em maior resolução de um objeto de interesse no campo de visão (Fukuda & Stone, 1974; Rowe & Stone, 1980; Tyrrell et al., 2015). Esta especialização pode ser encontrada frequentemente em espécies arborícolas que ocupam ambientes florestados como o macaco-rhesus (*Macaca mulatta*) (Figura 10) (Perry & Cowey, 1985). Entretanto, alguns animais terrícolas também podem apresentar uma *area centralis*, como foi observado na serpente parelheira (*Philodryas patagoniensis*) (Hauzman et al., 2014).



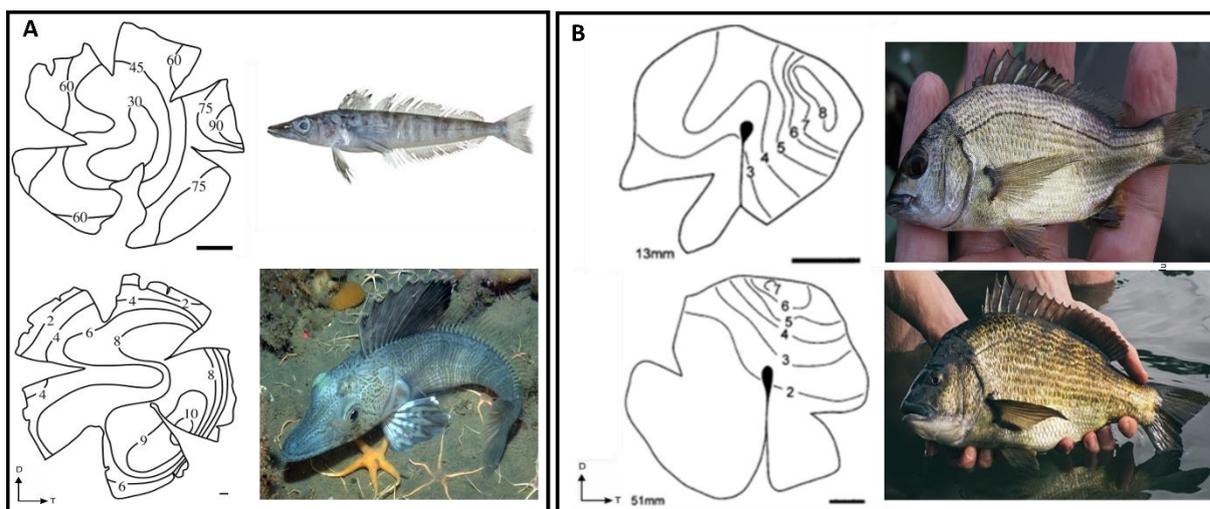
**Figura 10.** À esquerda, mapa de linhas das células da CCG da retina do macaco-rhesus (*Macaca mulatta*) com as linhas delimitando a sua distribuição de forma concêntrica com maior densidade caracterizada por uma *area centralis* na região central da retina. T, temporal; V, ventral.

Fonte: De “The ganglion cell and cone distributions in the monkey’s retina: Implications for central magnification factors” de H. V. Perry & A. Cowey, 1985, Vision Research, p. 1797.

À direita, macaco-rhesus (*Macaca mulatta*) em um ambiente florestado.

Fonte: [www.treknature.com/gallery/photo244941.htm](http://www.treknature.com/gallery/photo244941.htm).

Variações ontogenéticas da região de localização da *area centralis* foram descritas nos peixes *Champscephalus gunnari* e *Acanthopagrus butcheri*, e parecem estar associadas a mudanças no uso do ambiente e comportamento ao longo da vida dos animais (Figura 11) (Miyazaki et al., 2011; Shand et al., 2000). Em jovens de *C. gunnari* a *area centralis* está localizada na retina temporal, entretanto, em indivíduos adultos, esta especialização é deslocada para a porção ventro-temporal da retina (Figura 11A). Estas variações podem favorecer o campo de visão para a observação de presas e predadores em diferentes locais do ambiente aquático ocupados por jovens e adultos. Durante os primeiros anos de vida estes peixes ocupam as águas rasas do ambiente pelágico e a *area* temporal pode favorecer o campo de visão frontal para a observação das suas presas. Ao longo de seu desenvolvimento, a mudança na região de maior densidade de células na retina deve favorecer o campo de visão frontal e superior, e beneficiar a captura de presas maiores no ambiente bentônico ocupado por adultos (Miyazaki et al., 2011). De maneira semelhante, filhotes de *A. butcheri* se alimentam de plânctons na superfície da água e apresentam uma *area centralis* na região temporal ou dorso-temporal na retina, enquanto na fase adulta, passam a se alimentar de presas maiores que ocupam predominantemente o fundo do ambiente aquático, e nesta fase da vida a *area centralis* é deslocada para a região dorsal da retina (Figura 11A) (Shand et al., 2000).



**Figura 11.** Mapas topográficos de células da CCG das retinas do peixe *C. gunnari* (A) e *A. butcheri* (B) com o deslocamento da *area* em relação a variação ontogenética ecológica e comportamental. A. Acima: *area* localizada na retina temporal de indivíduos jovens de *C. gunnari*. Abaixo, *area* localizada na região ventral-temporal da retina em indivíduos adultos de *C. gunnari*. Barras de escala: 1mm. Fonte: De “The position of the retinal *area centralis* changes with age in *Champscephalus gunnari* (Channichthyidae), a predatory fish from coastal Antarctic waters” de T. Miyazaki et al., 2011, *Polar Biology*, p. 1117-1123. Fonte das imagens: Filhote: disponível em: [fishesofaustralia.net.au/home/species/4878](http://fishesofaustralia.net.au/home/species/4878); Adulto: disponível em: [fishesofaustralia.net.au/Images/Image/ChampscephalusGunnariJulianGutt.jpg](http://fishesofaustralia.net.au/Images/Image/ChampscephalusGunnariJulianGutt.jpg)

B. Acima: *area* localizada na região dorso-temporal da retina de indivíduos filhotes de *A. butcheri*. Abaixo, *area* localizada na retina dorsal de indivíduos adultos de *A. butcheri*. O disco preto representa a posição do nervo óptico na retina. Fonte: De “Variability in the Location of the Retinal Ganglion Cell Area Centralis Is Correlated with Ontogenetic Changes in Feeding Behavior in the Black Bream, *Acanthopagrus butcheri* (Sparidae, Teleostei)” de J. Shand et al., 2000, *Brain Behavior and Evolution*, p. 187-187.

Fonte das imagens, Filhote: disponível em [rivers.dwer.wa.gov.au/species/acanthopagrus-butcheri/](http://rivers.dwer.wa.gov.au/species/acanthopagrus-butcheri/). Adulto: disponível em: Fishes of Australia. Densidade = 100x cells/mm<sup>2</sup>. D, dorsal; T, temporal.

Alguns animais possuem uma terceira especialização, a **fóvea** (Walls, 1942), que se caracteriza por uma invaginação profunda da retina (Figura 12), com o deslocamento lateral das camadas internas, inclusive das células ganglionares, para favorecer o acesso da luz diretamente aos fotorreceptores (Walls, 1942). Geralmente esta especialização se localiza no interior de uma *area*. Diferentes tipos de fóveas são encontradas nas retinas de primatas (Bringmann et al., 2018; Perry & Cowey, 1985), aves (Potier et al., 2017), lagartos (Barbour et al., 2002; Mathges et al., 2020; Sannan et al., 2018), e alguns peixes (Easter, 1992; Litherland et al., 2009; Locket, 1985).



**Figura 12.** Corte histológico corado com hematoxilina-eosina destacando a fóvea da retina da ave *Halcyon sancta*. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

Fonte: De “Some observations on the visual optics of kingfishes (Aves, Caraciformes, Alcedinidae)” de M. K. Moroney & J. D. Pettigrew, 1987, *J. Comp. Physiol.*, p. 140.

## 1.7. A Retina de Serpentes

As serpentes apresentam inúmeras adaptações do sistema visual, relacionadas com a ecologia e aspectos comportamentais das espécies. A diversidade de ambientes ocupados, dieta, estratégias de caça e os padrões de ritmo circadiano podem refletir diferentes adaptações do sistema visual, tanto na anatomia externa do olho: sua forma, tamanho, posicionamento e tipo de pupila (Brischoux et al., 2010; Malmstrom, 2006; Scartozzoni, 2005), quanto na morfologia de estruturas mais internas, como na retina, que apresenta grande variabilidade dos tipos de fotorreceptores, e no pico de sensibilidade espectral de suas opsinas (Walls, 1942; Underwood, 1967; Caprette et al., 2004; Davies et al., 2009; Gower et al., 2019; Hauzman, 2020; Hauzman et al., 2017; 2019; Katti et al., 2019; Schott et al., 2016; Sillman et al., 1997, 1999, 2001; Simões et al., 2015, 2016; Bittencourt et al., 2019), e na densidade e distribuição dos neurônios (Wong, 1989; Hart et al., 2012; Hauzman et al., 2014).

A retina da maioria dos vertebrados possui fotorreceptores do tipo cone e bastonete, sendo esta denominada “retina duplex”. Entretanto, as serpentes podem apresentar diferentes configurações com relação aos tipos de fotorreceptores, e essa variação está relacionada com padrão de atividade diária e história evolutiva das espécies (para revisão ver Hauzman, 2020). Nas retinas de serpentes noturnas, a grande maioria dos fotorreceptores são bastonetes, somados a duas ou três classes morfológicas de cones (Hauzman et al., 2017; Hauzman et al., 2014; Sillman et al., 1999; Underwood, 1968; Sillman et al., 2001). Por outro lado, em espécies diurnas do grupo Caenophidia foram descritas retinas de apenas cones (Caprette et al., 2004; Hart et al., 2012; Hauzman et al., 2014, 2017; Schott et al., 2016; Sillman et al., 1997; Walls, 1942).

As diferentes classes morfológicas de fotorreceptores da retina externa estão associadas aos fotopigmentos sensíveis a diferentes comprimentos de onda. Três genes de pigmentos visuais são expressos em fotorreceptores de serpentes: *rh1*, *sws1* e *lws* (Bhattacharyya et al., 2017; Bittencourt et al., 2019; Davies et al., 2009; Gower et al., 2019; Hart et al., 2012; Hauzman, 2020; Hauzman et al., 2014, 2017; Simões et al., 2016). O gene *rh1* é geralmente expresso em bastonetes e tem a rodopsina como fotopigmento visual, com pico de absorção espectral ( $\lambda_{\max}$ ) em cerca de 500 nm. Os genes *sws1* e *lws* são geralmente expressos em cones e traduzem respectivamente, opsinas sensíveis a comprimentos de onda curtos, do ultravioleta (UV) ao violeta, com  $\lambda_{\max}$  entre 360 nm e 440 nm, e opsinas sensíveis a comprimentos de onda médios e longos, na faixa do verde e amarelo, com  $\lambda_{\max}$  entre 510 nm e 560 nm (Yokoyama, 2008). A perda dos genes *rh2* e *sws2* nas serpentes ancestrais deve estar associada ao hábito

predominantemente noturno e/ou fossorial (Davies et al., 2009; Emerling, 2017; Hauzman, 2020; Schott et al., 2016; Schott et al., 2018; Simões et al., 2015).

Em serpentes da família Viperidae, *B. jararaca* e *C. d. terrificus*, as retinas apresentam predominância de bastonetes, com o fotopigmento RH1, além de três grupos de cones, cones simples pequenos, com o fotopigmento SWS1, e  $\lambda_{\max}$  estimado na faixa do UV (~360 nm), e dois grupos de cones, simples e duplos, com o fotopigmento LWS e  $\lambda_{\max}$  estimado em ~555 nm (Bittencourt et al., 2019). Gower e colaboradores (2019) analisaram a morfologia da retina das serpentes viperídeas *C. durissus* e *Echis coloratus*, a partir de montagens planas de metade de uma retina de cada espécie. Foi observado que ambas as espécies apresentam alta densidade de bastonetes, e dois grupos de cones marcados com diferentes anticorpos anti-opsinas, cones UV e cones L/M.

Os estudos conduzidos até o momento demonstram que as especializações das retinas, os tipos de fotorreceptores e os picos de sensibilidade espectral das opsinas, apresentam grande variação em serpentes, e podem estar associados a caracteres ecológicos e comportamentais das espécies. Poucos estudos foram realizados a respeito da densidade e topografia de células da retina de serpentes (Wong, 1989; Hart et al., 2012; Hauzman et al., 2014, 2018), e nenhum estudo descrito na literatura abordou estes aspectos morfológicos em retinas íntegras de serpentes da família Viperidae. Liu e colaboradores (2012) descreveram a relação entre a anatomia dos olhos e a diversidade ecológica de serpentes colubrídeas, como o uso de habitat e padrão de atividade. Neste estudo foi sugerido que serpentes arborícolas diurnas estão expostas a predadores que podem surgir de todas as direções e, por esta razão, apresentam olhos maiores em comparação com serpentes terrestres e semiaquáticas, mais sujeitas a predação vinda de cima. Estes dados corroboram os achados do estudo comparativo de distribuição de células em retinas de serpentes colubrídeas diurnas do gênero *Philodryas*, que apresentaram divergências nos tipos de especializações da retina, refletindo os diferentes habitats ocupados. A retina da espécie arborícola *Philodryas olfersii* apresenta uma faixa visual, que pode estar relacionada com a locomoção e forrageamento no ambiente arbóreo e a visualização de potenciais predadores localizados no mesmo nível da serpente. Por outro lado, na espécie terrícola, *Philodryas patagoniensis*, uma *area centralis* localizada na retina ventral deve estar associada com a visualização de predadores vindos de cima (Hauzman et al., 2014). Estes poucos estudos demonstram como aspectos morfológicos das retinas estão associados com diferentes aspectos ecológicos e comportamentais das serpentes, e apontam para a necessidade de mais estudos para abranger a riqueza de espécies do grupo.

## 2. Justificativa

Alguns estudos apontaram que aspectos ecológicos e comportamentais das serpentes, como o padrão de ritmo circadiano, o uso preferencial de habitat, os itens alimentares e as estratégias de forrageamento, podem estar associados com diferenças nas estruturas das retinas das espécies (Hart et al., 2012; Hauzman, 2020; Hauzman et al., 2014, 2018). Estes estudos sugeriram que alguns caracteres ecológicos estão associados com a plasticidade adaptativa do sistema visual. Entretanto, nenhum estudo investigou a possibilidade de variações morfológicas das retinas no aspecto ontogenético em serpentes.

Análises morfológicas das retinas fornecem informações valiosas sobre a história natural das espécies, e possíveis adaptações do sistema visual ao uso do ambiente. Diferenças nos habitats ocupados pelas serpentes *B. jararaca* e *C. durissus* podem implicar em diferenças do sistema visual, como na distribuição de células da retina e na acuidade visual. A presença de mudanças ontogenéticas na dieta e no uso do ambiente em *B. jararaca*, e a ausência destas variações em *C. durissus* ao longo da vida, fazem destas duas espécies de crotalíneos, excelentes modelos para testar hipóteses de correlação entre as estruturas da retina e caracteres ecológicos. Desta forma, com base em estudos anteriores da morfologia em retinas de serpentes e acuidade visual, neste trabalho, espera-se encontrar diferenças quanto as especializações das retinas nas duas espécies, bem como entre indivíduos adultos e filhotes de *B. jararaca*. Nenhum estudo na literatura comparou a densidade e distribuição de células em retina íntegras de serpentes viperídeas, e tampouco estimou sua acuidade visual.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo Geral

Comparar a densidade e distribuição de células nas retinas das serpentes *B. jararaca* e *C. durissus* e relacionar com seus aspectos ecológicos e comportamentais.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Comparar a densidade e a topografia dos fotorreceptores da retina externa: cones SWS1, cones LWS e bastonetes (RH1), de retinas íntegras de indivíduos adultos e filhotes das serpentes *B. jararaca* e *C. durissus*.
- Comparar a densidade e a topografia de células da camada de células ganglionares (CCG) de retinas de indivíduos adultos e filhotes das serpentes *B. jararaca* e *C. durissus*.
- Estimar o poder de resolução espacial dos olhos, com base no pico de densidade de células da CCG e na distância focal do olho, de indivíduos adultos e filhotes das serpentes *B. jararaca* e *C. durissus*.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Procedimentos com os Animais

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (CEUA-IP nº 1805090417) (Anexo 1). Serpentes adultas e filhotes das espécies *B. jararaca* e *C. durissus* ( $n_{\text{total}} = 50$ ) foram obtidas junto à Recepção de Animais do Instituto Butantan. A eutanásia das serpentes foi realizada com dose letal do anestésico Thionembatal (princípio ativo tiobarbiturato etil sódico, dosagem 100 mg/kg). Para cada indivíduo coletado o sexo foi identificado e foram tomadas medidas de massa, comprimento rostro-cloacal (CRC) e comprimento caudal (CC).

A fase de desenvolvimento dos indivíduos de *B. jararaca* foi classificada a partir dos dados morfométricos de CRC, conforme os critérios sugeridos por Moraes (2008). A utilização do ambiente arborícola por indivíduos filhotes desta espécie está associada com a ingestão de animais ectotérmicos que são atraídos pelo engodo caudal (Sazima, 1991). Desta forma, para a observação das possíveis variações morfológicas entre as fases adultas e filhotes, foram considerados espécimes filhotes aqueles indivíduos que apresentavam ponta da cauda em tonalidade amarelada ou esbranquiçada e CRC igual ou inferior a 445 mm (Moraes, 2008; Fiorillo et al., 2020). A classificação de espécimes adultos foi realizada de acordo com o critério de Sazima (1992), que considerou adultos os indivíduos que apresentavam CRC maior ou igual a 650 mm. O critério de classificação de indivíduos adultos e filhotes da serpente *C. durissus* foi realizado com base nos estudos de Almeida-Santos (2005) e de Barros (2011), que mostraram que os indivíduos adultos apresentam CRC de cerca de 560 mm para machos e de 760 mm para fêmeas. Os indivíduos filhotes apresentam valores médios de CRC de  $297 \pm 42$  mm, e massa de  $31 \pm 5$  g. Os indivíduos das duas espécies que apresentaram valores de CRC e de massa superiores à média para filhotes e inferiores à média para adultos, foram considerados em um estágio intermediário e classificados como jovens.

Após a eutanásia, os olhos foram enucleados, foi tomada a medida do diâmetro axial dos olhos, as córneas foram removidas e as cujas ópticas foram fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% diluído em tampão fosfato (PB) 0,1M, por três horas. Em seguida, o cristalino foi removido e medido, e as retinas foram dissecadas com o auxílio da lupa estereomicroscópica (SMZ775-T, NIKON, Japan) e mantidas em PB 0,1M a 4°C. As retinas dissecadas foram submetidas ao processo de clareamento do epitélio pigmentado (*bleaching*) com peróxido de

hidrogênio a 10% diluído em PB 0,1M, por um período de 24 a 48 horas em temperatura ambiente.

#### **4.2. Imunohistoquímica para Marcação de Fotorreceptores**

Para a marcação dos diferentes fotorreceptores foram utilizados anticorpos anti-opsinas já utilizados em trabalhos anteriores para a marcação simples e/ou dupla de cones S e de cones L/M em cortes histológicos de retinas das mesmas espécies analisadas neste estudo, *C. durissus* e *B. jararaca* (Bittencourt et al., 2019) e de serpentes colubrídeas (Hauzman et al., 2017).

Para a marcação dos fotorreceptores, as retinas íntegras foram primeiramente lavadas em tampão fosfato (PB) 0,1M + Triton X-100 0,3% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (três lavagens de 10 minutos cada), e em seguida foram incubadas em soro normal de cabra 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ou soro normal de burro 10% (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA), diluído em PB 0,1M + Triton X-100 0,3%, por 1 hora, para bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida, as retinas foram incubadas com anticorpo (s) primário (Tabela 1) diluído em PB 0,1M + Triton X-100 0,3%, por 72 horas, a 4°C. Após este período, os tecidos foram lavados em PB 0,1M + Triton X-100 0,3% (três lavagens de 10 minutos), e incubados com anticorpo secundário (Tabela 1) diluído em PB 0,1M + Triton 0,3%, durante 2 horas, em temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo secundário foram feitas três lavagens de 10 minutos cada em PB 0,1M. As retinas íntegras foram aplanadas sobre lâminas histológicas com a camada de fotorreceptores voltada para cima, montadas com meio de montagem para fluorescência Vectashield (Vector Laboratories Inc, California, USA) e cobertas com lamínulas. Cortes radiais das retinas de cada uma das espécies foram utilizados como controle negativo. Para tanto, foram incubadas com a omissão do anticorpo primário para a verificação da especificidade do anticorpo secundário. Nenhuma marcação pelo anticorpo secundário foi detectada. As especificações dos anticorpos primários e secundários utilizados e suas concentrações estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1

**Anticorpos primários e secundários utilizados para marcação de fotorreceptores**

Anticorpos	Sequência peptídica	Empresa/ Catálogo	Diluição
<b>Primários</b>			
Blue opsin (OPN1SW)	Opsina S de Humano NKQFQACIMKMVCGKAMTDESDTCS SQKTEVSTVSSSTQVGPVN	Hospedeiro: Coelho. Anticorpo policlonal. Millipore, Merck (Alemanha) Cat. N. AB5407	1:200
Blue opsin (OPN1SW)	Opsina S de Humano EFYLFKNISSVGPWDGPQYH	Hospedeiro: Cabra. Anticorpo policlonal. Santa Cruz Biotechnology (Alemanha). Cat. N. 14363	1:200
Red/Green opsin (OPN1LW)	Opsina L/M de Humano: RQFRNCILQLFGKKVDDGSELSSASK TEVSSVSSVSPA	Hospedeiro: Coelho Anticorpo policlonal. Millipore, Merck (Alemanha). Cat. N. AB5405	1:200
<b>Secundários</b>			
Goat anti-rabbit IgG + TRITC	Cadeias pesadas e leves de imunoglobulinas gama	Hospedeiro: Cabra. Jackson Immunoresearch Laboratories, (EUA). Cat. N. AB_2337926	1:200
Donkey anti-goat IgG + TRITC	Cadeias pesadas e leves de imunoglobulinas gama	Hospedeiro: Burro. Jackson Immunoresearch Laboratories, (EUA). Cat. N. AB_2340400	1:200
Donkey anti-rabbit IgG + FITC	Cadeias pesadas e leves de imunoglobulinas gama	Hospedeiro: Burro. Jackson Immunoresearch Laboratories, (EUA). Cat. N. AB_2340588	1:200

As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência LEICA DM5500B (Leica Microsystems, Alemanha), com objetivas de 40x/0,80; 63x/NA 1,4-0,60 oil, ou de 100x/NA 1,4-0,7 oil, acoplado a um computador com software de estereologia *Stereo Investigador* (MicroBrightField, Colchester, VT).

**4.3. Técnica de coloração de Nissl para Marcação de Células Ganglionares**

Para a marcação e contagem de células da camada de células ganglionares (CCG), as retinas foram aplanadas sobre lâminas histológicas previamente gelatinizadas, com a CCG voltada para cima. Para aderência do tecido à lâmina e diferenciação das células, as retinas aplanadas foram submetidas a vapor de PFA por 24 horas, em temperatura ambiente. Após este período, os tecidos foram reidratados em banhos com concentrações decrescentes de álcool e em água destilada acidificada com ácido acético glacial. Em seguida, as retinas foram imersas em solução aquosa de cresil violeta 2% por cerca de 1 min, desidratadas com concentrações crescentes de álcool e diafanizadas em xilol (Tabela 2). As lâminas foram montadas com DPX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e lamínulas. As retinas foram observadas e fotografadas com microscópio trinocular LEICA DM5500B.

Tabela 2

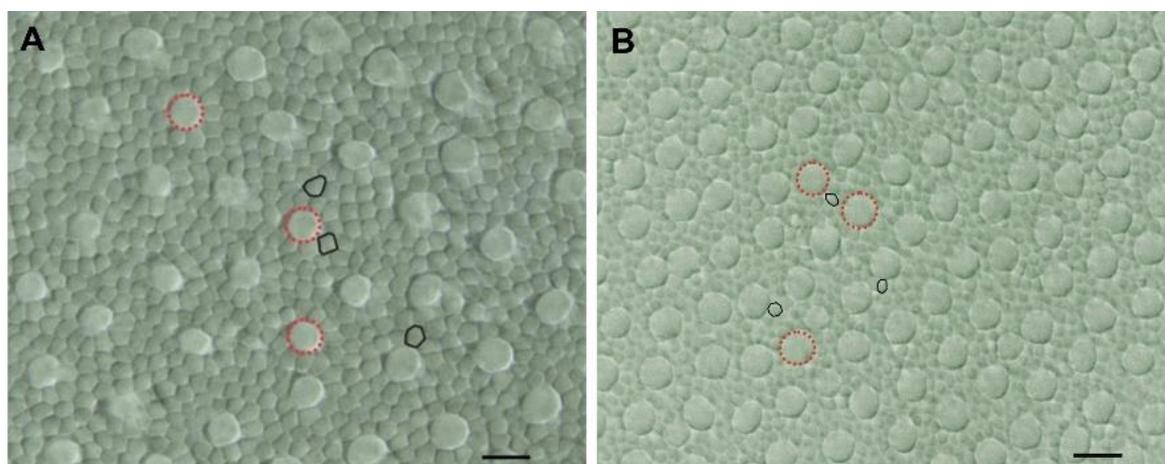
### Etapas do procedimento de coloração de Nissl

Soluções	Tempo
Álcool 95%	3 minutos
Álcool 70%	3 minutos
Álcool 50%	3 minutos
Água destilada + Ácido Acético	1 mergulho
Cresil Violeta 2%	~ 50 segundos
Álcool 70%	1 minuto
Álcool 95%	3 minutos
Álcool 100%	3 minutos
Álcool Butílico	30 segundos
Álcool 100% + Xilol (1:1)	3 minutos
Xilol	3 minutos

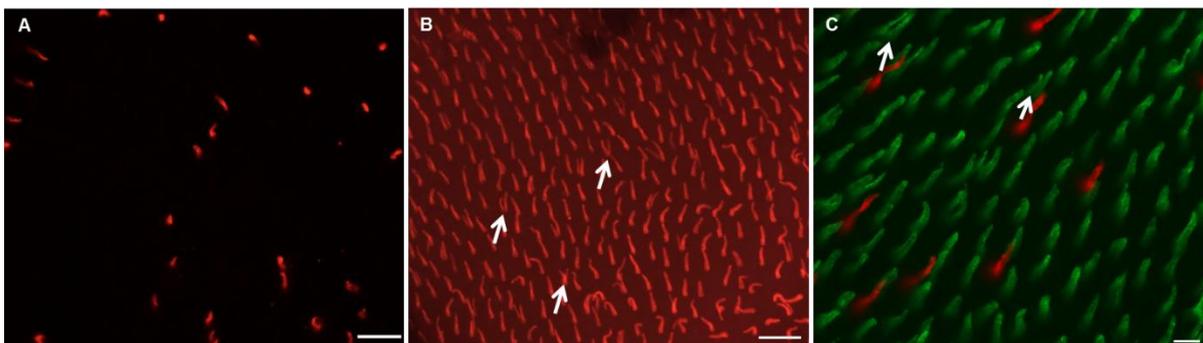
#### 4.4. Análise da Densidade e Distribuição das Células da Retina

A análise da densidade e distribuição dos fotorreceptores totais foi realizada para cada retina marcada com os diferentes anticorpos (Figura 13). Desta forma, em cada campo foram contados primeiramente os fotorreceptores específicos marcados com os anticorpos, identificados pela fluorescência, e em seguida, foram contados os fotorreceptores totais (cones e bastonetes) em campo claro, para análise da proporção de cada grupo celular (bastonetes, cones totais, cones L/M e cones S) em uma mesma retina.

A diferenciação entre cones e bastonetes foi realizada a partir da identificação morfológica (Gower et al., 2019), uma vez que os segmentos internos dos cones apresentam diâmetro visivelmente maior em comparação com os segmentos internos dos bastonetes (Figura 13). A contagem de cones específicos foi realizada a partir da observação dos segmentos externos revelados por meio de marcações simples (Figura 14 A, B) ou duplas (Figura 14 C) com anticorpos anti-opsinas S e/ou anti-opsinas L/M, e anticorpos secundários acoplados às moléculas fluorescentes TRITC e/ou FITC (Figura 14).

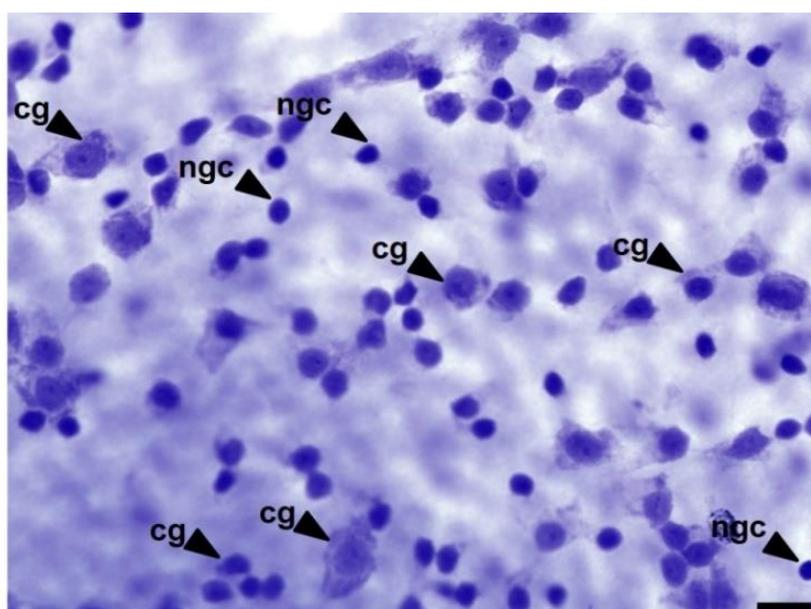


**Figura 13.** Imagens de campo claro das áreas amostradas com o mosaico de fotorreceptores das retinas de indivíduo adulto (A) e filhote (B) de *B. jararaca* retratando os critérios morfológicos utilizados para distinguir cones (contorno vermelho tracejado) de bastonetes (contorno preto contínuo). Barras de escala: 8µm.



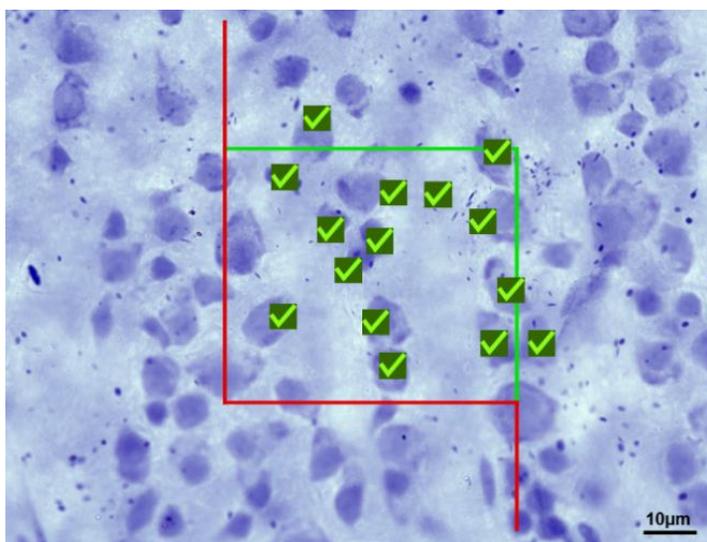
**Figura 14.** A, B. Imagens dos campos de contagem amostrados de retinas planas de *C. durissus* com os segmentos externos dos fotorreceptores marcados com anticorpos anti-opsina S (A) e anti-opsina L/M (B) revelados com TRITC. Em B, observa-se cones simples e cones duplos (setas). Barras de escala, 25  $\mu\text{m}$ . C. Imagem de retina plana de *B. jararaca*, com segmentos externos dos fotorreceptores marcados por marcação dupla, com os anticorpos anti-opsina S, revelados com TRITC (vermelho) e anti-opsina L/M revelados com FITC (verde). Pode-se observar a presença de cones L/M duplos (setas). Barra de escala, 8  $\mu\text{m}$ .

A densidade de células da CCG foi estimada a partir da contagem dos corpos celulares marcados pela técnica de coloração de Nissl. Além das células ganglionares, a CCG também contém outros grupos celulares, como as células amácrinas deslocadas e células gliais. Neste estudo, as células amácrinas e células da glia não foram consideradas nas contagens, e foram diferenciadas por apresentarem núcleo circular denso e menor tamanho em relação às células ganglionares (Pettigrew et al., 2008). Desta forma, as células ganglionares foram definidas pela observação de um corpo celular poligonal relativamente grande no qual a marcação de Nissl é abundante no citoplasma (Figura 15) (Wong, 1989; Hart et al., 2012).



**Figura 15.** Imagem das células da CCG da serpente *B. jararaca* indicando os critérios morfológicos usados para distinguir as células ganglionares (cg), que apresentam corpo celular poligonal e marcação abundante no citoplasma, de outras populações celulares (ngc, *non ganglion cell*) que apresentam formato circular bem definido e núcleo denso. Barra de escala: 10 $\mu\text{m}$ .

A análise da distribuição e a quantificação de fotorreceptores e de células da CCG foi feita por meio de uma abordagem estereológica, baseada no método de fracionamento óptico. O mapeamento das retinas íntegras foi feito com uso de um microscópio composto conectado a um computador com o software de estereologia *Stereo Investigador* (MicroBrightField, Colchester, VT). No computador, as bordas das retinas foram delineadas com o auxílio do mesmo software. Cerca de 200 caixas de amostragem (*counting frame*) com tamanhos determinados de acordo com o tipo e tamanho das células a serem contadas foram posicionadas de forma aleatória sobre as retinas desenhadas, em um padrão de grades que cobre toda a sua extensão. Todas as células posicionadas dentro das caixas de amostragem e as que estavam em contato com as linhas de inclusão (superior e lateral direita) foram contadas, e não foram contadas as células que tocam as linhas de exclusão (inferior e lateral esquerda) (Figura 16).



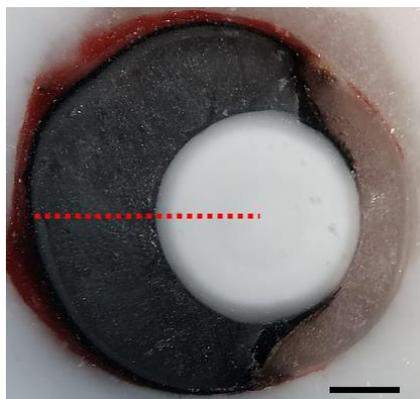
**Figura 16.** Caixa de contagem de células sobre um campo de amostragem de células da CCG de *C. durissus* corado pela técnica de coloração de Nissl, destacando os critérios estereológicos para inclusão das células na contagem. Linhas verdes (superior e lateral direita) = linhas de inclusão; Linhas vermelhas (inferior e lateral esquerda) = linhas de exclusão. Os marcadores indicam as células da CCG incluídas na contagem.

A fim de determinar se a amostragem de células foi suficiente, foi calculado o coeficiente de erro de Scheaffer (CE), que indica a precisão das previsões do número de células (Fileta et al., 2008), e pode ser calculado usando a equação  $CE = 1/\sqrt{Q}$ , em que Q corresponde ao total de células contadas. Um CE adequado deve ser inferior a 0,10 (Coimbra et al., 2009).

Para estimar o número total de neurônios utilizando o método estereológico de fracionamento óptico, uma sonda tridimensional, *optical dissector*, foi utilizada para contagem de núcleos de neurônios, combinada a um esquema de amostragem sistemática e uniforme, *fractionator*. Para estimar o número total ( $N_{total}$ ) de neurônios, considerou-se a fração de amostragem da área (*area sampling fraction*, asf) de acordo com a seguinte fórmula:  $N_{total} = \sum Q \times 1/asf$ , onde  $\sum Q$  é a soma do número total de neurônios contados (Coimbra et al., 2009).

#### 4.5. Estimativa da Acuidade Visual

A estimativa da acuidade visual foi realizada considerando o valor de pico de densidade de células da camada de células ganglionares (CCG) da retina, obtido por meio dos métodos estereológicos, combinado ao valor da distância posterior nodal (PND) do olho (Coimbra et al., 2013; Pettigrew et al., 1998). Para a estimativa do PND, os olhos foram enucleados, imediatamente congelados e mantidos em  $-30^{\circ}\text{C}$  para preservação do formato original do globo ocular. O material foi orientado e emblocado em OCT (*Optimum Cutting Temperature Formulation* – Sakura Finetechnical Co. Tokyo, Japan), para a realização de cortes transversais em criostato (Leica CM1100. Nussloch, Germany), a  $-25^{\circ}\text{C}$ . Fotografias do bloco foram tiradas a cada  $12\ \mu\text{m}$ , com uma câmera (Axio CamMR, Carl Zeiss Vision GmbH, Germany), acoplada a um estereomicroscópio (SMZ775-T, NIKON, Japan), com o software Axio Vision 4.1 (Carl Zeiss, Germany). As áreas do cristalino foram mensuradas posteriormente por meio das fotografias utilizando o software ImageJ (NIH, Bethesda, USA). A fotografia que apresentou a maior área da lente foi utilizada para estimar a distância focal do olho, do centro do cristalino até o limite entre a coróide e a retina (Figura 17).



**Figura 17.** Corte transversal do olho de *C. durissus*. A linha vermelha representa a distância posterior nodal (PND). Barra de escala: 1mm.

A distância focal de alguns vertebrados foi medida por Pettigrew e colaboradores (1988) que propuseram um PND de 67% do tamanho do olho para as espécies diurnas e de 52% para espécies noturnas. Para serpentes colubrídeas, Hauzman e colaboradores (2014, 2018) estimaram um valor de PND de 52% do tamanho do olho tanto para espécies diurnas quanto para noturnas. A fim de verificar o valor do PND das serpentes viperídeas deste estudo, foram amostrados um olho de um indivíduo adulto e um olho de filhote de *B. jararaca*, bem como um olho de indivíduo adulto e dois olhos de filhotes de *C. durissus*. Desta forma, para a estimativa da acuidade visual, o PND de cada olho coletado foi estimado com base no diâmetro axial do globo ocular, combinado aos valores de PND medidos para cada espécie e em cada fase da vida.

A resolução espacial foi estimada para cada retina amostrada considerando o pico de densidade de células da CCG, e duas possibilidades de arranjos celulares entre as células ganglionares, uma distribuição com arranjo quadrado e uma distribuição com arranjo hexagonal. Primeiramente, foi estimada a distância que corresponde a um grau de ângulo visual da retina ( $d$ ), calculada a partir da distância focal, de acordo com a fórmula:  $d = (2\pi PND)/360$  (Pettigrew et al., 1998). Considerando um espaçamento celular com arranjo hexagonal, foi estimada a média de espaçamento entre as células ( $S$ ) com a fórmula  $S^2 = 2/(D\sqrt{3})$ , sendo  $D$  o valor do pico da densidade celular da CCG em  $\text{mm}^2$ . A frequência espacial máxima  $V$  (Nyquist) de uma grade senoidal (Snyder & Miller, 1977) que tem resolução com este arranjo celular foi calculada com a fórmula  $V = 1/(S\sqrt{3})$ . O valor de  $V$  foi multiplicado pela distância  $d$  para obtenção do poder de resolução espacial em ciclos por grau (cpg). Considerando um arranjo celular quadrado, a densidade linear das células da CCG foi calculada a partir da raiz quadrada do pico de densidade de células ( $\text{células}/\text{mm}^2$ ). Como pelo menos duas células são necessárias para detectar um ciclo de uma determinada frequência espacial, a densidade linear foi dividida por 2. O valor resultante foi multiplicado pela distância subtendida como 1 grau da retina ( $d$ ), para a obtenção do valor de acuidade visual em cpg (Coimbra et al., 2013; Pettigrew et al., 1998).

#### 4.6. Análises Estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas para comparação dos valores obtidos de densidade média e de população total dos neurônios quantificados nas retinas de adultos e filhotes de *B. jararaca* e de *C. durissus*. Também foram comparados os valores estimados da área da retina, diâmetro axial do olho e acuidade visual de cada grupo analisado. A distribuição dos valores de cada uma das variáveis investigadas em cada grupo foi verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk (Anexo 2). Em seguida, foram analisadas as homogeneidades entre os grupos utilizando o teste de Levene. Para fins comparativos, mesmo quando as amostras apresentaram distribuição normal, foram utilizados tanto o teste paramétrico *t-Student* para amostras independentes, quanto o teste não paramétrico *U* de *Mann-Whitney* para amostras independentes. Em ambos os testes, as diferenças entre os grupos analisados foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Nas ocasiões de divergências em relação aos níveis de significância entre os resultados dos dois testes estatísticos aplicados, foram considerados os resultados do teste não paramétrico *U* de *Mann-Whitney*, dado o baixo número amostral de cada grupo deste estudo. As análises estatísticas foram realizadas com a linguagem de programação R (versão 4.0.2; <https://cran.r-project.org/>) e com o software Rstudio (1.3.959).

## 5. Resultados

### 5.1. Dados das Serpentes Coletadas

Para as análises morfológicas das retinas foram coletadas 50 serpentes, das quais 24 da espécie *B. jararaca* (8 adultos e 16 filhotes) e 26 da espécie *C. durissus* (11 adultos, 4 jovens e 11 filhotes). As serpentes foram classificadas como adultas, jovens ou filhotes, conforme os critérios morfométricos descritos na sessão de Material e Métodos. Os dados de sexo, massa, CRC, CC, diâmetro axial do olho e do cristalino, e área da retina das serpentes coletadas podem ser observados na Tabela 3 e na Tabela 4.

Tabela 3

#### Dados morfométricos das serpentes *B. jararaca* e medidas oculares

Espécies	Sexo	Massa (g)	CRC (mm)	CC (mm)	Diâmetro do olho (mm)		Diâmetro do cristalino (mm)		Área da retina (mm <sup>2</sup> )	
					OD	OE	OD	OE	OD	OE
<i>B. jararaca</i>										
Adultos										
Bjar190518-21	Macho	458,6	1170,0	180,0	5,4	4,5	2,8	-	47,8	-
Bjar180803-3	Fêmea	442,6	1098,5	160,0	5,0	5,1	2,9	3,3	39,6	-
Bjar191213-29	Fêmea	590,0	1060,0	155,0	5,2	5,4	2,8	3,2	46,7	-
Bjar180803-4	Fêmea	381,2	1010,0	140,0	5,1	5,3	3,0	3,2	32,6	31,2
Bjar191213-28	Fêmea	431,4	995,0	140,0	5,3	5,5	3,3	3,4	53,2	-
Bjar180803-2	Fêmea	260,8	991,1	142,0	5,3	5,1	3,3	3,6	-	54,0
Bjar181213-8	Fêmea	-	795,0	37,0	-	4,3	-	2,8	-	-
Bjar181213-9	Macho	-	775,0	122,0	4,2	4,8	2,6	-	31,8	-
Média ± dp		427,4 ±107,3	986,8 ±138,2	134,5 ±43,0	5,1 ±0,4	5,0 ±0,4	3,0 ±0,3	3,3 ±0,3	42,0 ±8,7	42,6 ±16,1
Filhotes										
Bjar191204-24	Fêmea	16,9	368,0	63,0	3,2	-	2,0	-	16,9	-
Bjar191204-25	Fêmea	17,5	367,0	64,0	4,1	3,6	-	-	-	-
Bjar191127-23	Macho	14,3	350,0	59,0	3,4	3,2	-	-	-	-
Bjar180927-7	Macho	-	350,0	35,0	4,8	4,7	3,4	2,4	-	-
Bjar191213-26	Fêmea	9,4	340,0	48,0	3,7	3,3	1,8	1,8	21,2	-
Bjar191213-30	Macho	-	325,0	55,0	3,5	3,6	2,0	1,9	23,8	-
Bjar191213-27	Fêmea	11,3	313,0	50,0	3,5	3,4	1,9	1,9	-	24,4
Bjar190327-18	Fêmea	9,7	310,0	41,0	3,3	2,8	1,6	1,7	-	16,6
Bjar190327-14	Macho	9,2	293,0	48,0	3,5	3,1	1,6	1,6	-	-
Bjar190327-15	Fêmea	9,3	293,0	35,0	3,1	2,7	1,7	1,7	-	-
Bjar190327-17	Macho	9,7	268,0	54,0	2,7	2,8	1,7	1,7	14,3	-
Bjar191127-22	Fêmea	6,8	263,0	40,0	-	3,4	-	1,9	-	19,1
Bjar190327-16	Macho	9,5	250,0	40,0	2,7	2,9	1,6	1,8	17,0	-
Bjar190312-11	Fêmea	6,0	245,0	45,0	3,1	3,0	1,6	1,6	-	15,5
Bjar190327-12	Macho	8,1	232,0	36,0	2,5	2,7	-	1,7	-	15,6
Bjar190327-13	Fêmea	7,1	230,0	37,0	-	3,0	1,8	1,8	19,3	-
Média ± dp		10,3 ±3,5	299,8 ±47,7	46,9 ±9,9	3,4 ±0,6	3,2 ±0,5	1,9 ±0,5	1,8 ±0,2	18,8 ±3,4	18,2 ±3,7

Nota. dp, desvio padrão; g, gramas; mm, milímetros; CRC, comprimento rostro-cloacal; CC, comprimento caudal; OD, olho direito; OE, olho esquerdo.

Tabela 4

**Dados morfométricos das serpentes *C. durissus* e medidas oculares**

Espécies	Sexo	Massa (g)	CRC (mm)	CC (mm)	Diâmetro do olho (mm)		Diâmetro do cristalino (mm)		Área da retina (mm <sup>2</sup> )	
					OD	OE	OD	OE	OD	OE
<i>C. durissus</i>										
Adultos										
Cdurt190508-11	Macho	734,4	1230,0	90,0	5,6	5,3	-	3,5	-	55,1
Cdurt181213-7	Macho	570,0	945,0	100,0	5,4	5,1	3,1	2,9	49,7	-
Cdurt190628-15	Fêmea	570,0	886,0	107,0	5,2	5,2	2,7	2,5	49,2	48,3
Cdurt190628-14	Fêmea	634,1	872,0	114,0	5,2	5,2	-	3,0	-	40,4
Cdurt180927-3	Fêmea	634,0	860,0	58,0	4,4	4,7	2,9	2,9	-	-
Cdurt191213-17	Macho	520,1	840,0	125,0	4,6	4,8	2,7	2,7	-	41,8
Cdurt191213-18	Fêmea	417,8	765,0	75,0	4,8	4,9	2,7	2,7	39,5	-
Cdurt191213-16	Macho	484,6	760,0	124,0	-	5,3	-	2,9	-	37,5
Cdurt180820-1	Macho	390,0	760,0	80,0	4,4	4,5	2,6	2,4	49,0	-
Cdurt180927-4	Fêmea	-	755,0	110,0	4,7	4,7	2,6	2,7	-	43,9
Cdurt180220-2	Macho	-	-	-	6,1	6,1	3,8	3,8	61,5	-
Média ± dp		550,6	867,3	98,3	5,0	5,1	2,9	2,9	49,8	44,5
		±110,2	±143,3	±22,1	±0,6	±0,5	±0,4	±0,4	±7,8	±6,3
Jovens										
Cdurt181213-10	Macho	-	450,0	41,0	-	4,1	-	2,3	-	-
Cdurt180927-5	Fêmea	32,7	431,0	31,0	3,7	4,1	2,1	2,3	44,1	-
Cdurt180927-2	Fêmea	25,0	424,0	35,0	3,7	3,9	2,3	2,5	-	-
Cdurt181213-9	Macho	-	412,0	38,0	3,6	4,2	2,3	2,5	32,8	-
Média ± dp		28,9	429,3	36,3	3,7	4,0	2,3	2,4	38,5	-
		±5,4	±15,9	±4,3	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±8,0	-
Filhotes										
Cdurt200131-35	Macho	20,0	370,0	40,0	3,7	3,3	2,7	1,8	23,3	-
Cdurt200131-33	Fêmea	21,0	360,0	38,7	3,3	-	1,6	-	19,6	-
Cdurt200131-39	Macho	20,0	350,0	38,5	3,4	3,1	-	-	23,1	-
Cdurt200124-25	Macho	27,0	330,0	36,0	3,3	3,7	1,7	1,7	21,5	-
Cdurt200131-31	Macho	23,0	330,0	36,0	-	-	-	1,7	-	-
Cdurt200124-26	Macho	27,0	320,0	35,0	3,8	3,7	1,68	1,7	-	-
Cdurt200124-24	Fêmea	25,0	320,0	34,5	3,3	3,3	-	-	-	-
Cdurt191213-22	Fêmea	25,0	320,0	34,0	3,5	3,5	1,5	1,5	22,4	-
Cdurt200124-21	Fêmea	25,0	310,5	33,5	3,7	3,3	1,8	1,7	20,3	25,0
Cdurt200124-19	Macho	22,0	300,0	32,5	-	3,2	-	1,7	-	19,2
Cdurt200124-20	Fêmea	25,0	310,0	34,0	-	3,2	-	1,7	-	23,9
Média ± dp		23,6	329,1	35,7	3,5	3,4	1,8	1,7	21,7	22,7
		±2,6	±22,1	±2,4	±0,2	±0,2	±0,4	±0,1	±1,5	±3,1

Nota. dp, desvio padrão; g, gramas; mm, milímetros; CRC, comprimento rostro-cloacal; CC, comprimento caudal; OD, olho direito; OE, olho esquerdo.

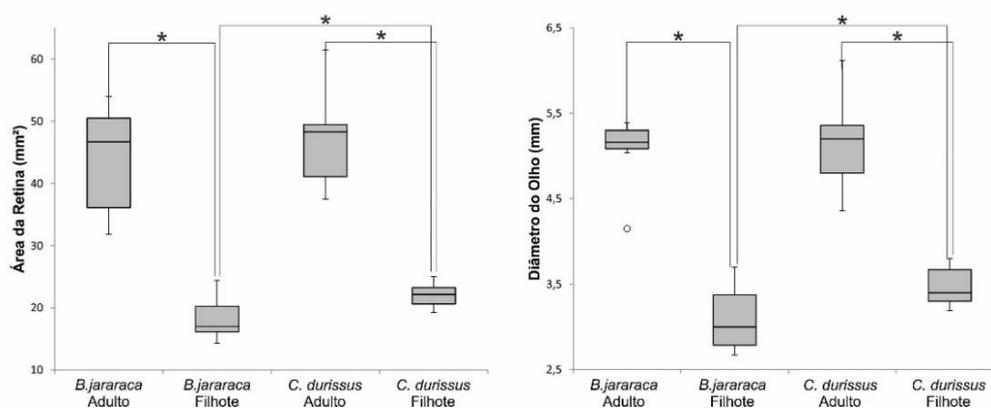
Dados das áreas das retinas e do diâmetro dos olhos foram comparados entre adultos e filhotes de *B. jararaca* e de *C. durissus*, bem como entre os indivíduos adultos e entre os indivíduos filhotes das duas espécies. As análises estatísticas revelaram diferenças significativas das áreas das retinas entre indivíduos adultos e filhotes de *B. jararaca* ( $U = 77$ ;  $p < 0,001$ ), adultos e filhotes de *C. durissus* ( $U = 110$ ;  $p < 0,001$ ), e entre os indivíduos filhotes das duas espécies ( $U = 21$ ;  $p = 0,02$ ) (Tabela 5, Figura 18). Diferenças significativas também foram observadas no diâmetro do olho entre indivíduos adultos e filhotes de *B. jararaca* ( $U = 88$ ;  $p < 0,01$ ) e de *C. durissus* ( $U = 99$ ;  $p < 0,001$ ) e também entre os indivíduos filhotes das duas espécies ( $U = 23$ ;  $p = 0,04$ ) (Tabela 5, Figura 18).

Tabela 5

**Dados das análises estatísticas da área da retina e do diâmetro do olho de adultos e filhotes de *B. jararaca* e *C. durissus*.**

Variável	Grupo	Teste estatístico				
		Mann-Whitney		Teste t		
		U	p-valor	t	gl	p-valor
Área da Retina (mm <sup>2</sup> )	Bjar Adulto/Bjar Filhote	77	< 0,001	6,97	7	< 0,001
	Cdur Adulto/Cdur Filhote	110	< 0,001	11,03	12	< 0,001
	Bjar Adulto/Cdur Adulto	30	0,48	-0,83	16	0,41
	Bjar Filhote/Cdur Filhote	21	0,02	-2,89	19	< 0,01
Diâmetro do Olho (mm)	Bjar Adulto/Bjar Filhote	88	< 0,01	11,49	17	< 0,001
	Cdur Adulto/Cdur Filhote	99	< 0,001	9,69	18	< 0,001
	Bjar Adulto/Cdur Adulto	39	0,71	-0,38	17	0,71
	Bjar Filhote/Cdur Filhote	23	0,04	-2,63	18	0,02

Nota. Bjar, *B. jararaca*; Cdur, *C. durissus*; U, teste não paramétrico de Mann-Whitney; t, teste *t-Student*, gl, grau de liberdade.



**Figura 18:** Boxplots mostrando as variações dos valores da área da retina e do diâmetro do olho de indivíduos adultos e filhotes de *B. jararaca* e de *C. durissus*. Os grupos que apresentaram diferenças significativas com base no teste U de Mann-Whitney, estão representados por um asterisco (\*). O círculo representa o valor de *outlier*.

## 5.2. População de Fotorreceptores

Para a estimativa da densidade e topografia dos fotorreceptores totais foram analisadas 7 retinas de *B. jararaca*, das quais 4 de indivíduos adultos e 3 de indivíduos filhotes, e 11 retinas de *C. durissus*: 5 de indivíduos adultos, 2 de indivíduos jovens e 4 de indivíduos filhotes (Tabela 6). As populações de bastonetes e de cones totais foram diferenciadas com base no diâmetro dos segmentos internos dos fotorreceptores: cones foram identificados pelo maior diâmetro (Figura 13). As retinas foram marcadas com anticorpos anti-opsinas S e/ou L/M, para a identificação dos segmentos externos dos diferentes grupos de cones (Figura 14). Os parâmetros utilizados para a contagem de fotorreceptores (fotorreceptores totais, bastonetes e cones totais) e de cones marcados com anticorpos específicos (cones S e cones L/M), bem como informações sobre as áreas das retinas e as áreas amostradas (asf) podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6

**Parâmetros estereológicos utilizados para estimativa da densidade de fotorreceptores em retinas de *B. jararaca* e *C. durissus*.**

Espécies	Área da retina (mm <sup>2</sup> )	Nº de sítios contados	Área de amostragem (µm)		Grade de amostragem		Objetiva		asf		
			Fotorreceptores	Cones S e L/M	Fotorreceptores	Cones S e L/M	Fotorreceptores	Cones S e L/M	Fotorreceptores	Cones S	L/M
<i>B. jararaca</i>											
Adultos											
Bjar191213-29	46,7	178	50x50	180x180	500x500	500x500	100xoil	40x	0,010	0,133	0,132
Bjar180803-4	31,2	174	50x50	50x50**	400x400	400x400**	100xoil	40x**	0,014	-	0,034
Bjar191213-28	53,2	200	50x50	180x180	500x500	500x500	100xoil	40x	0,009	0,125	0,124
Bjar180803-2	54,0	203	50x50	180x180*	550x550	550x550*	100xoil	40x**	0,009	0,103	-
Média ± dp	46,3 ±10,6	188,8 ±14,9							0,011 ±0,002	0,121 ±0,016	0,097 ±0,055
Filhotes											
Bjar191213-26	21,2	189	50x50	100x100	350x350	350x350	100xoil	40x	0,019	0,078	0,078
Bjar191213-30	23,8	185	50x50	100x100	350x350	350x350	100xoil	40x	0,019	0,078	0,078
Bjar191213-27	24,4	204	50x50	100x100	350x350	350x350	100xoil	40x	0,020	0,087	0,084
Média ± dp	23,1 ±1,7	192,7 ±10,0							0,020 ±0,000	0,081 ±0,005	0,080 ±0,003
<i>C. durissus</i>											
Adultos											
Cdurt190508-11	55,1	209	50x50	180x180*	500x500	550x550*	100xoil	40x*	0,009	0,105	-
Cdurt181213-7	49,7	185	50x50	180x180**	500x500	500x500**	100xoil	40x**	0,009	-	0,119
Cdurt190628-15	48,3	163	50x50	180x180**	500x500	500x500**	100xoil	40x**	0,008	-	0,105
Cdurt191213-17	41,8	196	50x50	180x180	450x450	450x450	100xoil	40x	0,012	0,154	0,151
Cdurt191213-18	39,5	189	50x50	180x180	450x450	450x450	100xoil	40x	0,011	0,152	0,155
Média ± dp	46,9 ±6,3	188,4 ±16,9							0,010 ±0,001	0,137 ±0,028	0,133 ±0,024
Jovens											
Cdurt180927-5	44,1	280	50x50	150x150*	400x400	400x400*	100xoil	40x	0,010	0,140	-
Cdurt181213-9	32,8	284	50x50	150x150*	400x400	400x400*	100xoil	40x	0,012	0,140	-
Média ± dp	38,5 ±8,0	282,0 ±2,8							0,011 ±0,001	0,140 ±0,000	
Filhotes											
Cdurt200131-35	23,3	180	50x50	100x100	350x350	350x350	100xoil	40x	0,019	0,078	0,078
Cdurt200131-39	23,1	180	50x50	100x100	350x350	350x350	100xoil	40x	0,019	0,074	0,079
Cdurt191213-22	22,4	173	50x50	100x100	350x350	350x350	100xoil	40x	0,020	0,067	0,076
Cdurt200124-21	25,0	186	50x50	100x100	350x350	350x350	100xoil	40x	0,019	0,072	0,073
Média ± dp	23,5 ±1,1	179,8 ±5,3							0,019 ±0,000	0,072 ±0,004	0,077 ±0,003

Nota. dp, desvio padrão; asf, *area sampling fraction*; \*Quantificação apenas de cones S; \*\*Quantificação apenas de cones L/M.

Em *B. jararaca*, a estimativa da população total de fotorreceptores não apresentou diferenças significativas entre os indivíduos adultos, com  $3.222.909 \pm 574.130$  células e indivíduos filhotes, com  $3.096.447 \pm 442.134$  células ( $U = 7$ ;  $p = 0,86$ ) (Tabela 7, Tabela 8, Figura 20). Em *C. durissus* também não foi observada diferença significativa da população total de fotorreceptores de adultos, com  $3.467.398 \pm 204.254$  células, e filhotes com  $3.105.908 \pm 284.321$  células ( $U = 17$ ;  $p = 0,11$ ) (Tabela 7, Tabela 8, Figura 20). As comparações entre adultos e entre filhotes das duas espécies não apresentaram diferenças significativas nos valores estimados para a população total de fotorreceptores (Tabela 8, Figura 20). Indivíduos jovens de *C. durissus* apresentaram população total de  $2.354.632 \pm 552.012$  células (Tabela 7).

A densidade média de fotorreceptores totais de *B. jararaca* foi de  $72.871 \pm 16.053$  células/mm<sup>2</sup> em adultos e de  $135.300 \pm 29.765$  células/mm<sup>2</sup> em filhotes ( $U = 0$ ;  $p = 0,06$ ) (Tabela 7, Tabela 8, Figura 20). Entre adultos e filhotes de *C. durissus*, os valores de densidade média de fotorreceptores foram menores em adultos, com  $75.267 \pm 11.483$  células/mm<sup>2</sup> em relação aos filhotes, com  $133.096 \pm 11.496$  células/mm<sup>2</sup> ( $U = 0$ ;  $p = 0,02$ ) (Tabela 7, Tabela 8, Figura 20). Os valores de densidade média não diferiram entre adultos e entre filhotes das duas espécies (Tabela 8, Figura 20). Indivíduos jovens de *C. durissus* apresentaram densidade média estimada em  $71.298 \pm 14.021$  células/mm<sup>2</sup> (Tabela 7). Os gráficos da Figura 19 mostram as variações da densidade média e da população de fotorreceptores das retinas amostradas.

### **Bastonetes**

As populações de bastonetes das retinas dos indivíduos adultos e filhotes de *B. jararaca* não apresentaram diferenças significativas, com  $3.005.661 \pm 543.385$  células em adultos e  $2.937.835 \pm 377.872$  células em filhotes ( $U = 7$ ;  $p = 0,86$ ) (Tabela 7, Tabela 8, Figura 20). Em adultos de *C. durissus*, a população de bastonetes foi significativamente maior, com  $3.179.100 \pm 122.211$  células, em relação aos filhotes, com  $2.806.727 \pm 244.345$  células ( $U = 19$ ;  $p = 0,03$ ) (Tabela 7, Tabela 8, Figura 20). As comparações dos valores da população de bastonetes entre indivíduos adultos e indivíduos filhotes das duas espécies não mostraram diferenças significativas (Tabela 7, Tabela 8). Indivíduos jovens de *C. durissus* apresentaram população de bastonetes estimada em  $2.097.384 \pm 516.753$  células (Tabela 7).

A densidade média de bastonetes em *B. jararaca* foi de  $68.662 \pm 15.648$  células/mm<sup>2</sup> em adultos e de  $128.299 \pm 26.618$  células/mm<sup>2</sup> em filhotes ( $U = 0$ ;  $p = 0,06$ ) (Tabela 7, Tabela 8, Figura 20). Entre adultos e filhotes de *C. durissus*, os valores de densidade média de bastonetes foram significativamente diferentes, com  $68.768 \pm 9.305$  células/mm<sup>2</sup> em adultos e

$119.801 \pm 10.737$  células/mm<sup>2</sup> em filhotes ( $U = 0$ ;  $p = 0,02$ ) (Tabela 7, Tabela 8, Figura 20). As comparações das densidades médias de bastonetes entre adultos e entre filhotes das duas espécies não mostraram diferenças significativas (Tabela 8, Figura 20). Indivíduos jovens de *C. durissus* apresentaram densidade média de bastonetes estimada em  $63.494 \pm 13.250$  células/mm<sup>2</sup> (Tabela 7). A porcentagem de bastonetes em relação à população total de fotorreceptores foi de  $93,2\% \pm 2,2\%$  em adultos de *B. jararaca*, e  $95\% \pm 2,1\%$  em filhotes (Tabela 7). Em *C. durissus*, a proporção de bastonetes foi de  $91,8\% \pm 2,3\%$  em adultos,  $88,9\% \pm 1,1\%$  em jovens e de  $90,4\% \pm 0,8\%$  em filhotes (Tabela 7). Os gráficos da Figura 19 mostram as variações da densidade média e da população de bastonetes nas retinas amostradas.

### ***Cones Totais***

A população de cones totais não mostrou diferença estatística entre adultos e filhotes de *B. jararaca*, com  $210.759 \pm 45.103$  e  $228.841 \pm 14.764$  cones, respectivamente ( $U = 0$ ;  $p = 0,06$ ) (Tabela 7, Figura 20). Entre adultos e filhotes de *C. durissus*, a população total de cones também não mostrou diferenças estatísticas, com  $337.923 \pm 21.143$  células em adultos e  $337.601 \pm 36.968$  células em filhotes ( $U = 14$ ;  $p = 0,41$ ) (Tabela 7, Tabela 8). Entre as duas espécies, a população de cones foi maior em adultos de *C. durissus* em relação a *B. jararaca* ( $U = 0$ ;  $p = 0,02$ ) (Tabela 8; Figura 20). A população total de cones em jovens de *C. durissus* foi de  $329.853 \pm 15.505$  células (Tabela 7).

Os valores de densidade média dos cones totais em *B. jararaca* foram menores em adultos, com  $4.641 \pm 860$  células/mm<sup>2</sup>, comparado aos filhotes, com  $9.927 \pm 949$  células/mm<sup>2</sup> ( $U = 0$ ;  $p = 0,06$ ) (Tabela 7, Figura 20). Em *C. durissus*, a densidade média de cones foi de  $7.271 \pm 842$  células/mm<sup>2</sup> em adultos, e significativamente maior em filhotes, com  $14.426 \pm 1.780$  células/mm<sup>2</sup> ( $U = 1$ ;  $p = 0,03$ ) (Tabela 7, Tabela 8, Figura 20). A densidade média de cones totais foi significativamente maior em adultos de *C. durissus*, em relação aos adultos de *B. jararaca* ( $U = 0$ ;  $p = 0,02$ ). Entre os filhotes das duas espécies não foi observada diferença estatística ( $U = 0$ ;  $p = 0,06$ ) (Tabela 7, Tabela 8, Figura 20). Os jovens de *C. durissus* apresentaram densidade média de cones em  $10.024 \pm 83$  células/mm<sup>2</sup> (Tabela 7). A porcentagem de cones em relação a população de fotorreceptores totais em *B. jararaca* foi de  $6,5\% \pm 0,7\%$  em adultos e de  $7,5\% \pm 1,4\%$  em filhotes (Tabela 7). Em *C. durissus* a porcentagem de cones foi de  $9,8\% \pm 0,9\%$  em adultos,  $14,3\% \pm 2,7\%$  em jovens, e de  $10,9\% \pm 0,8\%$  em filhotes (Tabela 7). Os gráficos da Figura 19 mostram as variações da densidade média e da população de cones nas retinas de *B. jararaca* e *C. durissus*.

### *Cones S e Cones L/M*

Para as análises de densidade de cones S e L/M, as retinas foram marcadas com anticorpos anti-opsinas S e/ou L/M (Figura 14). Para a quantificação de cones S, foram analisadas 6 retinas de *B. jararaca*, das quais 3 de indivíduos adultos e 3 de filhotes, e 9 retinas de *C. durissus*, das quais 3 de indivíduos adultos, 2 de jovens e 4 de filhotes.

A população total de cones S de *B. jararaca* foi de  $21.325 \pm 7.058$  células em adultos e de  $21.985 \pm 4.263$  células em filhotes ( $U = 4$ ;  $p = 1,00$ ) (Tabela 9, Tabela 10, Figura 22). Em *C. durissus*, população total foi estimada em  $34.321 \pm 2.294$  células em adultos e em  $30.331 \pm 5.260$  células em filhotes ( $U = 9$ ;  $p = 0,40$ ) (Tabela 9, Tabela 10, Figura 22). A densidade média de cones S de *B. jararaca* foi de  $414 \pm 123$  células/mm<sup>2</sup> em adultos e  $960 \pm 242$  células/mm<sup>2</sup> em filhotes ( $U = 0$ ;  $p = 0,1$ ) (Tabela 9, Tabela 10, Figura 22). Nas retinas de *C. durissus* a densidade média foi de  $765 \pm 83$  células/mm<sup>2</sup> em adultos e de  $1.295 \pm 230$  células/mm<sup>2</sup> em filhotes ( $U = 0$ ;  $p = 0,06$ ) (Tabela 9, Tabela 10, Figura 22). Os jovens de *C. durissus* apresentaram população total de  $20.565 \pm 1.276$  células e densidade média de  $627 \pm 63$  células/mm<sup>2</sup> (Tabela 9). As análises estatísticas não mostraram diferença significativa na população de cones S de indivíduos adultos ( $U = 0$ ;  $p = 0,1$ ) e de filhotes ( $U = 1$ ;  $p = 0,11$ ) das duas espécies (Tabela 10, Figura 22). Em *B. jararaca* a porcentagem de cones S em relação a população total de cones foi de  $9,4\% \pm 2,8\%$  em adultos e de  $9,4\% \pm 1,3\%$  em filhotes (Tabela 9). Em *C. durissus*, a porcentagem foi de  $9,4\% \pm 2,8\%$  em adultos,  $6\% \pm 1\%$  em jovens, e  $9,1\% \pm 1,9\%$  em filhotes (Tabela 9).

Para as análises de densidade de cones L/M simples e duplos foram amostradas 6 retinas de *B. jararaca*, das quais 3 de adultos e 3 de filhotes, e 8 retinas de *C. durissus*, das quais 4 de adultos e 4 de filhotes (Tabela 9). A população total de cones L/M em *B. jararaca* foi de  $185.346 \pm 74.460$  células em adultos e  $194.126 \pm 5.410$  células em filhotes ( $U = 6$ ;  $p = 0,7$ ) (Tabela 9, Tabela 10, Figura 22). Em *C. durissus*, a população de cones L/M foi de  $298.205 \pm 25.817$  células em adultos e de  $287.629 \pm 33.190$  células em filhotes ( $U = 9$ ;  $p = 0,89$ ) (Tabela 9, Tabela 10, Figura 22). A densidade média de cones L/M foi de  $4.136 \pm 951$  células/mm<sup>2</sup> em adultos de *B. jararaca* e de  $8.434 \pm 861$  células/mm<sup>2</sup> em filhotes ( $U = 0$ ;  $p = 0,1$ ) (Tabela 9, Tabela 10, Figura 22). Em *C. durissus*, a densidade média de cones L/M foi menor em adultos, com  $6.686 \pm 622$  células/mm<sup>2</sup> comparado aos filhotes, com  $12.305 \pm 1.700$  células/mm<sup>2</sup> ( $U = 0$ ;  $p = 0,03$ ) (Tabela 9, Tabela 10, Figura 22). Os valores de população total e de densidade média de cones L/M não apresentaram diferenças significativas entre adultos e entre os filhotes das duas espécies (Tabela 10, Figura 22). A porcentagem de cones L/M em relação a população total de

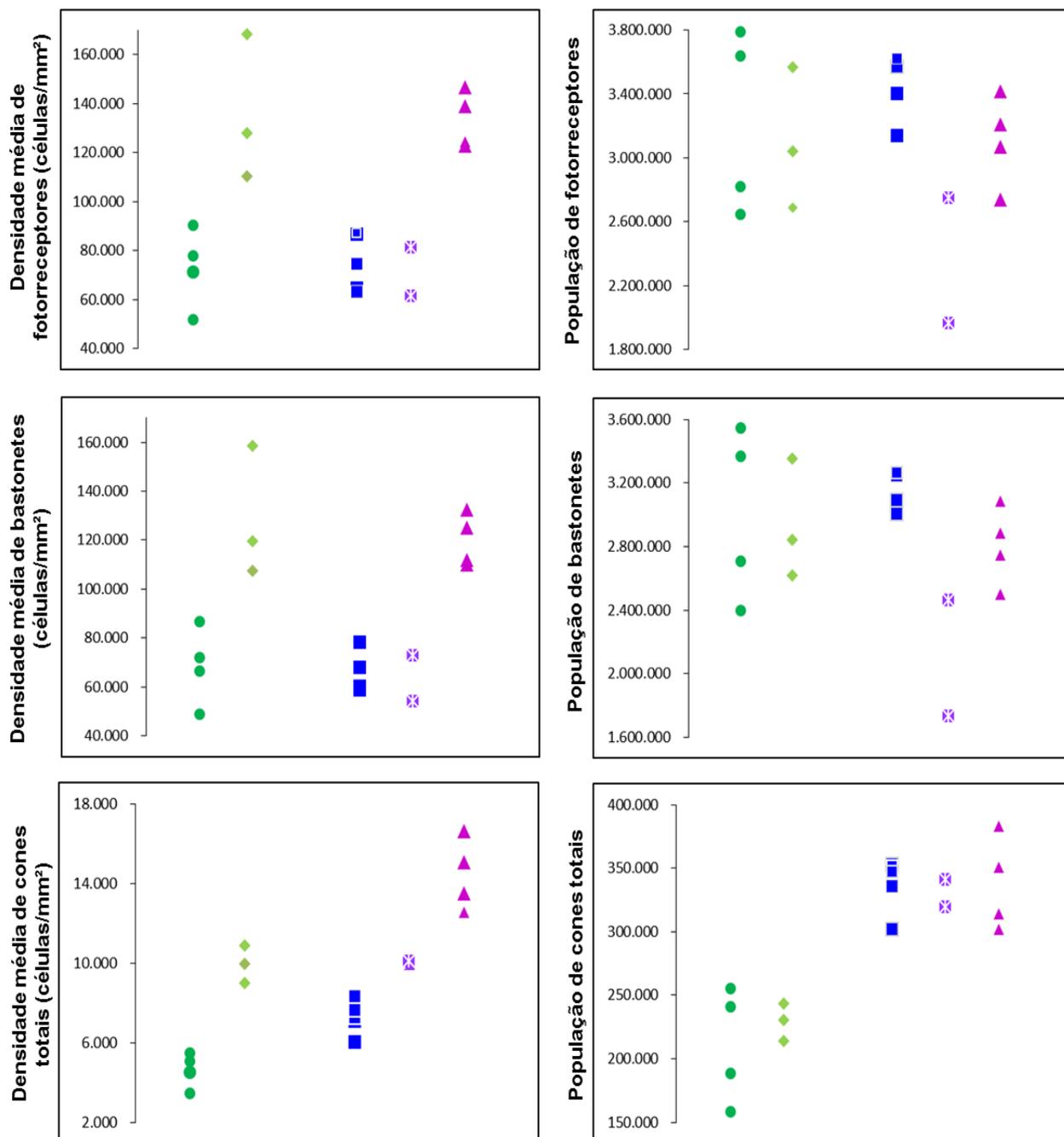
cones de *B. jararaca* foi de  $82,3\% \pm 16,6\%$  em adultos e de  $83,8\% \pm 7,0\%$  em filhotes (Tabela 9), e em *C. durissus* foi de  $88,1\% \pm 4,0\%$  em adultos e de  $85,2\% \pm 3,4\%$  em filhotes (Tabela 9). Os gráficos da Figura 21 mostram as variações da densidade média e da população de cones nas retinas de *B. jararaca* e *C. durissus*.

Tabela 7

Dados da população de fotorreceptores totais, bastonetes e cones totais, em retinas de *B. jararaca* e *C. durissus*

Espécies	Área da Retina (mm <sup>2</sup> )	Fotorreceptores				Bastonetes					Cones Totais				
		População Total	CE	Densidade Média (células/mm <sup>2</sup> )	Densidade Máxima (células/mm <sup>2</sup> )	População Total	CE	Densidade Média (células/mm <sup>2</sup> )	Densidade Máxima (células/mm <sup>2</sup> )	% de Bastonetes	População Total	CE	Densidade Média (células/mm <sup>2</sup> )	Densidade Máxima (células/mm <sup>2</sup> )	% de Cones
<i>B. jararaca</i>															
Adultos															
Bjar191213-29	46,7	3.636.618	0,03	77.872	114.400	3.371.110	0,03	72.187	105.600	92,7	255.128	0,03	5.463	8.735	7,0
Bjar180803-4	31,2	2.821.126	0,04	90.421	148.800	2.709.182	0,04	86.833	141.200	96,0	158.654	0,04	5.085	10.800	5,6
Bjar191213-28	53,2	3.789.755	0,03	71.236	109.600	3.546.488	0,03	66.663	104.400	93,6	240.985	0,03	4.530	7.191	6,4
Bjar180803-2	54,0	2.644.137	0,04	51.956	89.200	2.395.862	0,05	48.966	84.400	90,6	188.271	0,03	3.486	5.802	7,1
Média	46,3	3.222.909	0,04	72.871	115.500	3.005.661	0,04	68.662	108.900	93,2	210.759	0,03	4.641	8.132	6,5
± dp	±10,6	±574.130	±0,01	±16.053	±24.743	±543.385	±0,01	±15.648	±23.627	±2,2	±45.103	±0,01	±860	±2.144	±0,7
Filhotes															
Bjar191213-26	21,2	3.564.170	0,03	168.121	220.800	3.354.150	0,03	158.215	210.000	94,1	230.309	0,03	10.864	14.500	6,5
Bjar191213-30	23,8	3.039.813	0,03	127.723	176.400	2.842.807	0,03	119.446	167.600	93,5	213.398	0,03	8.966	12.500	7,0
Bjar191213-27	24,4	2.685.358	0,04	110.056	196.800	2.616.548	0,04	107.236	186.000	97,4	242.816	0,03	9.951	14.400	9,0
Média	23,1	3.096.447	0,03	135.300	198.000	2.937.835	0,03	128.299	187.867	95,0	228.841	0,03	9.927	13.800	7,5
± dp	±1,7	±442.134	±0,01	±29.765	±22.224	±377.872	±0,01	±26.618	±21.262	±2,1	±14.764	±0,00	±949	±1.127	±1,4
<i>C. durissus</i>															
Adultos															
Cdurt190508-11	55,1	3.569.320	0,03	64.779	113.600	3.249.205	0,03	58.969	103.600	91,0	335.662	0,03	6.015	10.000	9,4
Cdurt181213-7	49,7	3.137.064	0,04	63.120	102.000	3.005.135	0,04	60.465	93.200	95,8	352.702	0,03	7.097	10.556	11,2
Cdurt190628-15	48,3	3.607.506	0,04	74.690	123.600	3.278.160	0,04	67.871	112.800	90,9	351.651	0,04	7.281	12.400	9,7
Cdurt191213-17	41,8	3.620.733	0,03	86.620	124.000	3.267.345	0,03	78.166	112.400	90,2	347.513	0,03	8.314	12.840	9,6
Cdurt191213-18	39,5	3.402.368	0,03	87.128	131.200	3.095.653	0,03	78.371	121.200	91,0	302.088	0,03	7.648	11.204	8,9
Média	46,9	3.467.398	0,03	75.267	118.880	3.179.100	0,03	68.768	108.640	91,8	337.923	0,03	7.271	11.400	9,8
± dp	±6,3	±204.254	±0,01	±11.483	±11.326	±122.211	±0,01	±9.305	±10.642	±2,3	±21.143	±0,00	±842	±1.203	±0,9
Jovens															
Cdurt180927-5	44,1	1.964.300	0,04	61.384	117.600	1.731.984	0,05	54.124	105.600	88,1	318.889	0,02	9.965	14.800	16,2
Cdurt181213-9	32,8	2.744.963	0,04	81.212	113.200	2.462.783	0,04	72.863	103.200	89,7	340.816	0,02	10.083	16.000	12,4
Média	38,5	2.354.632	0,04	71.298	115.400	2.097.384	0,05	63.494	104.400	88,9	329.853	0,02	10.024	15.400	14,3
± dp	±8,0	±552.012	-	±14.021	±3.111	±516.753	±0,01	±13.250	±1.697	±1,1	±15.505	-	±83	±849	±2,7
Filhotes															
Cdurt200131-35	23,3	3.414.175	0,03	146.531	197.600	3.085.128	0,03	132.409	190.000	90,4	351.105	0,03	15.069	23.200	10,3
Cdurt200131-39	23,1	3.205.356	0,03	138.760	211.600	2.887.343	0,03	124.993	191.600	90,1	383.346	0,03	16.595	25.000	12,0
Cdurt191213-22	22,4	2.737.003	0,03	124.409	220.000	2.503.403	0,04	111.759	198.000	91,5	302.073	0,04	13.485	20.700	11,0
Cdurt200124-21	25,0	3.067.097	0,03	122.684	188.800	2.751.033	0,03	110.041	173.200	89,7	313.880	0,04	12.555	19.100	10,2
Média	23,5	3.105.908	0,03	133.096	204.500	2.806.727	0,03	119.801	188.200	90,4	337.601	0,03	14.426	22.000	10,9
± dp	±1,1	±284.321	±0,00	±11.496	±13.961	±244.345	±0,00	±10.737	±10.580	±0,8	±36.968	±0,00	±1.780	±2.617	±0,8

Nota. dp, desvio padrão; mm, milímetro; CE, coeficiente de erro de Scheaffer.



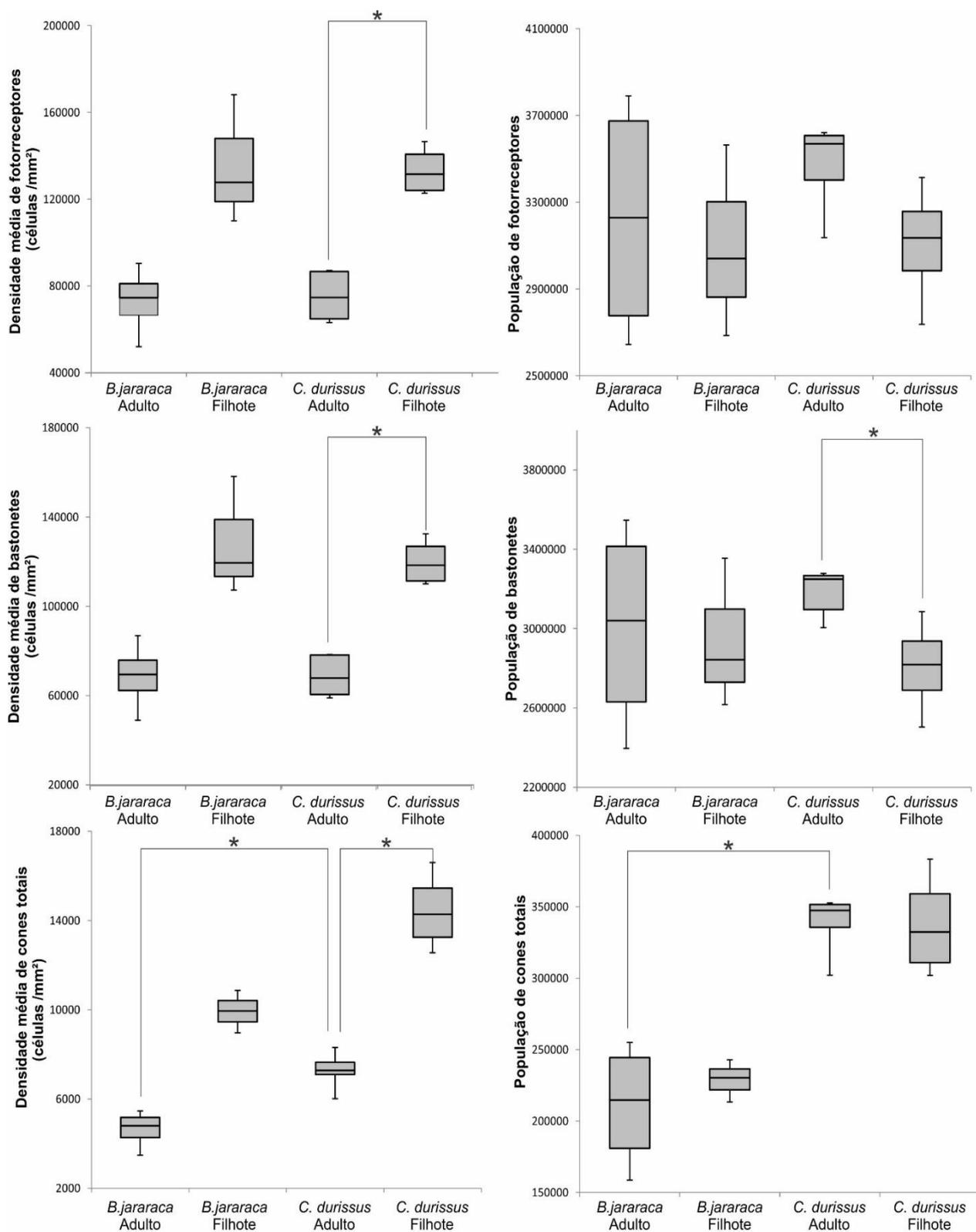
**Figura 19:** Densidade média e população total de fotorreceptores, bastonetes e cones totais nas retinas de *B. jararaca* adultos (●) e filhotes (◆), e de *C. durissus* adultos (■), jovens (⊗) e filhotes (▲).

Tabela 8

**Resultados das análises estatísticas da comparação da população total e densidade média de fotorreceptores totais, bastonetes e cones totais em retinas de adultos e filhotes de *B. jararaca* e *C. durissus*.**

Variável	Grupo	Fotorreceptores					Bastonetes					Cones Totais				
		Mann-Whitney		Teste t			Mann-Whitney		Teste t			Mann-Whitney		Teste t		
		U	p-valor	t	gl	p-valor	U	p-valor	t	gl	p-valor	U	p-valor	t	gl	p-valor
Densidade Média (células/mm <sup>2</sup> )	Bjar Adulto/Bjar Filhote	0	0,06	-3,6	5	0,02	0	0,06	-3,7	5	0,01	0	0,06	-7,7	5	< 0,001
	Cdur Adulto/Cdur Filhote	0	0,02	-7,5	7	< 0,001	0	0,02	-7,6	7	< 0,001	1	0,03	-3,3	7	0,01
	Bjar Adulto/Cdur Adulto	10	1,00	-0,2	7	0,80	10	1,00	-0,01	7	0,99	0	0,02	-4,6	7	< 0,01
	Bjar Filhote/Cdur Filhote	6	1,00	0,1	5	0,90	6	1,00	0,59	5	0,58	0	0,06	-3,9	5	0,01
População Total	Bjar Adulto/Bjar Filhote	7	0,86	0,32	5	0,77	7	0,86	0,18	5	0,86	0	0,06	-4,1	5	0,01
	Cdur Adulto/Cdur Filhote	17	0,11	2,23	7	0,06	19	0,03	3,01	7	0,02	14	0,41	1,0	7	0,37
	Bjar Adulto/Cdur Adulto	10	1,00	-0,81	4	0,47	10	1,00	-0,63	3	0,57	0	0,02	-5,2	7	0,01
	Bjar Filhote/Cdur Filhote	5	0,86	-0,03	5	0,97	7	0,86	0,56	5	0,60	0	0,06	-4,7	5	0,01

Nota. Bjar *B. jararaca* Cdur, *C. durissus*; U, teste não paramétrico de Mann-Whitney; t, teste t-Student, gl, grau de liberdade.



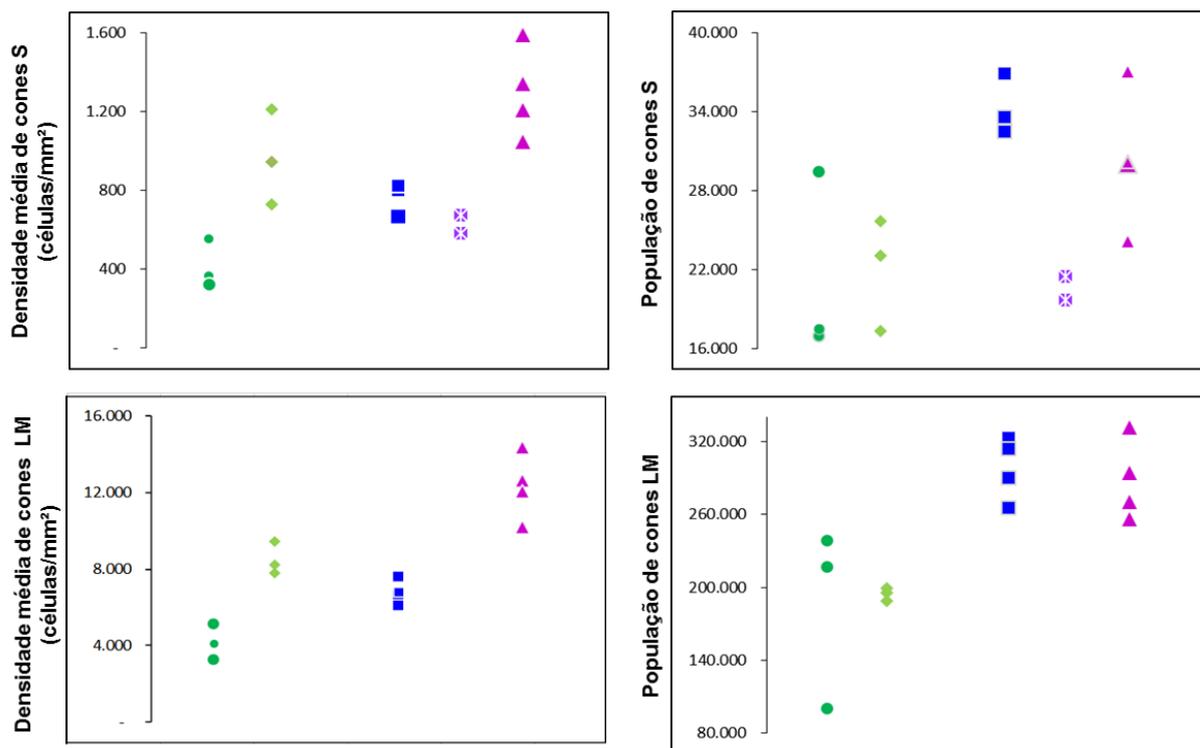
**Figura 20:** Boxplots mostrando as variações de densidade média e de população de fotorreceptores, bastonetes e cones totais de indivíduos adultos e filhotes de *B. jararaca* e de *C. durissus*. Os grupos que apresentaram diferenças significativas com base no teste U de Mann-Whitney, estão representados por um asterisco (\*).

Tabela 9

Densidade de cones S e L/M das retinas de *B. jararaca* e *C. durissus*.

Espécies	Área da retina (mm <sup>2</sup> )	Cones S					Cones L/M				
		População Total	CE	Densidade Média (células/mm <sup>2</sup> )	Densidade Máxima (células/mm <sup>2</sup> )	% de cones S	População Total	CE	Densidade Média (células/mm <sup>2</sup> )	Densidade Máxima (células/mm <sup>2</sup> )	% de cones L/M
<i>B. jararaca</i>											
Adultos											
Bjar191213-29	46,7	16.977	0,03	364	833	6,7	238.939	0,03	5.116	8.549	93,7
Bjar180803-4	31,2	-	-	-	-	-	100.325	0,04	3.216	6.844	63,2
Bjar191213-28	53,2	29.468	0,03	554	1.142	12,2	216.773	0,03	4.075	6.358	90,0
Bjar180803-2	54,0	17.529	0,04	325	741	9,3	-	-	-	-	-
Média ± dp	46,3	21.325	0,04	414	905	9,4	185.346	0,03	4.136	7.250	82,3
	±10,6	±7.058	±0,01	±123	±210	±2,8	±74.460	±0,01	±951	±1.151	±16,6
Filhotes											
Bjar191213-26	21,2	25.644	0,04	1.210	2.400	10,6	199.050	0,03	9.389	12.900	82,6
Bjar191213-30	23,8	17.303	0,04	727	1.500	8,1	194.993	0,03	8.193	11.700	91,4
Bjar191213-27	24,4	23.007	0,03	943	2.300	9,5	188.335	0,03	7.719	13.200	77,6
Média ± dp	23,1	21.985	0,03	960	2.067	9,4	194.126	0,03	8.434	12.600	83,8
	±1,7	±4.263	±0,00	±242	±493	±1,3	±5.410	±0,00	±861	±794	±7,0
<i>C. durissus</i>											
Adultos											
Cdurt190508-11	55,1	36.898	0,03	670	1.296	6,7	-	-	-	-	-
Cdurt181213-7	49,7	-	-	-	-	-	323.312	0,03	6.505	10.370	91,7
Cdurt190628-15	48,3	-	-	-	-	-	290.315	0,04	6.011	9.599	82,6
Cdurt191213-17	41,8	33.563	0,03	803	1.451	12,2	313.665	0,03	7.504	11.512	90,3
Cdurt191213-18	39,5	32.502	0,03	823	1.605	9,3	265.526	0,03	6.722	10.247	87,9
Média ± dp	46,9	34.321	0,03	765	1.451	9,4	298.205	0,04	6.686	10.432	88,1
	±6,3	±2.294	±0,00	±83	±155	±2,8	±25.817	±0,01	±622	±795	±4,0
Jovens											
Cdurt180927-5	44,1	19.663	0,03	582	1.289	5,7	-	-	-	-	-
Cdurt181213-9	32,8	21.467	0,03	671	1.600	6,7	-	-	-	-	-
Média ± dp	38,5	20.565	0,03	627	1.445	6	-	-	-	-	-
	±8,0	±1.276	-	±63	±220	±1	-	-	-	-	-
Filhotes											
Cdurt200131-35	23,3	37.023	0,04	1.589	3.800	10,5	294.195	0,04	12.626	19.700	83,8
Cdurt200131-39	23,1	24.160	0,04	1.046	2.300	6,3	331.244	0,03	14.340	23.600	86,4
Cdurt191213-22	22,4	30.016	0,05	1.340	2.900	9,9	269.625	0,03	12.037	19.400	89,3
Cdurt200124-21	25,0	30.126	0,04	1.205	2.600	9,6	255.453	0,04	10.218	17.100	81,4
Média ± dp	23,5	30.331	0,04	1.295	2.900	9,1	287.629	0,03	12.305	19.950	85,2
	±1,1	±5.260	±0,00	±230	±648	±1,9	±33.190	±0,00	±1700	±2.696	±3,4

Nota. dp, desvio padrão; mm, milímetro; CE, coeficiente de erro de Scheaffer.



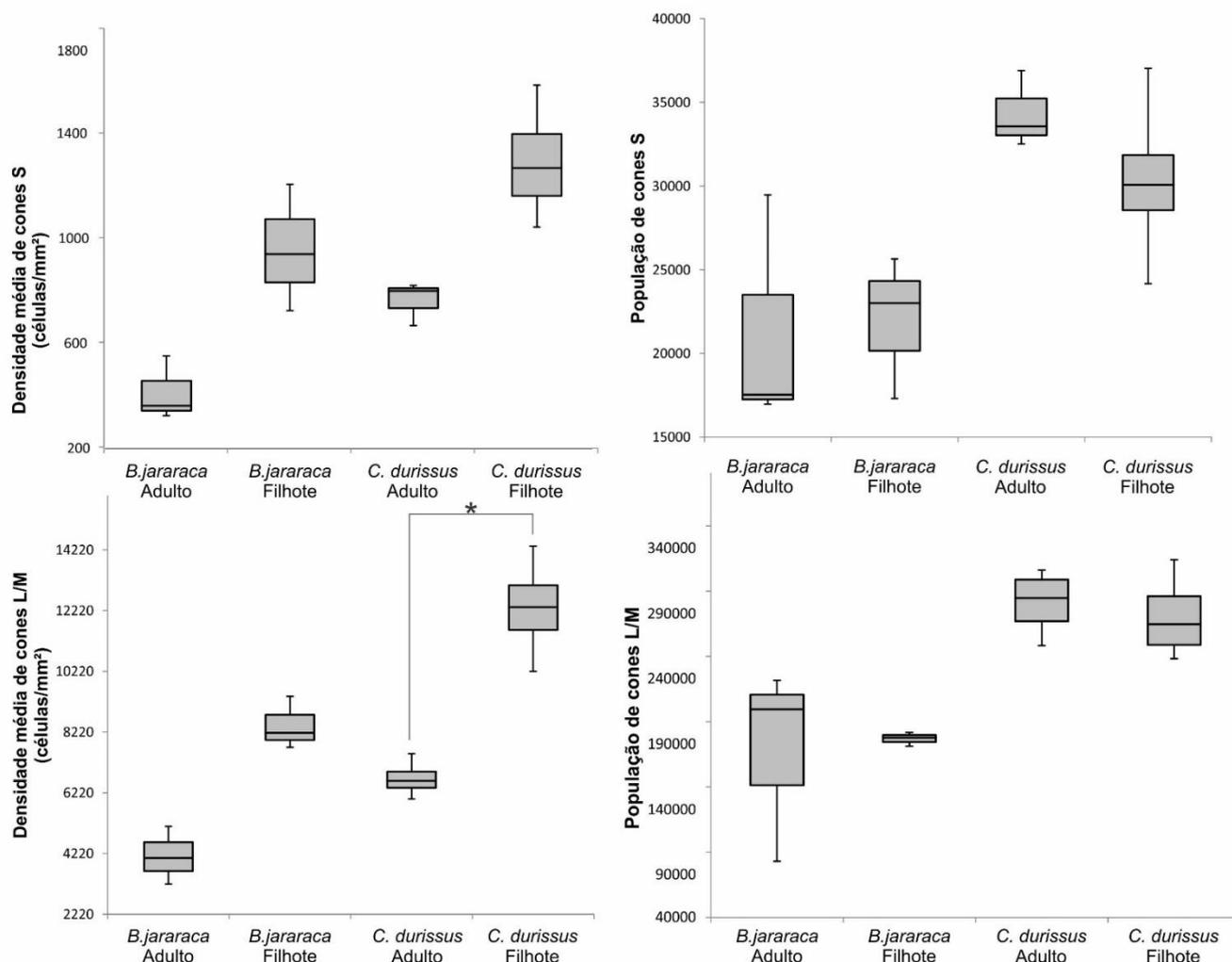
**Figura 21:** Densidade média e população de cones S e de cones L/M de retinas de *B. jararaca* adultos (●) e filhotes (◆) e de *C. durissus* adultos (■), jovens (⊠), e filhotes (▲).

Tabela 10

**Dados das análises estatísticas da população total e densidade média de cones S e cones L/M de adultos e filhotes de *B. jararaca* e *C. durissus*.**

Variável	Grupo	Cones S					Cones L/M				
		Mann-Whitney		Teste t			Mann-Whitney		Teste t		
		U	p-valor	t	gl	p-valor	U	p-valor	t	gl	p-valor
Densidade Média (células/mm <sup>2</sup> )	Bjar Adulto/Bjar Filhote	0	0,10	-3,49	4	0,03	0	0,10	-5,80	4	< 0,01
	Cdur Adulto/Cdur Filhote	0	0,06	-3,73	5	0,01	0	0,03	-6,21	6	< 0,001
	Bjar Adulto/Cdur Adulto	0	0,10	-4,11	4	0,01	0	0,06	-4,33	5	0,01
	Bjar Filhote/Cdur Filhote	2	0,23	-1,87	5	0,12	0	0,06	-3,56	5	0,02
População Total	Bjar Adulto/Bjar Filhote	4	1,00	-0,14	4	0,90	6	0,70	-0,20	4	0,86
	Cdur Adulto/Cdur Filhote	9	0,40	1,21	5	0,28	9	0,89	0,50	6	0,63
	Bjar Adulto/Cdur Adulto	0	0,10	-3,03	4	0,04	0	0,06	-2,51	5	0,11
	Bjar Filhote/Cdur Filhote	1	0,11	-2,24	5	0,08	0	0,06	-4,72	5	0,01

*Nota.* Bjar, *B. jararaca*; Cdur, *C. durissus*; U, teste não paramétrico de Mann-Whitney; t, teste t-Student, gl, grau de liberdade.



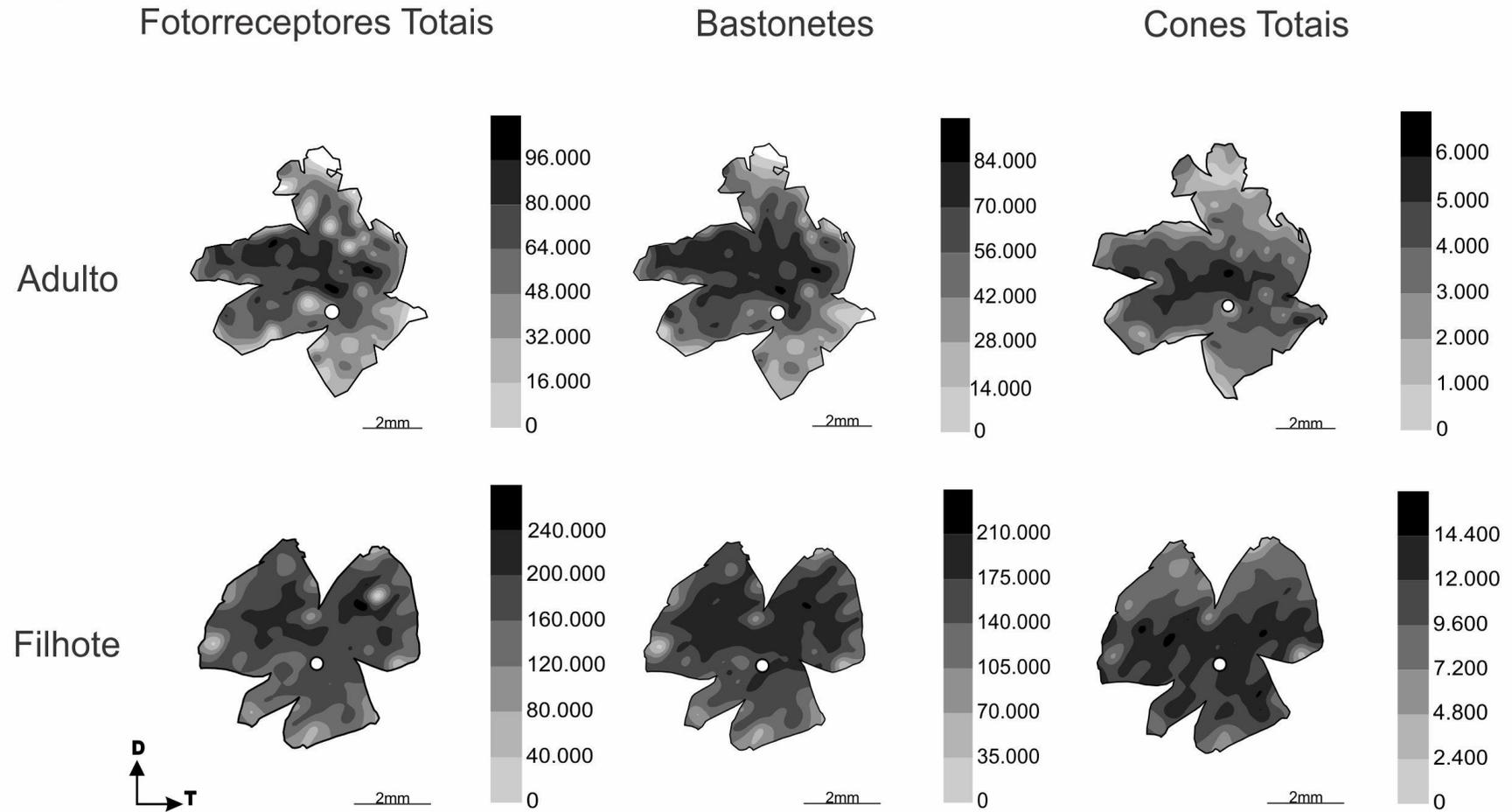
**Figura 22:** Boxplots mostrando as variações de densidade média e de população de cones S e cones L/M de indivíduos adultos e filhotes de *B. jararaca* e de *C. durissus*. Os grupos que apresentaram diferenças significativas com base no teste U de Mann-Whitney, estão representados por um asterisco (\*).

### 5.3. Topografia de Fotorreceptores

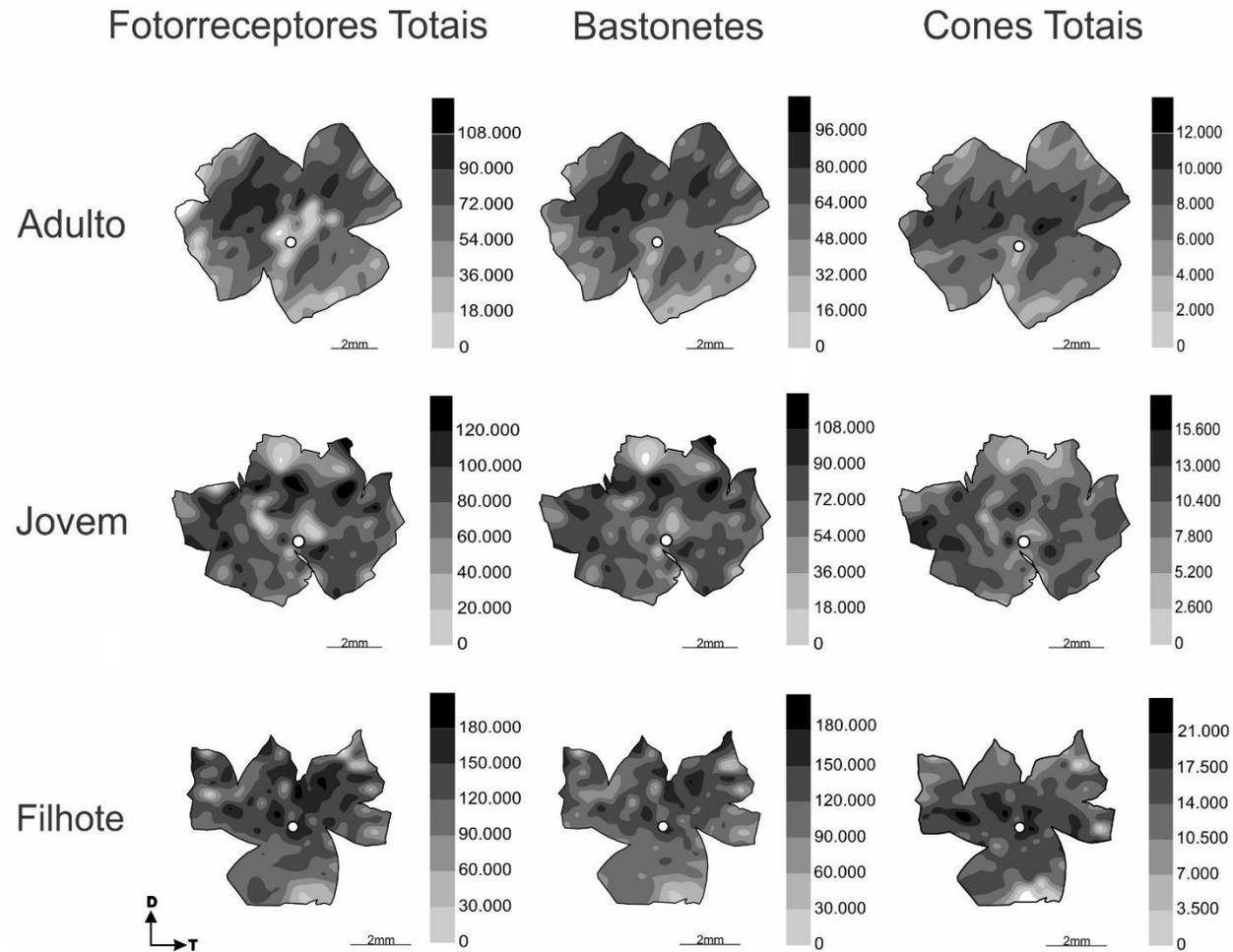
Os mapas de isodensidade de fotorreceptores totais de indivíduos adultos de *B. jararaca* revelaram uma faixa de maior densidade celular se estendendo ao longo do eixo equatorial da retina, com pico de densidade na região central (Figura 23). Nos mapas de indivíduos filhotes pode-se observar uma ampla região de alta densidade de células que abrange grande parte da retina, com picos de maior densidade na região dorsal (Figura 23). A distribuição de bastonetes foi semelhante àquela encontrada para o total de fotorreceptores em adultos e filhotes de *B. jararaca*, mas com contornos mais definidos. Nas retinas de adultos foi observada uma faixa de maior densidade de células que se estende ao longo do eixo nasal-temporal, com pico de densidade localizado na região temporal (Figura 23). Em retinas de filhotes de *B. jararaca* foi observada uma maior densidade de bastonetes na porção centro-dorsal da retina, exceto nas

regiões mais periféricas (Figura 23). A distribuição de cones em adultos de *B. jararaca* revelou uma faixa horizontal se estendendo ao longo do eixo nasal-temporal, com o pico de densidade na região central da retina (Figura 23). Já nos mapas de filhotes da mesma espécie foi observada uma área de maior densidade na região central e ventral da retina, de forma oposta ao observado para os bastonetes (Figura 23).

Nos mapas das retinas de indivíduos adultos de *C. durissus*, os fotorreceptores ocupam uma espessa área alongada que se estende pelo eixo nasal-temporal, deslocada para a região dorsal, com pico de fotorreceptores na região dorso-nasal da retina (Figura 24). Em indivíduos jovens pode-se observar uma faixa horizontal semelhante, pouco definida, e deslocada para a porção dorsal da retina, com pico de densidade na região dorso-temporal (Figura 24). Nas retinas de filhotes observa-se uma distribuição difusa, também com maior densidade na região dorsal (Figura 24). A distribuição de bastonetes de adultos de *C. durissus* mostrou uma área de maior densidade ao longo do eixo nasal-temporal, também deslocada para a região dorsal (Figura 24). Retinas de indivíduos jovens apresentaram uma faixa horizontal pouco definida, com as regiões de alta densidade celular nas áreas dorsal-nasal (Figura 24). Nas retinas de filhotes de *C. durissus* foi observada uma distribuição de bastonetes pouco definida, com maior densidade de células na porção dorsal da retina (Figura 24). Nos mapas de cones totais em retinas de adultos de *C. durissus*, foi observada uma faixa visual com maior densidade de células na região central da retina (Figura 24). Em jovens e filhotes foi observada uma distribuição pouco definida e relativamente difusa, e com áreas de maior densidade na região central próximo ao nervo óptico e na região nasal (Figura 24).

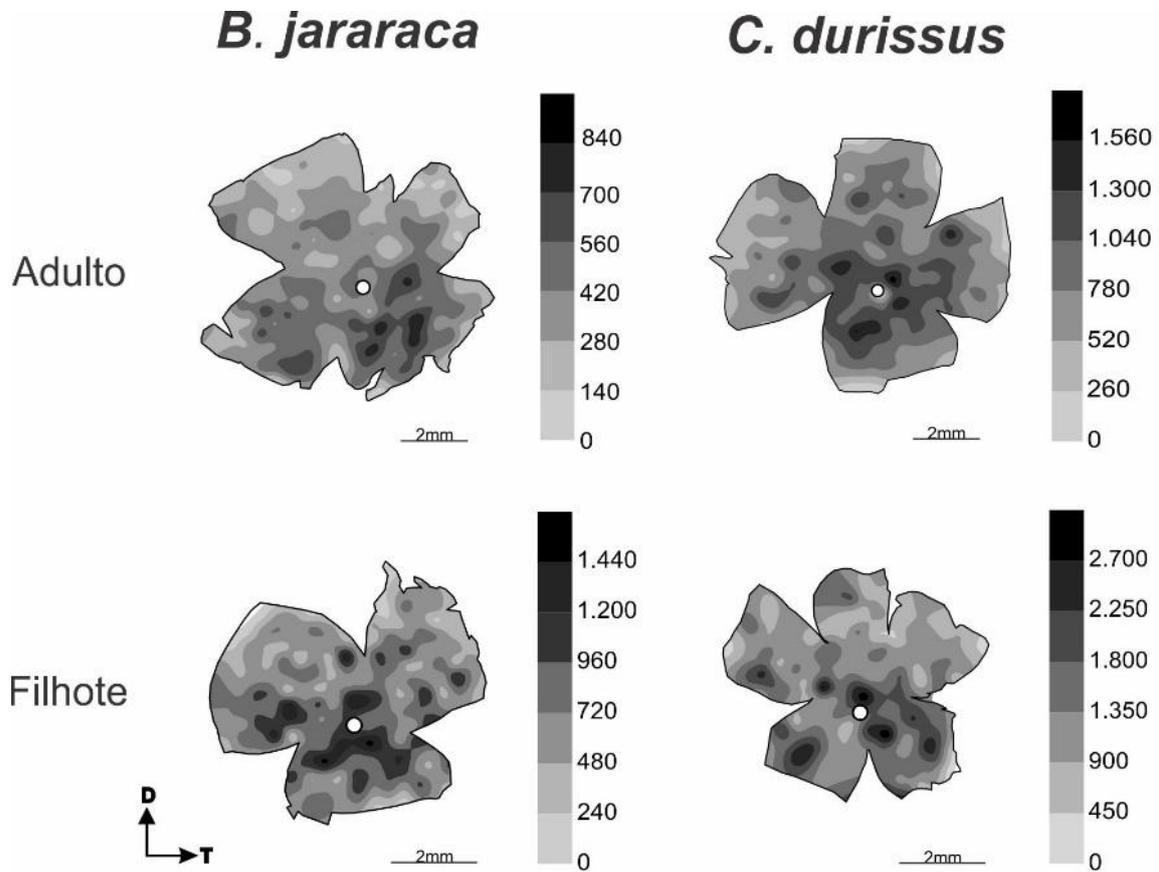
***B. jararaca***

**Figura 23:** Mapas de isodensidade de fotorreceptores totais, bastonetes e cones totais de retinas de *B. jararaca* adulta (Bjar180803-2) e filhote (Bjar191213-26). Os gradientes de cinza com tonalidades mais escuras representam as áreas com maior densidade. Barras de escala de cinza indicam densidade de células/mm<sup>2</sup>. Os discos brancos representam a posição do nervo óptico na retina. D, dorsal; T, temporal.

***C. durissus***

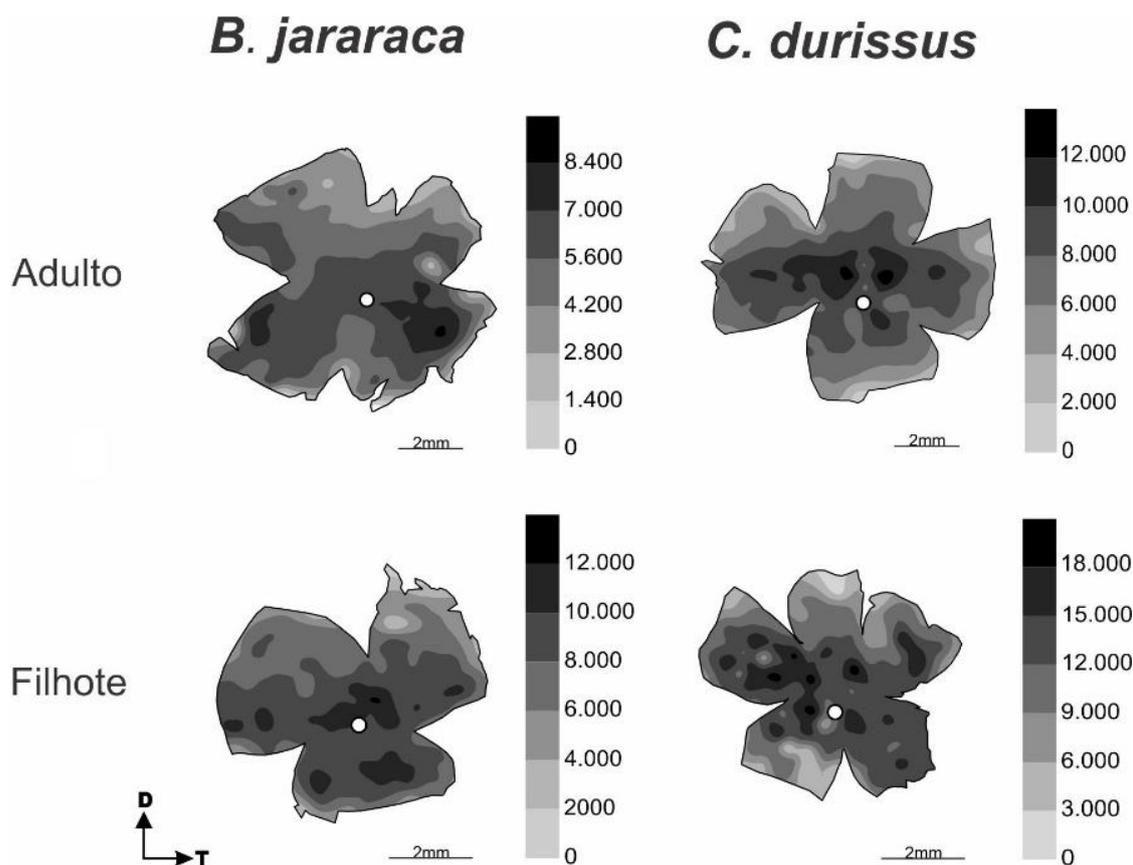
**Figura 24:** Mapas de isodensidade de fotorreceptores totais, bastonetes e cones totais das retinas de *C. durissus* adulto (Cdur181213-7), jovem (Cdur181213-9) e filhote (Cdur200124-21). Os gradientes de cinza com tonalidades mais escuras representam as áreas com maior densidade. Barras de escala de cinza indicam densidade de células/mm<sup>2</sup>. Os discos brancos representam a posição do nervo óptico na retina. D, dorsal; T, temporal.

Os mapas de distribuição de cones S de indivíduos adultos e filhotes tanto de *B. jararaca* quanto de *C. durissus*, apresentam um padrão de distribuição sem especialização definida, com maior densidade celular na região central ou ventral das retinas (Figura 25).



**Figura 25:** Mapas de distribuição de cones S em retinas de adultos e filhotes de *B. jararaca* (Bjar191213-29 e Bjar191213-30, respectivamente) e de *C. durissus* (Cdurt191213-17 e Cdurt191213-22, respectivamente). Os gradientes de cinza com tonalidades mais escuras representam as áreas com maior densidade de células. Barras de escala de cinza indicam densidade de células/mm<sup>2</sup>. Os círculos brancos representam a posição do nervo óptico na retina. D, dorsal; T, temporal.

Os mapas de isodensidade de cones L/M de adultos e filhotes de *B. jararaca* revelaram uma distribuição não definida, com maior densidade no quadrante ventral das retinas (Figura 26). Em adultos de *C. durissus*, pode-se observar uma faixa visual de cones L/M ao longo do eixo meridional, com picos de densidade na região central (Figura 26). Os mapas de indivíduos filhotes apresentaram uma distribuição difusa com uma ampla região de maior densidade de cones L/M com picos na região dorsal-nasal da retina (Figura 26).



**Figura 26:** Mapas de distribuição de cones L/M em retinas de adultos e filhotes de *B. jararaca* (Bjar191213-29 e Bjar191213-30, respectivamente) e de *C. durissus* (Cdurt191213-17 e Cdurt191213-22, respectivamente). Os gradientes de cinza com tonalidades mais escuras representam as áreas com maior densidade de células. Barras de escala de cinza indicam densidade de células/mm<sup>2</sup>. Os círculos brancos representam a posição do nervo óptico na retina. D, dorsal; T, temporal.

#### 5.4. Densidade e Topografia das Células da CCG

As análises de densidade e topografia de células da CCG foram realizadas a partir de 13 retinas de *B. jararaca* (4 adultos e 9 filhotes), e de 12 retinas de *C. durissus* (6 adultos e 6 filhotes). Os parâmetros utilizados para a contagem das células da CCG, bem como informações sobre a área da retina e a área amostrada das retinas (*area of sampling fraction, asf*) podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11

**Parâmetros utilizados para as análises estereológicas da população de células CCG de retinas de *B. jararaca* e *C. durissus*.**

Espécies	Área da retina (mm <sup>2</sup> )	Nº de sítios contados	Área de amostragem (µm)	Grade de amostragem	Objetiva	asf
<i>B. jararaca</i>						
Adultos						
Bjar180803-3	39,6	203	75x75	400X400	63x oil	0,029
Bjar180803-4	32,6	229	75x75	350x350	63x oil	0,039
Bjar190518-21	47,8	292	75x75	400X400	63x oil	0,034
Bjar181213-9	31,8	250	75x75	350x350	63x oil	0,044
Média ± dp	38,0 ± 7,4	244 ± 38				0,036 ± 0,007
Filhotes						
Bjar191204-24	16,9	185	75x75	300x300	63x oil	0,062
Bjar190327-18	16,6	259	75x75	250x250	63x oil	0,088
Bjar190327-17	14,3	206	75x75	250X250	63x oil	0,081
Bjar191127-22	19,1	204	75x75	300x300	63x oil	0,060
Bjar190327-16	17,0	270	75x75	250X250	63x oil	0,089
Bjar190312-11	15,5	247	75x75	250X250	63x oil	0,087
Bjar190327-12	15,6	233	75x75	250X250	63x oil	0,082
Bjar190327-13	19,3	214	75x75	300x300	63x oil	0,063
Média ± dp	16,8 ± 1,7	227,3 ± 29,8				0,076 ± 0,013
<i>C. durissus</i>						
Adultos						
Cdurc180220-2	61,5	194	75x75	550X550	63x oil	0,018
Cdurt190628-14	40,4	188	75x75	450x450	63x oil	0,029
Cdurt190628-15	49,2	296	75x75	400X400	63x oil	0,034
Cdurt180820-1	49,0	184	75x75	450x450	63x oil	0,021
Cdur191213-16	37,5	226	75x75	400X400	63x oil	0,034
Cdurt180927-4	43,9	215	75x75	350x350	63x oil	0,027
Média ± dp	46,9 ± 8,5	217,2 ± 41,9				0,027 ± 0,007
Filhotes						
Cdurt200131-33	19,6	210	75x75	300x300	63x oil	0,060
Cdurt200131-31	21,9	175	75x75	350x350	63x oil	0,045
Cdurt200124-25	21,5	171	75x75	350x350	63x oil	0,045
Cdurt200124-20	23,9	182	75x75	350x350	63x oil	0,043
Cdurt200124-21	20,3	216	75x75	300x300	63x oil	0,060
Cdurt200124-19	19,2	199	75x75	300x300	63x oil	0,058
Média ± dp	21,1 ± 1,7	192,2 ± 18,9				0,052 ± 0,008

Nota. dp, desvio padrão; asf, area sampling fraction

A população total de células da CCG não apresentou diferenças significativas entre adultos e filhotes de *B. jararaca*, com  $181.591 \pm 21.413$  e  $164.609 \pm 18.929$  células, respectivamente ( $U = 21$ ;  $p = 0,46$ ). Em retinas de adultos e filhotes de *C. durissus* também não foi observada diferença significativa, com  $215.146 \pm 33.521$  células em adultos e  $203.137 \pm 14.627$  células em filhotes ( $U = 22$ ;  $p = 0,59$ ) (Tabela 12, Tabela 13, Figura 28). A comparação da população total de adultos de *B. jararaca* e *C. durissus* não apresentou diferença significativa ( $U = 5$ ;  $p = 0,17$ ), mas diferenças foram observadas entre os filhotes das duas espécies, com valores mais altos em *C. durissus* ( $U = 2$ ;  $p < 0,01$ ) (Tabela 12, Tabela 13, Figura 28). A densidade média das células da CCG foi menor em retinas de adultos de *B. jararaca*, com  $4.877 \pm 1.086$  células/mm<sup>2</sup> comparado aos filhotes da mesma espécie, com  $9.773 \pm 878$  células/mm<sup>2</sup> ( $U = 0$ ;  $p < 0,01$ ) (Tabela 12, Tabela 13, Figura 28). Em *C. durissus*,

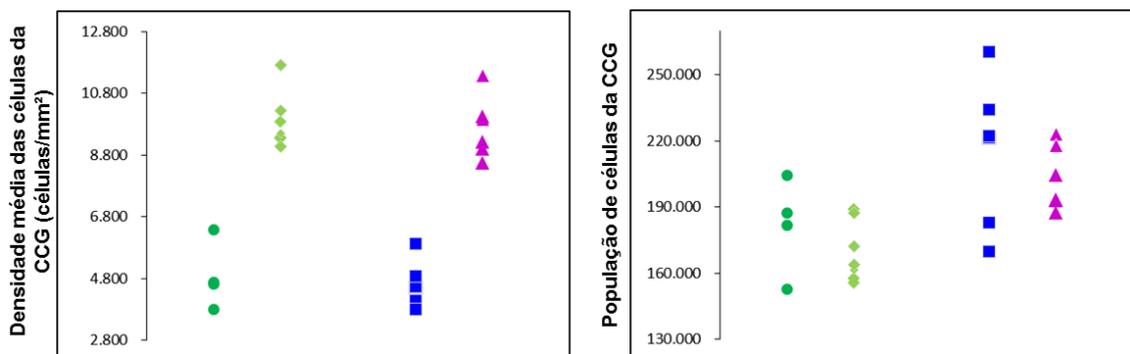
a densidade média também apresentou diferenças significativas entre adultos e filhotes, com  $4.640 \pm 722$  células/mm<sup>2</sup> e  $9.691 \pm 1.005$  células/mm<sup>2</sup>, respectivamente ( $U = 0$ ;  $p < 0,01$ ) (Tabela 12, Tabela 13, Figura 28). Entre os indivíduos adultos, não houve diferenças significativas ( $U = 14$ ;  $p = 0,76$ ), bem como entre os indivíduos filhotes das duas espécies ( $U = 27$ ;  $p = 0,75$ ) (Tabela 12, Tabela 13, Figura 28). Os gráficos da Figura 27 mostram as variações da densidade média e da população de células da CCG nas retinas de *B. jararaca* e *C. durissus*.

Tabela 12

**Dados das análises estereológicas da população de células CCG de retinas de *B. jararaca* e *C. durissus*.**

Espécies	Área da retina (mm <sup>2</sup> )	População Total	CE	Densidade Média (células/mm <sup>2</sup> )	Densidade Máxima (células/mm <sup>2</sup> )
<i>B. jararaca</i>					
Adultos					
Bjar190518-21	47,8	181.812	0,02	3.804	7.111
Bjar180803-3	39,6	187.201	0,04	4.680	10.489
Bjar181213-9	31,8	204.436	0,03	6.389	10.311
Bjar180803-4	32,6	152.918	0,04	4.634	9.956
Média ± dp	38,0 ± 7,4	181.591 ± 21.413	0,03 ± 0,01	4.877 ± 1.086	9.467 ± 1.586
Filhotes					
Bjar191204-24	16,9	157.693	0,03	9.331	17.956
Bjar190327-18	16,6	155.611	0,02	9.374	15.822
Bjar190327-17	14,3	129.900	0,03	9.084	16.178
Bjar191127-22	19,1	188.770	0,03	9.883	15.467
Bjar190327-16	17,0	161.431	0,02	9.496	16.000
Bjar190312-11	15,5	187.434	0,02	11.715	18.133
Bjar190327-12	15,6	163.733	0,03	10.233	16.711
Bjar190327-13	19,3	172.298	0,03	9.068	14.933
Média ± dp	16,8 ± 1,7	164.609 ± 18.929	0,03 ± 0,00	9.773 ± 878	16.400 ± 1.139
<i>C. durissus</i>					
Adultos					
Cdurt190628-15	49,2	221.415	0,03	4.500	9.778
Cdurt190628-14	40,4	169.661	0,04	4.200	11.556
Cdurt191213-16	37,5	182.861	0,03	4.876	9.778
Cdurt180820-1	49,0	222.181	0,05	4.534	11.022
Cdurt180927-4	43,9	260.425	0,04	5.919	10.133
Cdurt180220-2	61,5	234.334	0,04	3.810	7.289
Média ± dp	46,9 ± 8,5	215.146 ± 33.521	0,04 ± 0,01	4.640 ± 722	9.926 ± 1.476
Filhotes					
Cdurt200131-33	19,6	223.087	0,02	11.382	16.356
Cdurt200131-31	21,9	217.938	0,03	9.951	16.178
Cdurt200124-25	21,5	193.436	0,03	8.997	14.400
Cdurt200124-20	23,9	204.274	0,03	8.547	13.156
Cdurt200124-21	20,3	187.361	0,03	9.230	15.467
Cdurt200124-19	19,2	192.725	0,03	10.038	16.711
Média ± dp	21,1 ± 1,7	203.137 ± 14.627	0,03 ± 0,00	9.691 ± 1.005	15.378 ± 1.362

Nota. dp, desvio padrão; mm, milímetro; CE, coeficiente de erro de Scheaffer.



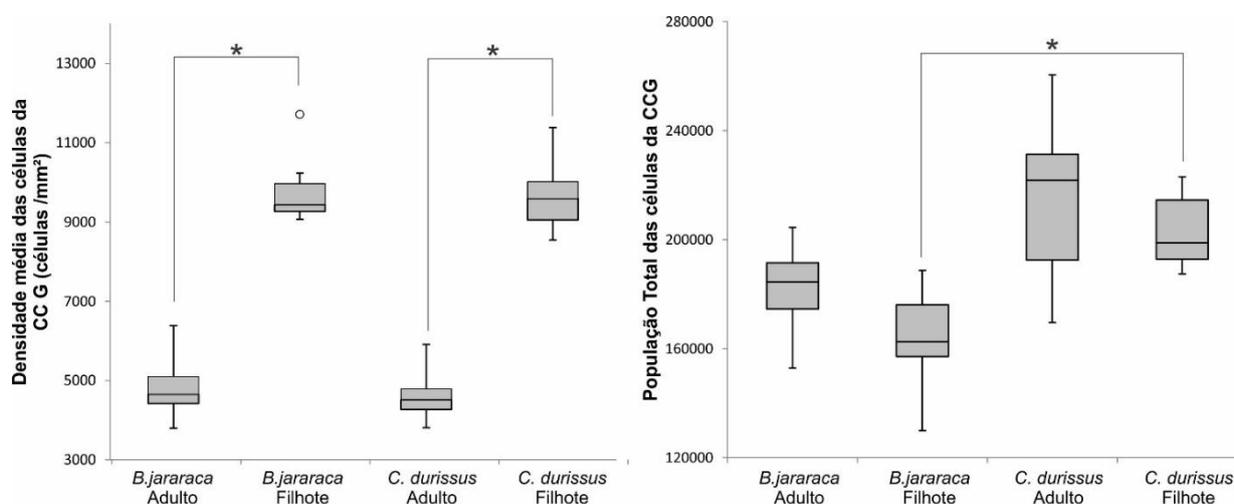
**Figura 27:** Densidade média e população de células da CCG nas retinas de *B. jararaca* adultos (●) e filhotes (◆) e de *C. durissus* adultos (■) e filhotes (▲).

Tabela 13

**Dados das análises estatísticas da população total e densidade média de células da CCG de adultos e filhotes de *B. jararaca* e *C. durissus*.**

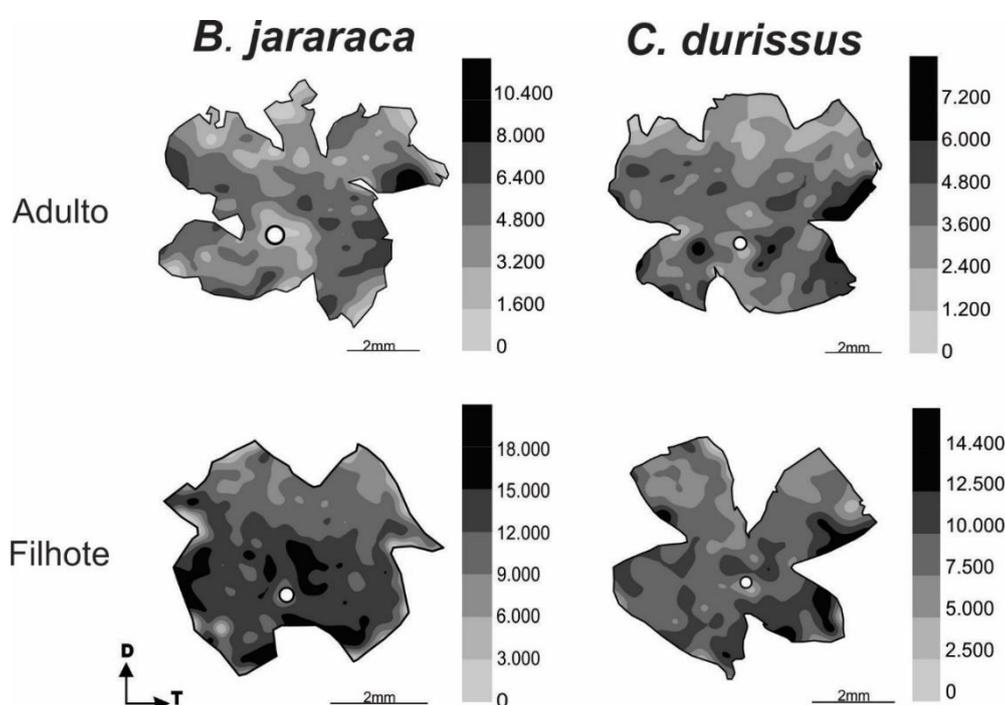
Variável	Grupo	Células da CCG				
		Mann-Whitney		Teste t		
		U	p-valor	t	gl	p-valor
Densidade Média (células/mm <sup>2</sup> )	Bjar Adulto/Bjar Filhote	0	< 0,01	-8,45	10	< 0,001
	Cdur Adulto/Cdur Filhote	0	< 0,01	-9,99	10	< 0,001
	Bjar Adulto/Cdur Adulto	14	0,76	0,41	8	0,69
	Bjar Filhote/Cdur Filhote	27	0,75	0,16	12	0,87
População Total	Bjar Adulto/Bjar Filhote	21	0,46	1,40	10	0,19
	Cdur Adulto/Cdur Filhote	22	0,59	0,80	10	0,44
	Bjar Adulto/Cdur Adulto	5	0,17	-1,75	8	0,12
	Bjar Filhote/Cdur Filhote	2	< 0,01	-4,13	12	< 0,001

Nota. Bjar, *B. jararaca*; Cdur, *C. durissus*; U, teste não paramétrico de Mann-Whitney t, teste *t-Student*; gl, grau de liberdade.



**Figura 28:** Boxplots mostrando as variações de densidade média e de população de células da CCG de indivíduos adultos e filhotes de *B. jararaca* e de *C. durissus*. Os grupos que apresentaram diferenças significativas com base no teste U de Mann-Whitney, estão representados por um asterisco (\*). O círculo representa o valor de *outlier*.

Os mapas de isodensidade de células da CCG de ambas as espécies apresentaram uma distribuição sem um padrão de especialização definido (Figura 29). Em indivíduos adultos de *B. jararaca* e de *C. durissus* foi observada uma faixa descontínua com uma maior densidade de células que se estende ao longo do eixo equatorial da retina, e um pico de densidade na região temporal em ambas as espécies (Figura 29). Em retinas de filhotes de *C. durissus* também não foi observada especialização definida, mas da mesma forma que na retina de indivíduos adultos, o pico de densidade de células da CCG foi observado na região temporal (Figura 29). Por outro lado, em indivíduos filhotes de *B. jararaca* foi observada maior densidade de células na porção ventral das retinas (Figura 29).

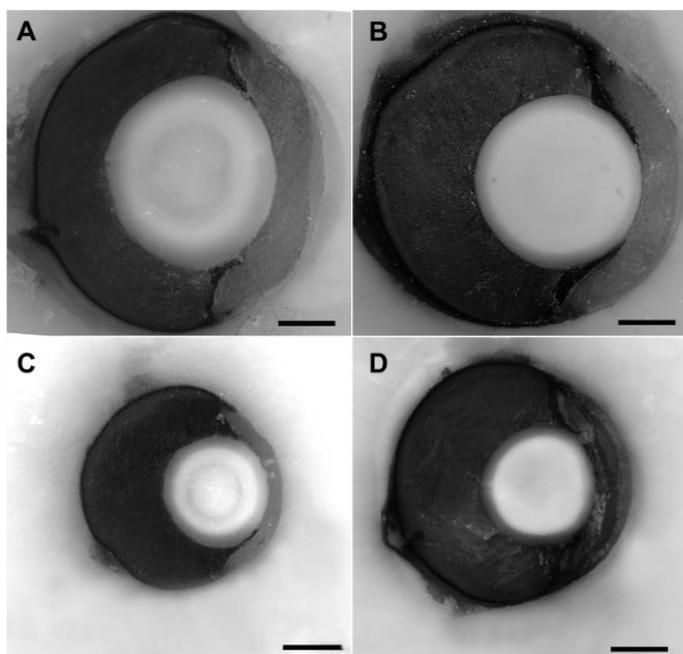


**Figura 29:** Mapas de isodensidade das células da CCG de retinas de indivíduos adultos e filhotes de *B. jararaca* (Bjar180803-3 e Bjar190312-11, respectivamente) e de *C. durissus* (Cdurc180220-2 e Cdurt200124-25, respectivamente). Os gradientes de cinza com tonalidades mais escuras representam as áreas com maiores densidades de células. Barras de escala de cinza indicam a densidade de células/mm<sup>2</sup>. Os discos brancos representam a posição do nervo óptico na retina. D, dorsal; T, temporal.

### 5.5. Estimativa da Acuidade Visual

Para análise da distância posterior nodal (PND) dos olhos das espécies investigadas foi utilizado um olho de um indivíduo adulto e um olho de filhote de *B. jararaca*, bem como um olho de indivíduo adulto e dois olhos de filhotes de *C. durissus* (Figura 30). O valor de PND foi estimado em 50% do tamanho do olho do indivíduo adulto de *B. jararaca* (Figura 30<sup>a</sup>) e em 67% do tamanho do olho no indivíduo filhote (Figura 30C). Em *C. durissus* o PND foi estimado em 60% tanto em indivíduos adultos (Figura 30B), quanto em filhotes (Figura

30D). Dados de CRC, diâmetro do olho e as estimativas do PND para as duas espécies estão descritos na Tabela 14.



**Figura 30:** Corte transversal do olho de indivíduo adulto (A) e filhote (C) de *B. jararaca* e adulto (B) e filhote (D) de *C. durissus*. Barras de escala: 1 mm.

Tabela 14

**Dados dos indivíduos utilizados para as estimativas do PND de adultos e filhotes de *B. jararaca* e *C. durissus*.**

Espécies	CRC (mm)	CC (mm)	Diâmetro do olho (mm)	PND
<i>B. jararaca</i>				
Adulto				
Bjar190518-21	1170	180	5,46	50%
Filhote				
Bjar191127-22	263	40	3,29	67%
<i>C. durissus</i>				
Adulto				
Cdur191213-16	760	124	5,66	60%
Filhote				
Cdurt200124-19	300	33	3,87	60%
Cdurt200124-20	310	34	3,72	60%

*Nota.* CRC, comprimento rostro-cloacal; CC, comprimento cloacal; mm, milímetros; PND, distância posterior nodal.

A densidade de células da CCG é um fator limitante da resolução espacial do olho. Portanto, a acuidade visual foi estimada a partir do pico de densidade de células da CCG de cada retina quantificada (Tabela 15), combinada com o valor da distância focal do olho. O valor de PND de cada olho foi estimado com base no diâmetro do olho (Tabela 15), e

considerando os valores da distância focal medidos dos olhos de indivíduos adultos e filhotes de *B. jararaca* e *C. durissus* descritos na Tabela 14.

As estimativas da acuidade visual foram realizadas tanto para um possível arranjo quadrado das células da CCG, quanto um possível arranjo hexagonal. Para indivíduos adultos de *B. jararaca*, a acuidade visual foi estimada em  $2,1 \pm 0,2$  ciclos por grau (cpg) ou  $2,2 \pm 0,2$  cpg, considerando um arranjo celular quadrado ou hexagonal, respectivamente (Tabela 15, Tabela 16, Figura 31). Filhotes apresentaram valores semelhantes, de  $2,2 \pm 0,2$  cpg, considerando arranjo quadrado ( $U = 10$ ;  $p = 0,37$ ), e de  $2,4 \pm 0,1$  cpg considerando arranjo hexagonal ( $U = 10$ ;  $p = 0,36$ ) (Tabela 15, Tabela 16, Figura 31). Para indivíduos adultos de *C. durissus* a acuidade visual foi estimada em  $2,7 \pm 0,2$  cpg e em  $2,9 \pm 0,2$  cpg, considerando o arranjo quadrado e hexagonal, respectivamente (Tabela 15). Em indivíduos filhotes de *C. durissus*, a acuidade visual estimada foi significativamente menor comparado aos adultos, em  $2,2 \pm 0,2$  cpg considerando um arranjo quadrado ( $U = 29$ ;  $p = 0,001$ ), e em  $2,3 \pm 0,2$  cpg considerando um arranjo hexagonal ( $U = 29,5$ ;  $p = 0,01$ ) (Tabela 15, Tabela 16). Entre adultos das duas espécies foi observada diferença significativa, com acuidade maior estimada para *C. durissus* ( $U = 0$ ;  $p = 0,01$ ) (Tabela 16), entretanto, filhotes não apresentaram diferenças significativas (Figura 31).

Tabela 15

**Acuidade visual de *B. jararaca* e *C. durissus*.**

Espécies	Área da retina (mm <sup>2</sup> )	Diâmetro do olho (mm)	Densidade Máxima (células/mm <sup>2</sup> )	PND (mm)	Acuidade Visual (cpg)	
					Arranjo Quadrado	Arranjo Hexagonal
<i>B. jararaca</i>						
Adultos						
Bjar180803-3	39,6	5,0	10.489	2,52	2,3	2,4
Bjar180803-4	32,6	5,1	9.956	2,56	2,2	2,4
Bjar190518-21	47,8	5,4	7.111	2,70	2,0	2,1
Bjar181213-9	31,8	4,2	10.311	2,08	1,8	2,0
Média ± dp	38,0 ± 7,4	4,9 ± 0,5	9.467 ± 1.586	2,46 ± 0,27	2,1 ± 0,2	2,2 ± 0,2
Filhotes						
Bjar191204-24	16,9	3,2	17.956	2,15	2,6	2,7
Bjar190327-18	16,6	2,8	15.822	1,90	2,1	2,2
Bjar190327-17	14,3	2,7	16.178	1,81	2,0	2,2
Bjar191127-22	19,1	3,4	15.467	2,24	2,4	2,6
Bjar190327-16	17,0	2,7	16.000	1,84	2,0	2,2
Bjar190312-11	15,5	3,0	18.133	2,01	2,4	2,5
Bjar190327-12	15,6	2,7	16.711	1,79	2,0	2,2
Bjar190327-13	19,3	3,0	14.933	2,01	2,1	2,3
Média ± dp	16,8 ± 1,7	2,9 ± 0,2	16.400 ± 1.139	1,97 ± 0,17	2,2 ± 0,2	2,4 ± 0,2
<i>C. durissus</i>						
Adultos						
Cdurc180220-2	61,5	6,1	7.289	3,67	2,7	2,9
Cdurt190628-14	40,4	5,2	11.556	3,12	2,9	3,1
Cdurt190628-15	49,2	5,2	9.778	3,12	2,7	2,9
Cdurt180820-1	49,0	4,4	11.022	2,62	2,4	2,6
Cdur191213-16	37,5	5,3	9.778	3,18	2,7	2,9
Cdurt180927-4	43,9	4,7	10.133	2,80	2,5	2,6
Média ± dp	46,9 ± 8,5	5,2 ± 0,6	9.926 ± 1.476	3,09 ± 0,36	2,7 ± 0,2	2,9 ± 0,2
Filhotes						
Cdurt200131-33	19,6	3,3	16.356	1,99	2,2	2,4
Cdurt200131-31	21,9	-	16.178	-	-	-
Cdurt200124-25	21,5	3,3	14.400	1,99	2,1	2,2
Cdurt200124-20	23,9	3,2	13.156	1,91	1,9	2,1
Cdurt200124-21	20,3	3,7	15.467	2,20	2,4	2,6
Cdurt200124-19	19,2	3,2	16.711	1,94	2,2	2,4
Média ± dp	21,1 ± 1,7	3,4 ± 0,2	15.378 ± 1.362	2,01 ± 0,11	2,2 ± 0,2	2,3 ± 0,2

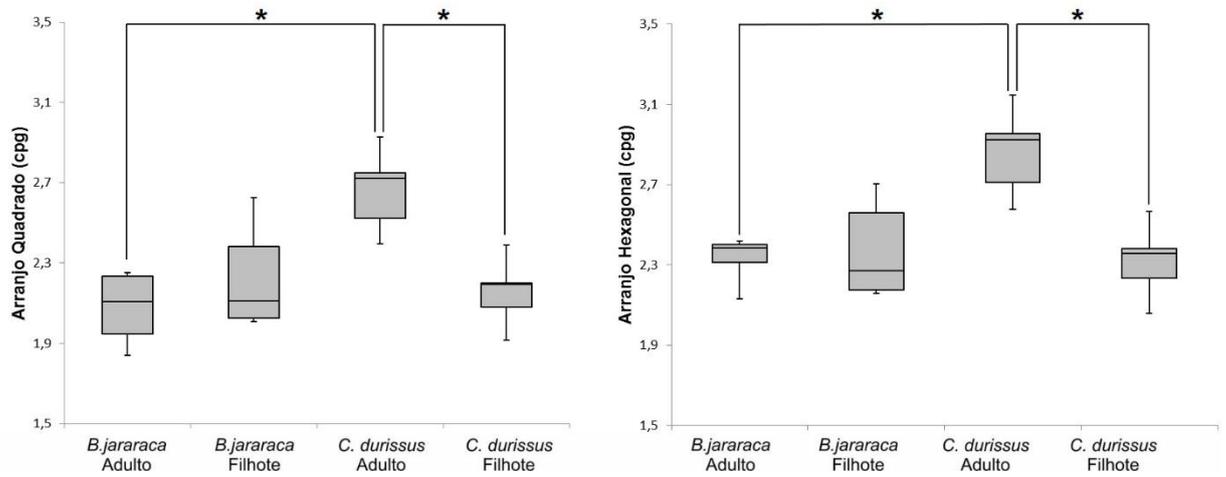
Nota. dp, desvio padrão; mm, milímetros; PND, distância posterior nodal; cpg, ciclos por grau.

Tabela 16

**Análises estatísticas das comparações da acuidade visual de adultos e filhotes de *B. jararaca* e *C. durissus*.**

Variável	Grupo	Arranjo Quadrado					Arranjo Hexagonal				
		Mann-Whitney		Teste t			Mann-Whitney		Teste t		
		U	p-valor	t	gl	p-valor	U	p-valor	t	gl	p-valor
Acuidade Visual (cpg)	Bjar Adulto/Bjar Filhote	10	0,37	-0,983	10	0,35	10	0,36	1,04	10	0,32
	Cdur Adulto/Cdur Filhote	29,5	0,01	4,542	9	< 0,01	29	0,01	4,17	9	< 0,01
	Bjar Adulto/Cdur Adulto	0	0,01	-4,577	8	< 0,01	0	0,01	4,569	8	< 0,01
	Bjar Filhote/Cdur Filhote	22	0,82	0,328	11	0,75	20	1,00	0,371	11	0,72

Nota. cpg, ciclos por grau; Bjar, *B. jararaca*; Cdur, *C. durissus*; U, teste não paramétrico de Mann-Whitney; t, teste *t-Student*; gl, grau de liberdade.



**Figura 31:** Boxplots mostrando as variações da acuidade visual estimadas com base no pico de densidade de células da camada de células ganglionares (CCG), considerando um arranjo quadrado (esquerda) ou um arranjo hexagonal (direita), em indivíduos adultos e filhotes de *B. jararaca* e de *C. durissus*. Os grupos que apresentaram diferenças significativas com base no teste U de Mann-Whitney estão representados por um asterisco (\*). cpg, ciclos por grau.

## 6. Discussão

Neste estudo foram comparados aspectos morfológicos de retinas íntegras de duas espécies de serpentes da família Viperidae, *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus*, em diferentes fases da vida. As análises mostraram diferenças nos valores de densidade e na distribuição dos fotorreceptores e de células da camada de células ganglionares (CCG) entre as duas espécies de serpentes, entre indivíduos filhotes e entre adultos de cada espécie. As populações totais estimadas de fotorreceptores e de células da CCG apresentaram valores semelhantes entre adultos e entre filhotes de *B. jararaca* e de *C. durissus*. Entretanto, os valores de densidade média destas células foram maiores em filhotes em comparação aos adultos, devido ao menor tamanho do olho e da área da retina, refletindo, portanto, um maior empacotamento das células por área nas retinas de filhotes. Também foi observada diferença na densidade de cones, e na proporção destes fotorreceptores, entre as duas espécies estudadas.

As comparações dos padrões de distribuição dos neurônios mostraram algumas características e diferenças importantes que corroboram a hipótese deste estudo, de que mudanças ontogenéticas na composição da dieta e uso preferencial de habitat em *B. jararaca*, podem estar associadas a mudanças estruturais da retina ao longo da vida, sugerindo uma plasticidade morfológica do sistema visual em paralelo a mudanças ecológicas dos indivíduos. De maneira geral, e conforme será detalhado a seguir, foram observadas diferenças nas áreas de maior densidade de fotorreceptores e de células da CCG em retinas de filhotes e adultos de *B. jararaca*.

Estudos anteriores descreveram alguns aspectos morfológicos da estrutura das retinas das mesmas espécies investigadas neste estudo, *B. jararaca* (Bittencourt et al., 2019) e *C. durissus* (Bittencourt et al., 2019; Gower et al., 2019), além de outras espécies de serpentes viperídeas, *Causus rhombeatus*, *Bitis arietans* (Walls, 1942) e *Echis coloratus* (Gower et al., 2019). Nestas serpentes de hábitos noturnos e/ou crepusculares foi descrita a presença de retinas duplex, com predominância de bastonetes e três tipos morfológicos de cones: cones grandes simples e cones duplos, contendo o fotorpigmento LWS, e cones pequenos com o fotorpigmento SWS1 (Underwood, 1967; Walls, 1942, Bittencourt et al, 2019; Gower et al, 2019). Gower e colaboradores (2019) forneceram dados da estimativa da densidade de fotorreceptores a partir de análises de meias retinas de *C. durissus* e *E. coloratus*, aplanadas sobre lâminas e marcadas por imunohistoquímica. Entretanto, o presente estudo é o primeiro a descrever de forma comparativa e sistemática, a densidade e distribuição de células em

retinas íntegras de viperídeos, tendo em vista a investigação de variações morfológicas associadas a mudanças ontogenéticas ecológicas e comportamentais. Este também é o primeiro estudo a estimar a acuidade visual de serpentes viperídeas com base em caracteres anatômicos dos olhos.

### 6.1. Densidade e Topografia de Fotorreceptores

As análises da população de fotorreceptores totais (bastonetes e cones) revelaram diferenças nos valores de densidade média entre adultos e filhotes das duas espécies de serpentes. Menores valores de densidade média foram observados em adultos ( $72.871 \pm 16.053$  células/mm<sup>2</sup> em *B. jararaca* e  $75.267 \pm 11.483$  células/mm<sup>2</sup> em *C. durissus*) em relação aos filhotes ( $135.300 \pm 29.765$  células/mm<sup>2</sup> em *B. jararaca* e  $133.096 \pm 11.496$  células/mm<sup>2</sup> em *C. durissus*). Por outro lado, a população total de células foi semelhante entre adultos e entre filhotes das duas espécies, indicando que a menor densidade de células em adultos está relacionada com a maior área das retinas (Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, Tabela 7, Tabela 8). Ao longo do desenvolvimento, o tamanho do olho e a área da retina aumentam de tamanho, acompanhando o crescimento dos animais, porém a população total de fotorreceptores não aumenta proporcionalmente, permanecendo em cerca de 3.000.000 células (Tabela 7, Tabela 8).

Gower e colaboradores (2019) estimaram a densidade de fotorreceptores em partes de retinas planas das serpentes viperídeas *C. durissus* e *E. coloratus*, com densidade média estimada entre 134.000 e 225.000 células/mm<sup>2</sup> em *C. durissus*, e entre 116.000 e 178.000 células/mm<sup>2</sup> em *E. coloratus*. Estes valores foram semelhantes aos estimados neste estudo para retinas íntegras de filhotes de *C. durissus* e de *B. jararaca* (Tabela 7, Figura 19). Os valores obtidos para as serpentes Crotalinae deste estudo também foram próximos aos descritos para serpentes colubrídeas noturnas, com densidade variando de  $84.853 \pm 11.690$  células/mm<sup>2</sup> em *Sibynomorphus mikanii* a  $138.646 \pm 25.467$  células/mm<sup>2</sup> em *Dipsas bucephala* (Hauzman, 2014), e consideravelmente mais altos em relação aos descritos para serpentes diurnas que possuem retinas com apenas cones, com densidade média estimada em cerca de 10.000 células/mm<sup>2</sup> (Hauzman, 2014; Hauzman et al., 2014). Esta discrepância se deve à grande quantidade de bastonetes nas retinas das espécies estudadas, conforme esperado para serpentes de hábito noturno (Bittencourt et al., 2019; Davies et al., 2009; Gower et al., 2019; Sillman et al., 1997, 2001). A alta densidade de bastonetes nas retinas das espécies de viperídeos, que compõe cerca de 90% do total de fotorreceptores (Tabela 7), foi semelhante ao estimado para algumas espécies de colubrídeos noturnos, em que a

proporção de bastonetes foi de cerca de 74% na serpente fossorial *Atractus reticulatus*, 88% na terrestre *S. mikanii*, e 94% na arborícola *Dipsas bucephala* (Hauzman, 2014).

Com relação à população de cones, foram verificadas diferenças nos valores de densidade entre as duas espécies estudadas (Tabela 7, Figura 19). As retinas dos adultos e filhotes de *B. jararaca* apresentaram valores de densidade média mais baixos ( $4.641 \pm 860$  cones/mm<sup>2</sup> e  $9.927 \pm 949$  cones/mm<sup>2</sup>, respectivamente), quando comparados a adultos e filhotes de *C. durissus* ( $7.271 \pm 842$  cones/mm<sup>2</sup> e  $14.426 \pm 1.780$  cones/mm<sup>2</sup>, respectivamente) (Tabela 7, Figura 19). A porcentagem de cones com relação ao total de fotorreceptores foi menor em *B. jararaca*, com  $6,5\% \pm 0,7\%$  em adultos e  $7,5\% \pm 1,4\%$  em filhotes, em comparação com *C. durissus*, com  $9,8\% \pm 0,9\%$  em adultos e  $10,9\% \pm 0,8\%$  em filhotes (Tabela 7). Tal diferença na densidade e proporção de cones nas retinas de *B. jararaca* e *C. durissus* devem estar associadas com o ambiente ocupado e com o padrão de atividade das duas espécies. Apesar das duas espécies serem predominantemente noturnas, *C. durissus* pode apresentar atividade durante o dia, principalmente nas estações mais secas (Tozetti, 2006). Além disso, esta serpente ocupa ambientes de campo aberto do cerrado e de áreas desmatadas, onde a ocorrência de sombra e cobertura vegetal é semelhante com às do cerrado (Tozetti & Martins, 2008). Estes ambientes recebem maior incidência de luz, quando comparado ao ambiente florestado ocupado preferencialmente por *B. jararaca*, onde a luminosidade é mais restrita devido à composição vegetal, resultando em um ambiente menos iluminado (Jacobs, 1988; Januário et al., 1992; Muniz, 2004). Desta forma, a maior densidade e proporção de cones, fotorreceptores adaptados à visão em condições de maior luminosidade, podem trazer vantagens funcionais e favorecer a visão diurna e em ambientes de campos abertos ocupados por *C. durissus* (Tabela 7, Figura 19).

Os mapas de isodensidade de fotorreceptores totais de *B. jararaca* adultas revelaram uma espessa região de maior densidade de células que se estende ao longo do eixo nasal-temporal, em formato de faixa visual pouco definida, e com pico de densidade localizado na região central da retina (Figura 23). O mesmo padrão de distribuição foi observado ao analisar as populações de cones e de bastonetes separadamente. Distribuição semelhante foi descrita para diferentes espécies de serpentes de hábitos diurnos da família Colubridae, que habitam estrato terrestre (*Tomodon dorsatus* e *Echiantera undulata*), arborícola (*Philodryas olfersii*, *Chironius bicarinatus* e *Spilotes pullatus*) e semiaquático (*Erythrolamprus miliaris*) (Hauzman, 2014; Hauzman et al., 2014), indicando que a presença de faixa visual é amplamente observada em serpentes e deve representar grande importância para uma visão

panorâmica em diferentes ambientes. Por outro lado, em filhotes de *B. jararaca* foi observada uma maior densidade de fotorreceptores totais e de bastonetes na região dorsal da retina, enquanto uma maior densidade de cones foi observada na porção ventral (Figura 23). Estas diferenças marcantes no padrão de distribuição de cones e bastonetes de filhotes e adultos de *B. jararaca* podem estar relacionados com mudanças associadas, especialmente, ao uso preferencial de habitat e estratégia de caça. Indivíduos adultos de *B. jararaca* caçam no chão durante o período crepuscular e noturno (Sazima, 1992), e este comportamento pode ser favorecido por uma visão panorâmica do ambiente. Por outro lado, filhotes desta espécie caçam por espreita no estrato arbóreo, utilizando o engodo caudal para atrair anfíbios (Sazima, 1992; Sazima, 2006). A maior densidade de bastonetes na retina dorsal reflete maior sensibilidade regionalizada da retina, favorecendo a percepção do campo de visão inferior florestal com menor disponibilidade de luz (Figura 23). Os cones apresentaram maior densidade na retina ventral, em oposição aos bastonetes. Em um amplo estudo comparativo sobre táticas defensivas de serpentes arborícolas e terrícolas da família Colubridae, Martins e colaboradores (2008) observaram que as espécies arborícolas exibiram maior número de defesas visuais como exibição frontal (*frontal display*), abertura da boca, inflação da região gular, elevação da cabeça, curvatura sigmoide e triangulação da cabeça, quando comparadas às serpentes terrestres. Tais variações de comportamentos defensivos em serpentes arborícolas foram associadas com provável aumento da exposição a predadores e à diversidade de direções pelas quais um predador pode se aproximar da serpente no ambiente arbóreo, quando comparado às serpentes que ocupam ambientes terrícolas. Portanto, a distribuição de cones observada em filhotes de *B. jararaca* pode proporcionar uma maior resolução espacial do campo visual superior em condições de maior luminosidade, o que poderia favorecer a visualização da aproximação de predadores aéreos, em meio ao estrato arbóreo ocupado nesta fase da vida (Figura 23). Desta forma, as diferenças topográficas das retinas de filhotes e adultos de *B. jararaca* parecem indicar importantes mudanças estruturais do sistema visual, de forma a favorecer a atividade e comportamentos específicos nas diferentes fases da vida desta espécie.

Adultos e filhotes de *C. durissus* apresentam um padrão de distribuição de bastonetes semelhante ao observado em filhotes de *B. jararaca*, com maior densidade de células na região dorsal das retinas (Figura 24). Esta distribuição deve favorecer o padrão de atividade diário de *C. durissus*, em que durante o dia, na maior parte do ano, tendem a permanecer em repouso, pois o movimento aumenta o risco de predação, e durante a noite forrageiam

principalmente para caçar suas presas, que tem pico de atividade durante a noite (Salomão, 1995; Tozetti & Martins, 2013), ou para procurar parceiros para acasalamento (principalmente no caso dos machos) em condições de baixa luminosidade (Sawaya et al., 2008; Tozetti & Martins, 2013). A distribuição de cones em retinas de cascavéis adultas e filhotes mostrou uma faixa alongada de maior densidade de células que pode estar associada com a varredura do ambiente (Figura 24). Embora utilizem ambientes predominantemente abertos e secos, as cascavéis apresentam uma alta versatilidade ecológica, podendo ocupar também ambientes de florestas degradadas, que recebem maior incidência de luz solar em comparação com os ambientes florestados ocupados por jararacas (Fiorillo et al., 2020b). Desta maneira, a faixa visual formada por cones deve auxiliar, por exemplo, na busca por abrigo para o controle da temperatura corporal, estratégia comum em cobras não fossoriais de ecossistemas abertos como o cerrado, uma vez que estes animais estão mais expostos ao superaquecimento durante o dia, em relação àquelas que vivem em áreas de floresta (Tozetti & Martins, 2008).

### ***Densidade e Topografia de Cones S***

A população de cones de *B. jararaca* e de *C. durissus* é subdividida em cones S e cones L/M. Os cones S contém o fotopigmento SWS1 com sensibilidade a comprimentos de onda curtos, na faixa do UV (Bittencourt et al., 2019; Gower et al., 2019). Gower e colaboradores (2019) descreveram também a presença de cones duplos que expressam fotopigmentos SWS1 em viperídeos, um tipo cone nunca descrito em outras espécies de serpentes, ou outros vertebrados. Entretanto, neste trabalho, os anticorpos anti-opsinas utilizados para a marcação de cones S (Tabela 1), não revelaram a presença de cones duplos com o fotopigmento SWS1 na ampla amostragem a partir de retinas planas, e assim como Bittencourt e colaboradores (2019), neste estudo, foi observada apenas a presença de cones S simples pequenos em retinas de *B. jararaca* e de *C. durissus*.

A porcentagem de cones S foi de cerca de 9% da população de cones nas duas espécies (Tabela 9). Em serpentes noturnas da família Colubridae, a porcentagem de cones S variou entre 9% na fossorial *Atractus reticulatus* e 27% na semiarborícola *Dipsas bucephala* (Hauzman, 2014). Em colubrídeos diurnos a porcentagem de cones S variou entre 1,3% na arborícola *C. bicarinatus* e 9,1% na terrícola *Erythrolamprus poecilogyrus* (Hauzman, 2014). Nos viperídeos, a densidade média de cones S foi maior em *C. durissus*, com  $765 \pm 83$  cones/mm<sup>2</sup> em adultos e  $1.295 \pm 230$  cones/mm<sup>2</sup> em filhotes, comparado a *B.*

*jararaca*, com  $414 \pm 123$  cones/mm<sup>2</sup> em adultos e  $960 \pm 242$  cones/mm<sup>2</sup> em filhotes (Tabela 9, Figura 21).

A conformação da retina composta majoritariamente por bastonetes, que atuam na visão escotópica, combinada com a presença de cones S que captam fótons com comprimentos de onda curtos, na faixa do ultravioleta, deve estar relacionada com o padrão de atividade crepuscular e noturno adotada por ambas as espécies. Em estudos com serpentes *Henophidia*, também de hábitos crepusculares e noturnos, foi sugerido que a presença de cones UV poderia auxiliar na detecção de rastros de urina e fezes de roedores, que refletem luz ultravioleta (Desjardins et al., 1973; Viitala et al., 1995). Nas espécies de crotalíneos estudadas, a percepção visual dos rastros deixados por roedores pode ser somada com a percepção de pistas químicas e térmicas destes animais.

Os mapas topográficos dos cones S das duas espécies analisadas revelaram uma distribuição difusa com alta densidade nas regiões central e ventral das retinas (Figura 25). Em um estudo eletroretinográfico realizado em camundongo, Calderone & Jacobs (1995) verificaram que a retina é relativamente mais sensível a estímulos por luz ultravioleta quando a luz é direcionada para a metade ventral da retina, conforme previsto, devido a maior concentração de cones UV nesta área da retina. Esta condição deve estar associada com a possibilidade de identificação de seus predadores que podem surgir no campo de visão superior (Szél et al., 2000). De forma semelhante, a maior densidade de cones UV na retina ventral de *B. jararaca* e de *C. durissus* deve contribuir para a realização de táticas defensivas contra predadores aéreos, como as aves de rapina, que são os predadores mais comuns destas espécies (Costa et al., 2014; Martins & Oliveira, 1998; Specht et al., 2008; Tozetti, 2006). Diante da identificação de alguma ameaça vinda do campo de visão superior, favorecida devido à maior densidade de cones UV na retina ventral, as serpentes podem efetuar diversas táticas defensivas como de vibração da cauda, posição de bote, descarga cloacal e achatamento lateral do corpo, sendo este último uma das táticas defensivas comumente utilizadas por ambas as espécies deste estudo (Araújo & Martins, 2006; Benicício & Martins, 2018; Fiorillo et al., 2020a). Uma vez que as aves visualizam as serpentes de cima para baixo, o comportamento de achatamento lateral do corpo realizado pelas serpentes pode intimidar o predador aéreo por fazer parecer que as serpentes são maiores.

Em um estudo sobre comportamento defensivo em serpentes do gênero *Bothrops* que habitam áreas abertas e florestadas, Araújo & Martins (2006) observaram um aumento no comportamento de compressão dorsal do corpo nas espécies *B. alternatus* e *B. pauloensis*

que habitam áreas abertas, em comparação com espécies que habitam áreas florestadas. A utilização de ambientes abertos deve se refletir em adaptações frente a maior pressão de predação por aves de rapina, resultando em um aumento significativo deste comportamento defensivo nestas serpentes. Desta forma, pode-se sugerir ainda que a maior densidade de cones S em retinas de *C. durissus* possa favorecer a percepção de objetos no campo de visão superior em meio ao ambiente de campo aberto, onde o animal pode estar mais sujeito a predação por aves de rapina, em oposição a *B. jararaca*, que ocupa ambiente florestado, onde há menor exposição e maior possibilidade de camuflagem entre as folhagens.

### ***Densidade e Topografia de Cones L/M***

A população de cones L/M é subdividida em cones simples grandes e cones duplos (Figura 6). Em *B. jararaca* a densidade média de cones L/M foi menor em adultos, com  $4.136 \pm 951$  cones/mm<sup>2</sup> comparado a filhotes, com  $8.434 \pm 861$  cones/mm<sup>2</sup> (Tabela 9, Figura 21). Em *C. durissus* a densidade média de cones L/M foi estimada em  $6.686 \pm 622$  cones/mm<sup>2</sup> em retinas de adultos, e  $12.305 \pm 1.700$  cones/mm<sup>2</sup> em filhotes (Tabela 9, Figura 21). Estes valores se assemelham aos descritos para colubrídeos noturnos em que a densidade média de cones L/M variou de  $4.783 \pm 1.185$  cones/mm<sup>2</sup> em *Oxyrhopus guibei* a  $10.870 \pm 3.209$  cones/mm<sup>2</sup> em *Atractus pantostictus*, e para colubrídeos diurnos, com densidade média de  $5.345 \pm 1.575$  cones/mm<sup>2</sup> em *Helicops modestus* e  $11.837 \pm 3.659$  cones/mm<sup>2</sup> em *Tomodon dorsatus* (Hauzman, 2014).

Os mapas de isodensidade de cones L/M revelaram diferentes distribuições para os quatro grupos. Enquanto adultos de *B. jararaca* apresentaram uma maior densidade na região ventral e um pico na retina temporal, o que deve favorecer a captação de fótons com comprimentos de onda médios/longos vindos do campo de visão superior e frontal; os indivíduos filhotes apresentaram um pico na retina central (Figura 26). Em adultos de *C. durissus* a distribuição de cones L/M apresentou um padrão de organização em faixa visual com maior densidade de células dispostas ao longo do eixo nasal-temporal, que deve contribuir para a observação panorâmica do ambiente de campo aberto, já os filhotes, apresentaram distribuição difusa, com maior densidade de cones L/M na retina nasal (Figura 26).

## 6.2. Densidade e Topografia das Células da CCG

Os valores de densidade média das células da CCG foram semelhantes entre os indivíduos adultos e entre os filhotes de *B. jararaca* e de *C. durissus*. Filhotes apresentaram maiores valores de densidade média comparado aos adultos, assim como observado para fotorreceptores, devido a menor área da retina e maior empacotamento das células (Tabela 12, Tabela 13, Figura 28). Os adultos de *B. jararaca* apresentaram densidade média de  $4.877 \pm 1.086$  células/mm<sup>2</sup> e *C. durissus* de  $4.640 \pm 722$  células/mm<sup>2</sup> (Tabela 12, Figura 28). Em filhotes, a densidade média foi de  $8.816 \pm 2.163$  células/mm<sup>2</sup> em *B. jararaca* e de  $9.691 \pm 1.005$  células/mm<sup>2</sup> em *C. durissus* (Tabela 12, Figura 28). Os valores de densidade média estimados para indivíduos adultos foram semelhantes aos descritos para colubrídeos noturnos como *Dipsas albifrons* ( $5.341 \pm 1.189$  células/mm<sup>2</sup>), *Oxyrhopus guibei* ( $5.327 \pm 1.140$  células/mm<sup>2</sup>) e *Sibynomorphus neuwiedi* ( $5.987 \pm 1.200$  células/mm<sup>2</sup>) (Hauzman et al., 2018). Por outro lado, os valores de densidade estimados para retinas de filhotes das duas espécies foram mais próximos aos descritos para colubrídeos diurnos, com cerca de 10.000 células/mm<sup>2</sup> (Hauzman et al., 2014).

Os mapas de isodensidade de células da CCG dos indivíduos adultos das duas espécies apresentaram uma área alongada de maior densidade se estendendo ao longo do eixo nasal-temporal das retinas, porém sem a formação de uma faixa visual bem definida (Figura 29). Em ambas as espécies foi observado um pico de densidade de células na região temporal das retinas, que projeta para o campo de visão frontal do animal, e deve favorecer o comportamento de bote para captura e para defesa (Figura 29). Em filhotes de *C. durissus* não foi identificado um padrão definido de distribuição celular (Figura 29). Entretanto, assim como em retinas de adultos, o pico de densidade foi observado também na região temporal das retinas (Figura 29).

A informação visual, principalmente advinda de regiões da retina de maior densidade de células ganglionares, é somada com as pistas térmicas captadas por meio da fosseta loreal e desta maneira, a capacidade de observação de objetos no campo visual frontal é potencializada aumentando assim a probabilidade de sucesso no bote para defesa ou predação de animais endotérmicos (Newman & Hartline, 1981, 1982). Estudos comportamentais com serpentes Crotalinae revelaram que tanto as pistas visuais quanto as térmicas são importantes para o sucesso do bote para a predação. Serpentes com os olhos ou fossetas loreais ocluídos ainda podem perceber os roedores bem o suficiente para atacar (Kardong, 1992; Chen et al., 2012). A visão e as pistas térmicas podem compensar um ao outro, mas o desempenho de

caça se torna mais eficiente quando os dois sistemas sensoriais estão disponíveis, e esta capacidade parece ser uma adaptação valiosa para comportamentos em diferentes períodos do dia (Kardong, 1992; Chen et al., 2012). Durante o dia, as serpentes Crotalinae podem se beneficiar de informações visuais, uma vez que a imagem infravermelha pode ser atenuada na luz do dia devido às temperaturas relativamente altas. Por outro lado, durante a noite as serpentes podem se beneficiar das pistas térmicas oriundas da fosseta loreal (Chen et al., 2012).

Em filhotes de *B. jararaca* foi observada maior densidade de células na região ventral das retinas (Figura 29), que deve implicar em uma maior capacidade de resolução espacial do campo de visão superior da serpente. Estes dados corroboram a hipótese deste trabalho que sugere a presença de variações ontogenéticas na distribuição de células em *B. jararaca* que acompanha as diferenças ecológicas e comportamentais ao longo da vida (Martins et al., 2002; Sazima, 1992).

De acordo com a teoria proposta por Hughes (1977) (*Terrain Theory*), espécies que ocupam ambientes de campos abertos sem obstrução no campo visual apresentam uma faixa visual, que favorece a visão panorâmica do ambiente sem a necessidade de movimentação da cabeça para localização de objetos. Dados de topografia da retina de várias espécies sustentam esta hipótese, como no caso do avestruz (Boire et al., 2001), do canguru-cinza (Dunlop et al., 1987) do lobo (Peichl, 1992), da tartaruga-de-orelha-vermelha (Grötzner et al., 2019) e dos peixes *Choerodon albigena* e *Lethrinus chrysostomos* (Collin & Pettigrew, 1988). Entretanto, a distribuição de células da CCG das serpentes adultas deste estudo, mostrou um padrão de distribuição celular semelhante, apesar das duas espécies ocuparem diferentes ambientes (Figura 29). Em *C. durissus*, a ocupação de ambiente de campo aberto do cerrado combinado com uma elevada densidade de células da CCG em forma de faixa (Figura 29), pode contribuir para uma visão panorâmica do ambiente, assim como proposto por Hughes (1977). No entanto, este tipo de especialização não explicaria a utilização do ambiente florestado por *B. jararaca*, onde o campo de visão é obstruído pela vegetação.

Discordâncias quanto ao uso preferencial de ambiente e especialização da retina, considerando a proposta de Hughes (1977), também foram encontrados em algumas espécies de vertebrados como no camaleão *Chamaeleo chamaeleon* (Hassni et al., 1997), no gambá *Trichosurus vulpecula* (Freeman & Trancred, 1978) e na serpente *P. olfersii* (Hauzman et al., 2014), que ocupam ambientes de mata fechada e apresentam faixa visual. Desta forma, a faixa visual pode oferecer vantagens adaptativas tanto para serpentes que habitam áreas

abertas quanto para as que ocupam ambientes florestados, e neste grupo de vertebrados, esta distribuição de células pode estar associada com estratégias de caça e forrageamento. Serpentes do gênero *Bothrops* caçam tipicamente por emboscada em locais de encontros prováveis com as possíveis presas (Glaudas et al., 2019; Martins et al., 2002). Entretanto, em serpentes do gênero *Crotalus* foram descritas estratégias de caça classificadas em duas fases. A primeira fase é de busca ativa, na qual a serpente se move pelo ambiente utilizando uma série de pistas para avaliar os locais adequados para a captura de presas. Presumivelmente, se as pistas químicas e visuais indicarem que as presas costumam usar determinado local, e se este também for adequado para emboscadas, as cascavéis interrompem a busca ativa, primeira fase do forrageamento e passam para a segunda fase - a caça por espreita, de forma a surpreender a presa com um ataque rápido (Clark, 2017).

A ausência de faixa visual e a presença de maior densidade de células da CCG na retina ventral de filhotes de *B. jararaca*, pode, portanto, estar associada com a estratégia de caça por espreita sobre o estrato arbustivo, além de promover melhor possibilidade de visualização de predadores aéreos. Filhotes de *B. jararaca* podem utilizar o estrato arbóreo de ambientes florestados e também de plantações, e sua dieta se baseia preferencialmente em anfíbios anuros, abundantes nestes locais, que são atraídos pelo engodo caudal (Martins et al., 2002; Sazima, 1991; Fiorillo et al., 2020a). Distribuição de células da CCG semelhante ao encontrado em filhotes de *B. jararaca* foi observada em colubrídeos noturnos e malacófagos, que ocupam ambientes semiarborícolas, como *Dipsas albifrons* e *S. newwiedi* (Hauzman et al., 2018).

Os resultados obtidos neste estudo indicam que diferentes padrões de distribuição de células nas retinas de serpentes têm importância funcional associada ao comportamento e ao ambiente ocupado. A variação intraespecífica na distribuição de células da CCG em *B. jararaca* aponta para mudanças morfológicas ontogenéticas do sistema visual que podem estar associadas ao uso preferencial e hábitat, estratégias de caça e/ou tipos de presa ingeridas, e possíveis diferenças resultantes de pressão por predação.

### **6.3. Estimativa da Acuidade Visual**

Os valores de acuidade visual de *B. jararaca* e de *C. durissus* foram estimados considerando um possível arranjo quadrado ou hexagonal das células da CCG. Em ambos os casos, as médias das estimativas teóricas da acuidade visual variaram em uma faixa de 2,1 a 2,4 cpg em adultos e filhotes de *B. jararaca* e em filhotes de *C. durissus*, enquanto valores mais altos, em cerca de 2,7 a 2,9 cpg, foram estimados para adultos de *C. durissus* (Tabela

15, Tabela 16, Figura 31). Embora as análises estatísticas apontem diferenças significativas na acuidade visual em indivíduos adultos de *C. durissus*, a diferença observada parece irrisória em termos de mudanças comportamentais consideráveis. Os valores encontrados neste estudo se assemelham aos descritos para serpentes colubrídeas diurnas do gênero *Philodryas*, com cerca de 2,6 cpg (Hauzman et al., 2014) e para a serpente elapídea marinha *Aipysurus laevis*, com cerca de 2,3 cpg (Hart et al., 2012), e foram maiores em relação aos estimados para colubrídeos noturnos (entre  $1,3 \pm 0,4$  cpg e  $1,2 \pm 0,4$  cpg) (Hauzman et al., 2018).

As células ganglionares recebem as informações resultantes da ativação dos fotorreceptores da retina externa pela luz proveniente da cena visual. Estas informações são inicialmente processadas na retina interna e a seguir, transmitidas para as áreas de processamento da informação luminosa no cérebro por meio de seus longos axônios (Hughes, 1977; Joselevitch, 2008; Masland, 2001; Wassle & Boycott, 1991). Desta forma, a densidade das células ganglionares é um fator limitante para a capacidade de resolução espacial do olho, que pode, portanto, ser estimada a partir do pico de densidade destas células, combinada com caracteres anatômicos dos olhos (Hart et al., 2012; Collin, 2008). Entretanto, é importante ressaltar que as células ganglionares apresentam grande variabilidade em termos de padrões de conectividade e de respostas aos diferentes estímulos, e que alguns tipos de células ganglionares atuam no processamento de outras características das informações visuais que não o processamento da frequência espacial (Lee, 1996; Münch, 2010; Nelson, 2013).

A técnica de coloração de Nissl para a marcação de células da CCG, empregada na maioria dos estudos realizados, utiliza um corante que marca de forma inespecífica os acúmulos basófilos, como ácidos nucleicos e o retículo endoplasmático rugoso (Singer, 1954). Desta forma, células ganglionares que participam na detecção de diferentes aspectos da cena visual, como percepção da direção e velocidade do movimento (Nelson, 2013), além de células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis (ipRGCs), são também quantificadas nesta abordagem, o que pode levar a uma superestimativa do poder de resolução espacial do olho. Entretanto, a comparação entre estimativas teóricas da acuidade visual com base em caracteres anatômicos e valores obtidos com base em estudos comportamentais para diversas espécies de vertebrados, mostraram que os resultados são equiparáveis, o que valida a técnica utilizada para a estimativa da acuidade visual por meio de análises morfológicas (Hemmi & Mark, 1998; Arrese et al., 2000; Reymond, 1987).

## 7. Conclusões

- As análises de densidade de fotorreceptores das retinas de *B. jararaca* e de *C. durissus* mostraram a predominância de bastonetes, que compõem cerca de 90 a 95% da população de fotorreceptores. Entretanto, foi constatada diferença quanto à densidade de cones entre as duas espécies, o que pode estar associado com a diferença de uso de habitat, uma vez que *C. durissus*, com maior densidade e proporção de cones, ocupa campos abertos, com maior luminosidade, enquanto *B. jararaca*, com menor densidade de cones, ocupa preferencialmente ambientes florestados, com menor luminosidade.

- A comparação dos resultados de distribuição de células nas retinas em adultos e filhotes de *B. jararaca* e *C. durissus* corroboram a hipótese deste estudo, de que mudanças ontogenéticas da ecologia e comportamento de *B. jararaca* estariam associadas com mudanças na organização dos neurônios das retinas desta espécie, mas não em *C. durissus*.

- Os mapas topográficos de cones e de bastonetes em indivíduos adultos de *B. jararaca* mostraram distribuição em forma de faixa visual, que deve proporcionar melhor visão panorâmica do ambiente, e favorecer a busca ativa por roedores. Filhotes de *B. jararaca* apresentaram maior densidade de bastonetes na retina dorsal, que deve proporcionar maior sensibilidade e possibilidade de captação de fótons vindos do campo visual inferior em condição de baixa luminosidade. Por outro lado, a maior densidade de cones na retina ventral deve proporcionar melhor visão do campo superior em condições de maior luminosidade, e possivelmente favorecer a observação de predadores aéreos. Adultos e filhotes de *C. durissus* apresentam maior densidade de bastonetes na região dorsal das retinas, que deve auxiliar na percepção de objetos no solo, em condições de baixa luminosidade, e os cones apresentaram distribuição em faixa horizontal, favorecendo a visão panorâmica do ambiente de campo aberto em condições de maior luminosidade.

- A população de cones é dominada por cones L/M (simples e duplos) e, portanto, os mapas topográficos mostraram distribuição semelhante àquela descrita para cones totais nas duas espécies.

- Em ambas as espécies, os mapas de cones S apresentaram uma distribuição difusa ou *area centralis* anisotrópica com maior densidade na região central e ventral da retina, que deve favorecer a percepção de fótons com comprimentos de onda na faixa do UV vindos do campo de visão superior. A maior densidade de cones S em retinas de *C. durissus* pode estar associada com maior demanda para observação de predadores aéreos, devido a maior

susceptibilidade em áreas abertas em relação aos ambientes florestados ocupados por *B. jararaca*.

- A densidade média de células da CCG foi semelhante entre as duas espécies, e foi menor em retinas de adultos comparado aos filhotes, devido ao aumento da área da retina.

- A distribuição de células da CCG de *C. durissus* e de adultos de *B. jararaca* revelou uma área de maior densidade se estendendo ao longo do eixo nasal-temporal. Esta distribuição que favorece a visualização do campo visual de forma panorâmica, deve oferecer vantagens adaptativas para serpentes que forrageiam tanto em áreas abertas quanto em ambientes florestados. O pico de densidade na região temporal das retinas, que se projeta para o campo de visão frontal, deve favorecer o comportamento de bote para caça ou defesa. Por outro lado, em filhotes de *B. jararaca*, a maior densidade de células da CCG na região ventral das retinas pode estar associada com o comportamento de caça por espreita, e a maior possibilidade de observação de predadores aéreos em meio ao estrato arbóreo, ocupado nesta fase da vida.

- A estimativa da acuidade visual foi menor em *B. jararaca* com cerca de 2,3 cpg, em relação ao observado para *C. durissus*, com valor estimado em cerca de 2,9 cpg. Se esta diferença se reflete ou não em diferenças comportamentais significativas é uma questão em aberto, cuja resposta depende, de análises comportamentais necessárias para sua confirmação.

## 8. Referências Bibliográficas

- Ali, M. A., & Klyne, M. A. (1985). *Vision in Vertebrates*. Plenum Press.
- Almeida-Santos, S. M. (2005). *Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em Crotalus durissus e Bothrops jararaca*. Universidade de São Paulo.
- Andrade, D. V., & Abe, A. S. (1999). *Relationship of Venom Ontogeny and Diet in Bothrops*. 55(2), 200–204.
- Antunes, T. C., Yamashita, K. M., Barbaro, K. C., Saiki, M., & Santoro, M. L. (2010). Comparative analysis of newborn and adult Bothrops jararaca snake venoms. *Toxicon*, 56(8), 1443–1458. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.08.011>
- Araújo, M. S., & Martins, M. (2006). Defensive behaviour in pit vipers of the genus Bothrops (Serpentes, Viperidae). *Herpetological Journal*, 16(3), 297–303.
- Arrese, C., Archer, M., Runham, P., Dunlop, S. A., & Beazley, L. D. (2000). Visual system in a diurnal marsupial, the numbat (*Myrmecobius fasciatus*): Retinal organization, visual acuity and visual fields. *Brain, Behavior and Evolution*, 55(4), 163–175. <https://doi.org/10.1159/000006650>
- Azevedo-Marques, M.M.; Cupo, P.; Hering, S. E. (1992). Acidente crotálico. In S. Schvartsman (Ed.), *Plantas e Animais Peçonhentos*. (pp. 161–170).
- Bailes, H. J., Daves, W. L., Trezise, A. E. O., & Collin, S. P. (2007). Visual pigments in a living fossil, the Australian lungfish *Neoceratodus fosteri*. *BMC Evolutionary Biology*, 7.
- Barbo, F. E., Gasparini, J. L., Almeida, A. P., Zaher, H., Graziotin, F. G., Gusmão, R. B., Ferrarini, J. M. G., & Sawaya, R. J. (2016). Another new and threatened species of lancehead genus Bothrops (Serpentes, Viperidae) from Ilha dos Franceses, Southeastern Brazil. In *Zootaxa* (Vol. 4097, Issue 4, pp. 511–529). Magnolia Press. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4097.4.4>
- Barbour, H., Archer, M. A., Hart, N. S., Thomas, N., Dunlop, S. A., Beazley, L. D., & Shand, J. (2002). Retinal characteristics of the ornate dragon lizard, *Ctenophorus ornatus*. *Journal of Comparative Neurology*, 450(4).
- Barros, V. A. (2011). *Biologia reprodutiva de três espécies de serpentes da Família Viperidae da região neotropical São José do Rio Preto*. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA.
- Bastos, E. G. de M., B., D. A. A. F., & Silva, H. R. da. (2005). Records of the rattlesnakes *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti) (Serpentes, Viperidae) in the State of Rio de Janeiro, Brazil: a possible case of invasion facilitated by deforestation. *Revista Brasileira de Zoologia*, 22(3), 812–815. <https://doi.org/10.1590/s0101-81752005000300047>
- Benicício, R. A., & Martins, M. (2018). Defensive behavior of a juvenile *Crotalus durissus*. *Herpetozoa*, 30, 217–218.

- Bernarde, P. S., Moura-Leite, J. C., Machado, R. A., & Kokobum, M. N. (2000). Diet of the colubrid snake, *Thamnodynastes strigatus* (Günther, 1858) from Paraná State, Brazil, with field notes on anuran predation. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, 60(4), 695–699. <https://doi.org/10.1590/s0034-71082000000400022>
- Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science*, 295(5557), 1070–1073. <https://doi.org/10.1126/science.1067262>
- Bhattacharyya, N., Darren, B., Schott, R. K., Tropepe, V., & Chang, B. S. W. (2017). Cone-like rhodopsin expressed in the all-cone retina of the colubrid pine snake as a potential adaptation to diurnality. *The Journal of Experimental Biology*, 220(13), 2418–2425. <https://doi.org/10.1242/jeb.156430>
- Bittencourt, G. B., Hauzman, E., Bonci, D. M. O., & Ventura, D. F. (2019). Photoreceptors morphology and genetics of the visual pigments of *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae). *Vision Research*, 158, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2019.02.006>
- Boire, D., Dufour, J. S., Théoret, H., & Ptito, M. (2001). Quantitative analysis of the retinal ganglion cell layer in the ostrich, *Struthio camelus*. *Brain, Behavior and Evolution*, 58(6), 343–355. <https://doi.org/10.1159/000057575>
- Bowmaker, J. K. (1991). The evolution of vertebrate visual pigments and photoreceptors. In R. Croly-Dillon, J & Gregory (Ed.), *Vision and visual dysfunction*. Macmillan Press.
- Bringmann, A., Syrbe, S., Görner, K., Kacza, J., Francke, M., Wiedemann, P., & Reichenbach, A. (2018). The primate fovea: Structure, function and development. In *Progress in Retinal and Eye Research* (Vol. 66, pp. 49–84). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.03.006>
- Brischoux, F., Pizzatto, L., & Shine, R. (2010). Insights into the adaptive significance of vertical pupil shape in snakes. *Journal of Evolutionary Biology*, 23(9), 1878–1885. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2010.02046.x>
- Brown, K. T. (1969). A linear area centralis extending across the turtle retina and stabilized to the horizon by non-visual cues. *Vision Research*, 9(9), 1053–1062. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(69\)90047-9](https://doi.org/10.1016/0042-6989(69)90047-9)
- Cadle, J. E., & Greene, H. W. (1993). Phylogenetic patterns, biogeography, and the ecological structure of Neotropical snake assemblages. In University of Chicago Press (Ed.), *Species diversity in ecological communities: historical and geographical perspectives*. (pp. 281–293).
- Calderone, J. B., & Jacobs, G. H. (1995). Regional variations in the relative sensitivity to uv light in the mouse retina. *Visual Neuroscience*, 12(3), 463–468. <https://doi.org/10.1017/S0952523800008361>
- Campbell, J.A.; Lamar, W. W. (1989). *The Venomous Reptiles of Latin America*.
- Caprette, C. L. (2005). *Conquering the cold shudder: the origin and evolution of snakes eyes*.

The Ohio State University.

- Caprette, C. L., Lee, M. S. Y., Shine, R., Mokany, A., & Downhower, J. F. (2004). The origin of snakes (Serpentes) as seen through eye anatomy. *Biological Journal of the Linnean Soci-Ety*, *81*, 469–482.
- Cardoso, S. R. T. (2011). *História natural das serpentes da região de Munhoz, sul de Minas Gerais, Serra da Mantiqueira*. Universidade de São Paulo.
- Chen, Q., Deng, H., Brauth, S. E., Ding, L., & Tang, Y. (2012). Reduced performance of prey targeting in pit vipers with contralaterally occluded infrared and visual senses. *PLoS ONE*, *7*(5), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034989>
- Clark, R. W. (2017). The Hunting and Feeding Behavior of Wild Rattlesnakes. *Rattlesnakes of Arizona, January*, 93–118. [www.bio.sdsu.edu/pub/clark/site/home.html](http://www.bio.sdsu.edu/pub/clark/site/home.html)
- Coates, M., & Ruta, M. (2000). Nice snake, shame about the legs. *Trends in Ecology and Evolution*, *15*(12), 506–507. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(00\)01999-6](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(00)01999-6)
- Coimbra, J. P., Hart, N. S., Collin, S. P., & Manger, P. R. (2013). Scene from above: Retinal ganglion cell topography and spatial resolving power in the giraffe (*Giraffa camelopardalis*). *Journal of Comparative Neurology*, *521*(9), 2042–2057. <https://doi.org/10.1002/cne.23271>
- Coimbra, J. P., Trévia, N., Marceliano, M. L. V., Andrade-Da-Costa, B. L. da S., Picanço-Diniz, C. W., & Yamada, E. S. (2009). Number and distribution of neurons in the retinal ganglion cell layer in relation to foraging behaviors of tyrant flycatchers. *Journal of Comparative Neurology*, *514*(1), 66–73. <https://doi.org/10.1002/cne.21992>
- Collin S. P. (1999). Behavioural ecology and retinal cell topography. In A. S. . D. M. B. . L. E. . P. J. C. Vallergera (Ed.), *Adaptive mechanisms in the ecology of vision* (pp. 509–535).
- Collin, S. P. (2008). A web-based archive for topographic maps of retinal cell distribution in vertebrates: Invited Paper. *Clinical and Experimental Optometry*, *91*(1), 85–95. <https://doi.org/10.1111/j.1444-0938.2007.00228.x>
- Collin, S. P., & Pettigrew, J. D. (1988). Retinal topography in reef teleosts: II. Some species with prominent horizontal streaks and high-density areas. *Brain, Behavior and Evolution*, *31*(5), 283–295. <https://doi.org/10.1159/000116595>
- Cormack, D. H. (2003). *Fundamentos de histologia*. Guanabara Koogan.
- Costa, H. C., Lopes, L. E., Marçal, B. D. F., & Zorzini, G. (2014). The reptile hunter's menu: A review of the prey species of Laughing Falcons , *Herpetotheres cachinnans* (Aves : Falconiformes). *North-Western Journal of Zoology*, *10*(2)(December), 445–453.
- Costa, K. H. A., Gomes, B. D., Silveira, L. C. de L., Souza, G. da S., Martins, I. C. V. da S., Lacerda, E. M. da C. B., & Rocha, F. A. de F. (2020). Ganglion cells and displaced amacrine cells density in the retina of the collared peccary (*Pecari tajacu*). *PLO One*, *15*, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239719>
- Cupo, P.; Azevedo, M. M., Hering, S. E. (1990). *Acidentes ofídicos: Análise de 102 casos*.

(pp. 23–24). Livro de Resumos do XXI Congresso da Soc Bras Med.

- Dacey, D. M., Peterson, B. B., Robinson, F. R., & Gamlin, P. D. (2003). Fireworks in the primate retina: In vitro photodynamics reveals diverse LGN-projecting ganglion cell types. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01143-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01143-1)
- Davies, W. L., Cowing, J. A., Bowmaker, J. K., Carvalho, L. S., Gower, D. J., & Hunt, D. M. (2009). Shedding Light on Serpent Sight: The Visual Pigments of Henophidian Snakes. *Journal of Neuroscience*, 29(23), 7519–7525. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0517-09.2009>
- Desjardins, C., Maruniak, J. A., & Bronson, F. H. (1973). Social Rank in House Mice: Differentiation Revealed by Ultraviolet Visualization of Urinary Marking Patterns. *Science*, 182(4115), 939–941. <https://doi.org/10.1126/science.182.4115.939>
- Dunlop, S. A., Longley, W. A., & Beazley, L. D. (1987). Development of the area centralis and visual streak in the grey kangaroo *Macropus fuliginosus*. *Vision Research*, 27(2), 151–164. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(87\)90178-7](https://doi.org/10.1016/0042-6989(87)90178-7)
- Easter, S. S. (1992). Retinal growth in foveated teleosts: Nasotemporal asymmetry keeps the fovea in temporal retina. *Journal of Neuroscience*, 12(6), 2381–2392. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.12-06-02381.1992>
- Emerling, C. A. (2016). Archelosaurian color vision, parietal eye loss and the crocodylian nocturnal bottleneck. *Molecular Biology and Evolution*, 34(3), msw265. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw265>
- Fernández-Juricic, E., Gall, M. D., Dolan, T., O'Rourke, C., Thomas, S., & Lynch, J. R. (2011). Visual systems and vigilance behaviour of two ground-foraging avian prey species: white-crowned sparrows and California towhees. *Animal Behaviour*, 81(4), 705–713. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.11.014>
- Ferri, V. (1992). *El libro de las serpentes de todo el mundo* (D. Vecchi (ed.)).
- Fileta, J. B., Huang, W., Kwon, G. P., Filippopoulos, T., Ben, Y., Dobberfuhl, A., & Grosskreutz, C. L. (2008). Efficient estimation of retinal ganglion cell number: A stereological approach. *Journal of Neuroscience Methods*, 170(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.12.008>
- Fiorillo, Bruno F., Silva, B. R. da, Menezes, F. A., Marques, O. A. V., & Martins, M. (2020). Composition and Natural History of Snakes from Etá Farm region, Sete Barras, south-eastern Brazil. *ZooKeys*, 931, 115–153. <https://doi.org/10.3897/zookeys.931.46882>
- Fiorillo, Bruno Ferreto, Tozetti, A. M., & Martins, M. (2020). Habitat use by five species of sympatric pitvipers ( Bothrops , Crotalus ) in a Brazilian savannah. *Herpetology Notes*, 13(November), 951–960.
- Fitch, H. (1970). *Reproductive cycles of lizard and snakes* (p. 247). Museum of Natural History.
- França, F. G. R., & Araújo, A. F. B. (2006). The Conservation Status of Snakes in Central Brazil. *South American Journal of Herpetology*, 1(1), 25–36.

[https://doi.org/10.2994/1808-9798\(2006\)1\[25:tcsosi\]2.0.co;2](https://doi.org/10.2994/1808-9798(2006)1[25:tcsosi]2.0.co;2)

- Franco, F. . (2003). Origem e diversidade das serpentes. In *Animais peçonhentos no Brasil*. (pp. 13–32).
- Freeman, B., & Trancred, E. (1978). The number and distribution of ganglion cells in the cat's retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 180(4), 753–771. <https://doi.org/10.1002/cne.901800407>
- Freitas, M. A. (2003). *Serpentes brasileiras* (p. 160).
- Frezzatti, R., & Silveira, P. F. (2011). Allopurinol reduces the lethality associated with acute renal failure induced by crotalus durissus terrificus snake venom: Comparison with probenecid. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001312>
- Fukuda, Y., & Stone, J. (1974). The retinal distribution and central projection of Y, X, and W cells of the cat's retina. *J. Neurophysiol.*, 37, 749–772.
- Gibbons, J. W., & Slemlitsch, R. D. (1987). Activity patterns. In *snakes: Ecology and evolutionary Biology* (pp. 396–421). McMillan Publishing Company.
- Glaudas, X., Glennon, K. L., Martins, M., Luiselli, L., Fearn, S., Trembath, D. F., Jelić, D., & Alexander, G. J. (2019). Foraging mode, relative prey size and diet breadth: A phylogenetically explicit analysis of snake feeding ecology. *Journal of Animal Ecology*, 88(5), 757–767. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12972>
- Goris, R. (1995). Infrared Organs of Snakes: An Integral Part of Vision. *Journal of Herpetology*, 29(1), 129–132.
- Gower, D. J., Sampaio, F. L., Peichl, L., Wagner, H. J., Loew, E. R., McLamb, W., Douglas, R. H., Orlov, N., Grace, M. S., Hart, N. S., Hunt, D. M., Partridge, J. C., & Simões, B. F. (2019). Evolution of the eyes of vipers with and without infrared-sensing pit organs. *Biological Journal of the Linnean Society*, 126(4), 796–823. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blz003>
- Greene, H. W. G. (1992). The ecological and behavioral context of pitviper evolution. In *Biology of the Pitvipers*. (pp. 107–118).
- Greene, H. W. G. (1997). *Snakes, the evolution of mystery in nature*. University of California Press.
- Grötzner, S. R., Farias Rocha, F. A., Corredor, V. H., Liber, A. M. P., Hamassaki, D. E., Bonci, D. M. O., & Ventura, D. F. (2019). Distribution of rods and cones in the red-eared turtle retina (*Trachemys scripta elegans*). *Journal of Comparative Neurology*, 528(9), 1548–1560. <https://doi.org/10.1002/cne.24830>
- Hampton, P. M. (2014). Allometry of skull morphology, gape size and ingestion performance in the banded watersnake (*Nerodia fasciata*) feeding on two types of prey. *Journal of Experimental Biology*, 217(3), 472–478. <https://doi.org/10.1242/jeb.092924>
- Hargrave, P. A., & McDowell, J. H. (1992). Rodopsin and phototransduction: a model system

- for G protein-linked receptors. *Faseb Journal*, 2323–2331.
- Hart, N. S., Coimbra, J. P., Collin, S. P., & Westhoff, G. (2012). Photoreceptor types, visual pigments, and topographic specializations in the retinas of hydrophiid sea snakes. *Journal of Comparative Neurology*, 520(6), 1246–1261. <https://doi.org/10.1002/cne.22784>
- Hartmann, P. (2005). *História natural e ecologia de duas taxocenoses de serpentes na Mata Atlântica*. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho.”
- Hartmann, P. A., Hartmann, M. T., & Giasson, L. O. M. (2003). Uso do hábitat e alimentação em juvenis de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae) na Mata Atlântica do sudeste do Brasil. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, 2(1), 35. <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9079.v2i1p35-41>
- Hartmann, P. A., Hartmann, M. T., & Martins, M. (2009). Ecologia e história natural de uma taxocenose de serpentes no Núcleo Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar, no sudeste do Brasil. *Biota Neotropica*, 9(3), 173–184. <https://doi.org/10.1590/s1676-06032009000300018>
- Hassni, M. El, M’hamed, S. B., Réperant, J., & Bennis, M. (1997). Quantitative and topographical study of retinal ganglion cells in the chameleon (*Chameleo chameleon*). *Brain Research Bulletin*, 44(5), 621–625. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(97\)00285-2](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(97)00285-2)
- Hauzman, E., Bonci, D. M. O., Grotzner, S. R., Mela, M., Liber, A. M. P., Martins, S. L., & Ventura, D. F. (2014). Comparative study of photoreceptor and retinal ganglion cell topography and spatial resolving power in dipsadidae snakes. *Brain, Behavior and Evolution*, 84(3), 197–213. <https://doi.org/10.1159/000365275>
- Hauzman, E., Bonci, D. M. O., Suárez-Villota, E. Y., Neitz, M., & Ventura, D. F. (2017). Daily activity patterns influence retinal morphology, signatures of selection, and spectral tuning of opsin genes in colubrid snakes. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-1110-0>
- Hauzman, Einat, Bonci, D. M. O., Grotzner, S. R., Mela, M., Liber, A. M. P., Martins, S. L., & Ventura, D. F. (2014). Comparative study of photoreceptor and retinal ganglion cell topography and spatial resolving power in dipsadidae snakes. *Brain, Behavior and Evolution*, 84(3), 197–213. <https://doi.org/10.1159/000365275>
- Hauzman, Einat. (2014). *Ecologia e Evolução do Sistema Visual De Serpentes Caenophidia: Estudos Comparativos da Morfologia Retiniana e Genética de Opsinas*. Universidade de São Paulo.
- Hauzman, Einat., Bonci, D. M. O., & Ventura, D. F. (2018). Retinal Topographic Maps: A Glimpse into the Animals’ Visual World. In *Sensory Nervous System*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74645>
- Hauzman, Einat. (2020). Adaptations and evolutionary trajectories of the snake rod and cone photoreceptors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 267(June), 110644. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.04.004>

- Hemmi, J. M., & Mark, R. F. (1998). Visual acuity, contrast sensitivity and retinal magnification in a marsupial, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Journal of Comparative Physiology - A Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 183(3), 379–387. <https://doi.org/10.1007/s003590050264>
- Hendry, S. H. C., & Yoshioka, T. A. (1994). A neurochemically distinct third channel in macaque dorsal lateral geniculate nucleus. *Science*, 264, 575–577.
- Hoffstetter, R. (1963). A Contribution to the Classification of Sandstones. *Geologiska Föreningen i Stockholm Förhandlingar*, 85(1), 156–172. <https://doi.org/10.1080/11035896309448877>
- Hughes, A. (1977). The topography of vision in mammals of contrasting life style: comparative optics and retinal organization. In F. Crescitelli (Ed.), *The Visual System in Vertebrates* (pp. 615–756). Springer-Verlag.
- Ito, H., & Murakami, T. (1984). Retinal ganglion cells in two teleost species, *Sebastiscus marmoratus* and *Navodon modestus*. *The Journal of Comparative Neurology*, 229(1), 80–96. <https://doi.org/10.1002/cne.902290107>
- Jacobs, M. (1988). *The tropical rain forest; a first encounter*. Berlin: Springer Verlag.
- Januário, M., Viswana Dham, Y., & Senna, R. C. (1992). Radiação solar dentro e fora de floresta tropical úmida de terra firme (Tucuruí-Pará). *Acta Amazônica*, 22(3), 334–335.
- Joselevitch, C. (2008). Human retinal circuitry and physiology. *Psychology & Neuroscience*, 1(2), 141–165. <https://doi.org/10.3922/j.psns.2008.2.008>
- Kaplan, E., Lee, B. B., & Shapley, R. M. (1990). New Views of Primate Retinal Function. In *Function of the primate retina* (Vol. 9, pp. 273–336). Progress in Retinal Research. [https://doi.org/10.1016/0278-4327\(90\)90009-7](https://doi.org/10.1016/0278-4327(90)90009-7)
- Kardong, K. V. (1983). *The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrids to viperids and elapids* (pp. 105–118). Memórias Instituto Butantan.
- Kardong, K. V. (1992). Proximate Factors Affecting Guidance of the Rattlesnake Strike. *Zoo. Jb. Anat*, 122, 233–244.
- Katti, C., Stacey-Solis, M., Coronel-Rojas, N. A., & Davies, W. I. L. (2018). Opsin-based photopigments expressed in the retina of a South American pit viper, *Bothrops atrox* (Viperidae). *Visual Neuroscience*, 35. <https://doi.org/10.1017/s0952523818000056>
- Kawamura, S. (1993). Rhodopsin phosphorylation as a mechanism of cyclic GMP phosphodiesterase regulation by S-modulin. *Nature*, 362(6423), 855–857. <https://doi.org/10.1038/362855a0>
- Klemmer, K. (1968). Methods of classification of venomous snakes. In V. Bucherl, W.; Buckley, E. E.; Deulofeu (Ed.), *Venomous animals and their venoms. Venomous vertebrates* (pp. 275–283). Academic Press.
- Kley, N. J. (2003). Blindsnakes (Typhlopidae). In *Grzimek's Animal life encyclopedia* (2<sup>o</sup>, pp. 379–385).

- Kolb, H. (2013). Glial cells of the retina. In E. . J. B. Kolb, H.; Nelson, R.; Fernandez (Ed.), *Webvision: the organization of the retina and visual system*. <http://webvision.med.utah.edu/book/part-ii-anatomy-and-physiology-of-the-retina/glial-cells-of-the-retina/>.
- Kolb, Helga, Fernandez, E., & Nelson, R. (2013). *The organization of the retina*. webvision. <http://webvision.med.utah.edu/book/>
- Kraus, F., Mink, D. G., & Brown, W. M. (1996). Crotaline Intergeneric Relationships Based on Mitochondrial DNA Sequence Data. *Copeia*, 1996(4), 763. <https://doi.org/10.2307/1447637>
- Lamb, T. D. (2013). Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 36, 52–119. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.06.001>
- Lee, B. B. (1996). Receptive field structure in the primate retina. *Vision Research*, 36(5), 631–644. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(95\)00167-0](https://doi.org/10.1016/0042-6989(95)00167-0)
- Lema, T. (2002). *Os répteis do Rio Grande do Sul: atuais e fósseis* (L. Edipucrs (ed.)).
- Lillywhite, H. B.; Henderson, R. W. (1993). Behavioral and functional ecology of arboreal snakes. In *Snakes: ecology and behaviour* (2<sup>o</sup>). Elsevier.
- Lisney, T. J., Stecyk, K., Kolominsky, J., Schmidt, B. K., Corfield, J. R., Iwaniuk, A. N., & Wylie, D. . (2013). Ecomorphology of eye shape and retinal topography in waterfowl (Aves: Anseriformes: Anatidae) with different foraging modes. *J. Comp. Physiol*, 385–402.
- Litherland, L., Collin, S. P., & Fritsches, K. A. (2009). Eye growth in sharks: Ecological implications for changes in retinal topography and visual resolution. *Visual Neuroscience*, 26(4), 397–409. <https://doi.org/10.1017/S0952523809990150>
- Liu, Y., Ding, L., Lei, J., Zhao, E., & Tang, Y. (2012). Eye size variation reflects habitat and daily activity patterns in colubrid snakes. *Journal of Morphology*, 273(8), 883–893. <https://doi.org/10.1002/jmor.20028>
- Livingstone, M. S., & Hubel, D. H. (1987). Psychophysical evidence for separate channels for the perception of form, color, movement, and depth. *J. Neurosci.*, 7(3416–3468).
- Locket, N. A. (1985). The multiple bank rod fovea of *Bajacalifornia drakei*, an alepocephalid deep-sea teleost. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 224(1234), 7–22. <https://doi.org/10.1098/rspb.1985.0018>
- Lucas, R. J., Allen, A. E., Milosavljevic, N., Storchi, R., & Woelders, T. (2020). Can We See with Melanopsin? *Annual Review of Vision Science*, 6(1), 1–16. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-030320-041239>
- Ma, J., Znoiko, S., Othersen, K. L., Ryan, J. C., Das, J., Isayama, T., Kono, M., Oprian, D. D., Corson, D. W., Cornwall, M. C., Cameron, D. A., Harosi, F. I., Makino, C. L., & Crouch, R. K. (2001). A Visual Pigment Expressed in Both Rod and Cone Photoreceptors. *Neuron*, 32(3), 451–461. <https://doi.org/10.1016/S0896->

6273(01)00482-2

- Malmstrom, T. (2006). Pupil shapes and lens optics in the eyes of terrestrial vertebrates. *Journal of Experimental Biology*, 209(1), 18–25. <https://doi.org/10.1242/jeb.01959>
- Marques, O. A. V., Eterovic, A. ., & Sazima, I. (2001). *Serpentes da Mata Atlântica: Guia ilustrado para a serra do mar*. Holos.
- Marques, Otavio A.V., & Sazima, I. (2003). Historia natural das serpentes. In *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clinica e terapeutica dos acidentes* (pp. 62–71). Sarvier.
- Marques, O. A. V., & Sazima, I. (2004). História Natural dos répteis da Estação Ecológica Juréia. In W. Marques, O. A. V.; Duleba (Ed.), *Estação Ecológica Juréia-Itatins: Ambiente Físico, Flora e Fauna* (pp. 257–277). Holos.
- Martins, M., Marques, O. A. V., & Sazima, I. (2002). Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers (Genus Bothrops). *Biology of the Vipers*, 307–328.
- Martins, Marcio, Araujo, M. S., Sawaya, R. J., & Nunes, R. (2001). Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of Neotropical pitvipers (Bothrops). *Journal of Zoology*, 254(4), 529–538. <https://doi.org/10.1017/S0952836901001030>
- Martins, Marcio, Marques, O. A. V. ., & Sazima, I. (2002). Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers (Genus Bothrops). *Biology of the Vipers*, 307–328.
- Martins, Marcio, Marques, O. A. V., & Sazima, I. (2008). How to be arboreal and diurnal and still stay alive: microhabitat use, time of activity, and defense in neotropical forest snakes. *South American Journal of Herpetology*, 3(1), 58–67. [https://doi.org/10.2994/1808-9798\(2008\)3\[58:htbaad\]2.0.co;2](https://doi.org/10.2994/1808-9798(2008)3[58:htbaad]2.0.co;2)
- Masland, R. H., & Howard. (2001). The fundamental plan of the retina Richard. *Nature Publishing Group*, 4(9), 877–886.
- Mass, A. M., & Supin, A. Y. (2003). Retinal topography of the harp seal *Pagophilus groenlandicus*. *Brain, Behavior and Evolution*, 62(4), 212–222. <https://doi.org/10.1159/000073273>
- Mathges, L. M., Zhao, K., & Herbest, L. (2020). Photoreceptors in skate are arranged to allow for a broad horizontal field of view. *Journal of Comparative Neurology*, 528(4).
- McBee, J. K., Palczewski, K., Baehr, W., & Pepperberg, D. R. (2001). Confronting complexity: The interlink of phototransduction and retinoid metabolism in the vertebrate retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 20(4), 469–529. [https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(01\)00002-7](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(01)00002-7)
- McDiarmid, R. W. ., Campbell, J. A. ., & Touré, T. (1999). *Snake species of the world: a taxonomic and geographical reference*. (The Herpet).

- Mebs, D. (1999). *Snake venom composition and evolution of Viperidae*. (pp. 145–148). Kaupia.
- Melgarejo, A. R. (2003). Serpentes peçonhentas do Brasil. In *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes* (pp. 33–61).
- Ministério da Saúde, F. N. de S. (2001). *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos*.
- Mitchell, D. E., Giffin, F., & Timney, B. (1977). A behavioural technique for the rapid assessment of the visual capabilities of kittens. *Perception*, 6(2), 181–193. <https://doi.org/10.1068/p060181>
- Miyazaki, T., Iwami, T., & Meyer-Rochow, V. B. (2011). The position of the retinal area centralis changes with age in *Champscephalus gunnari* (Channichthyidae), a predatory fish from coastal Antarctic waters. *Polar Biology*, 34(8), 1117–1123. <https://doi.org/10.1007/s00300-011-0969-2>
- Moiseenkova, V., Bell, B., Motamedi, M., Wozniak, E., & Christensen, B. (2003). Wide-band spectral tuning of heat receptors in the pit organ of the copperhead snake (Crotalinae). *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 284(2) (53-2), 598–606. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00024.2002>
- Moore, B. A., Tyrrell, L. P., Kamilar, J. M., Collin, S. P., Dominy, N. J., Hall, M. I., Heesy, C. P., Lisney, T. J., Loew, E. R., Moritz, G. L., Nava, S. S., Warrant, E., Yopak, K. E., & Fernández-Juricic, E. (2017). Structure and Function of Regional Specializations in the Vertebrate Retina. In *Evolution of Nervous Systems* (pp. 351–372). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804042-3.00008-7>
- Moraes, R. A. De. (2008). *Variações em caracteres morfológicos e ecológicos em populações de Bothrops jararaca (Serpentes: Viperidae) no estado de São Paulo*. Universidade de São Paulo.
- Moroney, M. K., & Pettigrew, J. D. (1987). Some observations on the visual optics of kingfishes (Aves, Caraciformes, Alcedinidae). *J. Comp. Physiol*, 160, 137–149.
- Münch, T. A. (2010). Information processing: Ganglion cells. In *Encyclopedia of the Eye*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374203-2.00198-6>
- Muniz, M. R. (2004). *Estudo do regime de luz nas quatro principais formações fitogeográficas no estado de São Paulo durante o inverno do ano de 2003*. Universidade de Campinas.
- Mushinsky, H. R. ., Hebrard, J. J. ., & Vodopich, D. S. (1982). Ontogeny of Water Snake Foraging Ecology. *Ecological Society of America*, 63(6), 1624–1629.
- Nagy, K. A. (2005). Field metabolic rate and body size. *Journal of Experimental Biology*, 208(9), 1621–1625. <https://doi.org/10.1242/jeb.01553>
- Nelson, R. (2013). Ganglion Cell Physiology. In Helga Kolb, E. Fernandez, & R. Nelson (Eds.), *The organization of the retina*. Webvision.

- Newman, E. A., & Hartline, P. H. (1981). Integration of Visual and Infrared Information in Bimodal Neurons of the Rattlesnake Optic Tectum. *Science*, 213(April), 789–791. <https://doi.org/10.1126/science.7256281>
- Newman, E. A., & Hartline, P. H. (1982). The infrared “vision” of snakes. *Scientific American*, 246(3), 116–127. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0382-116>
- Peichl, L. (1992). Topography of ganglion cells in the dog and wolf retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 324(4), 603–620. <https://doi.org/10.1002/cne.903240412>
- Perry, V. H., & Cowey, A. (1985). The ganglion cell and cone distributions in the monkey’s retina: Implications for central magnification factors. *Vision Research*, 25(12), 1795–1810. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(85\)90004-5](https://doi.org/10.1016/0042-6989(85)90004-5)
- Pettigrew, J. D., Dreher, B., Hopkins, C. S., McCall, M. J., & Brown, M. (1998). Peak density and distribution of ganglion cells in the retinae of Microchiropteran Bats: Implications for Visual Acuity. *Brain Behav. Evol.*, 32, 39–56.
- Pettigrew, J. D., Dreher, B., Hopkins, C. S., McCall, M. J., Brown, M., & Dreher, B. (1988). Peak density and distribution of ganglion cells in the retinae of microchiropteran bats: Implications for visual acuity. *Brain, Behavior and Evolution*, 32(1), 39–56. <https://doi.org/10.1159/000116531>
- Pettigrew, John D., & Manger, P. R. (2008). Retinal ganglion cell density of the black rhinoceros (*Diceros bicornis*): Calculating visual resolution. *Visual Neuroscience*, 25(2), 215–220. <https://doi.org/10.1017/S0952523808080498>
- Potier, S., Mitkus, M., Bonadonna, F., Duriez, O., Isard, P. F., Dulaurent, T., Mentek, M., & Kelber, A. (2017). Eye Size, Fovea, and Foraging Ecology in Accipitriform Raptors. *Brain, Behavior and Evolution*, 90(3), 232–242. <https://doi.org/10.1159/000479783>
- Pyron, R. A., Burbrink, F. T., Colli, G. R., de Oca, A. N. M., Vitt, L. J., Kuczynski, C. A., & Wiens, J. J. (2011). The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and comparison of support methods for likelihood trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.11.006>
- Ramón y Cajal, S. (1983). *La rétine des vertébrés* (pp. 17–257). La cellule.
- Reinert, H. K. (1993). Habitat selection in snakes. In *snakes: Ecology and evolutionary Biology* (pp. 201–240). McMillan Publishing Company.
- Reymond, L. (1987). Spatial visual acuity of the falcon, *Falco berigora*: A behavioural, optical and anatomical investigation. *Vision Research*, 27(10), 1859–1874. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(87\)90114-3](https://doi.org/10.1016/0042-6989(87)90114-3)
- Richard, B. A., & Wainwright, P. C. (1995). Scaling the feeding mechanism of largemouth bass (*Micropterus salmoides*): Kinematics of prey capture. *Journal of Experimental Biology*, 198(2), 419–433.
- Robinson, M.P.; Motta, P. J. (2002). Patterns of growth and the effects of scale on the feeding kinematics of the nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*). *Journal of Zoology*, 256(4), 449–462.

- Rowe, M. H., & Stone, J. (1980). The interpretation of variation in the classification of nerve cells. *Brain Behav. Evol.*, *17*, 123–151.
- Salomao, M. D. G., Almeida Santos, S. M., & Puerto, G. (1995). Activity Pattern of *Crotalus durissus* (Viperidae, Crotalinae): Feeding, Reproduction and Snakebite. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, *30*(2), 101–106. <https://doi.org/10.1080/01650529509360946>
- Sannan, N. S., Gregory-Evans, K., Kusumi, K., & Gregory-Evans, C. Y. (2018). *Anolis carolinensis* as a model to understand the molecular and cellular basis of foveal development. *Experimental Eye Research*, *173*, 138–147.
- Sawaya, R. J., Marques, O. A. V., & Martins, M. (2008). Composition and natural history of a Cerrado snake assemblage at Itirapina, São Paulo state, southeastern Brazil. *Biota Neotropica*, *8*(2), 127–149. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032008000200015>
- Sazima, I. & Haddad, C. F. B. (1992). Répteis da Serra do Japi: Notas sobre a historia natura. In L. P. Morellato (Ed.), *História Natural da Serra do Japi- ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil* (pp. 212–237).
- Sazima, I. (1991). *Caudal luring in two neotropical pitvipers, Bothrops jararaca and Bothrops jararacacussu* (pp. 245–248). Copeia.
- Sazima, I. (1992). Natural history of jararaca pitviper, *Bothrops jararaca* in southeastern, Brazil. *Systematic Biology*, *42*(4), 596. <https://doi.org/10.2307/2992495>
- Sazima, I. (2006). Theatrical frogs and crafty snakes: predation of visually-signalling frogs by tail-luring and ambushing pitvipers. *Aqua (Miradolo Terme)*, *11*(3), 117–124.
- Sazima, I., & Marques, O. A. V. (2007). A reliable customer: Hunting site fidelity by an actively foraging neotropical colubrid snake. *Herpetological Bulletin*, *99*, 36–38.
- Scartozzoni, R. R. (2005). *Morfologia de serpentes aquáticas neotropicais : um estudo comparativo*. Universidade de São Paulo.
- Schott, R. K., Müller, J., Yang, C. G. Y., Bhattacharyya, N., Chan, N., Xu, M., Morrow, J. M., Ghenu, A.-H., Loew, E. R., Tropepe, V., & Chang, B. S. W. (2016). Evolutionary transformation of rod photoreceptors in the all-cone retina of a diurnal garter snake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(2), 356–361. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513284113>
- Schott, R. K., Van Nynatten, A., Card, D. C., Castoe, T. A., & Chang, B. S. W. (2018). Shifts in selective pressures on snake phototransduction genes associated with photoreceptor transmutation and dim-light ancestry. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1376–1389. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy025>
- Shand, J., Chin, S. M., Harman, A. M., Moore, S., & Collin, S. P. (2000). Variability in the Location of the Retinal Ganglion Cell Area Centralis Is Correlated with Ontogenetic Changes in Feeding Behavior in the Black Bream, *Acanthopagrus butcheri* (Sparidae, Teleostei). *Brain Behavior and Evolution*, *55*(4), 176–190.
- Sillman, A. J.; Johnson, J. L. & Loew, E. R. (2001). Retinal photoreceptors and visual

- pigments in *Boa constrictor imperator*. *J. Exp Zool*, 290: 359-365.
- Sillman, A. J., Carver, J. K., & Loew, E. R. (1999). The photoreceptors and visual pigments in the retina of a boid snake, the ball python (*Python regius*). *The Journal of Experimental Biology*, 202 (Pt 14), 1931–1938. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10377274>
- Sillman, A. J., Govardovskii, V. I., Rohlich, P., Southard, J. A., & Loew, E. R. (1997). The photoreceptors and visual pigments of the garter snake (*Thamnophis sirtalis*): a microspectrophotometric, scanning electron microscopic and immunocytochemical study. *Journal Of Comparative Physiology A Neuroethology Sensory Neural And Behavioral Physiology*, 181, 89–101. <https://doi.org/10.1007/s003590050096>
- Simões, B. F., Sampaio, F. L., Loew, E. R., Sanders, K. L., Fisher, R. N., Hart, N. S., Hunt, D. M., Partridge, J. C., & Gower, D. J. (2016). Multiple rod–cone and cone–rod photoreceptor transmutations in snakes: evidence from visual opsin gene expression. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1823), 20152624. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2624>
- Simões, B. F., Sampaio, F. L., Jared, C., Antoniazzi, M. M., Loew, E. R., Bowmaker, J. K., Rodriguez, A., Hart, N. S., Hunt, D. M., Partridge, J. C., & Gower, D. J. (2015). Visual system evolution and the nature of the ancestral snake. *Journal of Evolutionary Biology*, 28(7), 1309–1320. <https://doi.org/10.1111/jeb.12663>
- Singer, M. (1954). The staining of basophilic components. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2(5), 322–333. <https://doi.org/10.1177/2.5.322>
- Snyder, A.W. & Miller, W. H. (1977). Photoreceptor diameter and spacing for highest resolving power. *J Opt Soc Am*, 227–244.
- Specht, G., Mesquita, E. P., & Santos, F. A. (2008). Breeding biology of Laughing Falcon *Herpetotheres cachinnans* (Linnaeus, 1758) (Falconidae) in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 16(2), 155–159.
- Strader, C., Fong, T., & Tota, M. (1994). Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annual Review of Biochemistry*, 63, 101–132. <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.bi.63.070194.000533>
- Szél, Á., Lukáts, Á., Fekete, T., Szepessy, Z., & Röhlich, P. (2000). Photoreceptor distribution in the retinas of subprimate mammals. *Journal of the Optical Society of America A*, 17(3), 568. <https://doi.org/10.1364/josaa.17.000568>
- Tancred, E. (1981). The distribution and sizes of ganglion cells in the retinas of five Australian marsupials. *Journal of Comparative Neurology*, 196(4), 585–603. <https://doi.org/10.1002/cne.901960406>
- Toft, C. A. (1985). Resource Partitioning in Amphibians and Reptiles. *Copeia*, 1985(1), 1. <https://doi.org/10.2307/1444785>
- Tozetti, Alexandro M., & Martins, M. (2008). Habitat use by the South-American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in south-eastern Brazil. *Journal of Natural History*, 42(19–20),

1435–1444. <https://doi.org/10.1080/00222930802007823>

- Tozetti, Alexandro Marques. (2006). *Uso do ambiente, atividade e ecologia alimentar da cascavel (Crotalus durissus) em área de Cerrado na região de Itirapina, SP*. Universidade de São Paulo.
- Tozetti, Alexandro Marques, & Martins, M. (2013). Daily and seasonal activity patterns of free range South-American rattlesnake (*Crotalus durissus*). *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 85(3). <https://doi.org/10.1590/S0001-37652013005000043>
- Turci, L. C. B., Albuquerque, S. de, Bernarde, P. S., & Miranda, D. B. (2009). Uso do hábitat, atividade e comportamento de *Bothriopsis bilineatus* e de *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae) na floresta do Rio Moa, Acre, Brasil. *Biota Neotropica*, 9(3), 197–206. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032009000300020>
- Tyrrell, L.P., Fernández-Juricic, E. (2015). Sensory Systems And Escape Behavior. In D. T. Cooper, W.E., Blumstein (Ed.), *Escaping from Predators: An Integrative View of Escape Decisions* (pp. 322–342).
- Uetz, P., Freed, P., & Hošek, J. (2020). *The Reptile Database*. reptile-database.org
- Underwood, G. (1967). A Comprehensive Approach to the Classification of Higher Snakes. *Herpetologica*, 23(2), 161–168. <https://www.jstor.org/stable/3891250>
- Van Dyke, J. U., & Grace, M. S. (2010). The role of thermal contrast in infrared-based defensive targeting by the copperhead, *Agkistrodon contortrix*. *Animal Behaviour*, 79(5), 993–999. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.01.012>
- Van Essen, D. C., Anderson, C. H., & Felleman, D. J. (1992). Information processing in the primate visual system: an integrated systems perspective. *Science*, 255, 419–423.
- Vanzolini, P. E., Costa, A. M. M. R., & V., L. J. (1980). *Répteis das caatingas* (pp. 249–250). . eye. J. Anim. Behav.
- Vanzolini, PAULO E., & Calleffo, M. E. V. (2002). A taxonomic bibliography of the South American snakes of the *Crotalus durissus* complex (Serpentes, Viperidae). *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 74(1), 37–83. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652002000100005>
- Vidal, N. (2002). Colubroid Systematics: Evidence For An Early Appearance Of The Venom Apparatus Followed By Extensive Evolutionary Tinkering. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 21(1–2), 21–41. <https://doi.org/10.1081/TXR-120004740>
- Vidal, N., Delmas, A.-S., David, P., Cruaud, C., Couloux, A., & Hedges, S. B. (2007). The phylogeny and classification of caenophidian snakes inferred from seven nuclear protein-coding genes. *Comptes Rendus Biologies*, 330(2), 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2006.10.001>
- Viitala, J., Korpimäki, E., Palokangas, P., & Koivula, M. (1995). Attraction of kestrels to vole scent marks visible in ultraviolet light. In *Nature* (Vol. 373, Issue 6513, pp. 425–427). <https://doi.org/10.1038/373425a0>

- Walls, G. L. (1942). *The vertebrate eye and its adaptive radiation*. Cranbrook Institute of Science,. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.7369>
- Warrel, D. A. (2004). Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management. In W. W. Campbell, J. A.; Lamar (Ed.), *The venomous reptiles of the Western Hemisphere*. (pp. 709–761).
- Wassle, H., & Boycott, B. B. (1991). Functional architecture of the mammalian retina. *Physiological Reviews*, *71*(2), 447–480. <https://doi.org/10.1152/physrev.1991.71.2.447>
- Wong, R. O. (1989). Morphology and distribution of neurons in the retina of the American garter snake *Thamnophis sirtalis* [published erratum appears in *J Comp Neurol* 1989 Nov 22;289(4):708]. *J.Comp.Neurol.*, *283*(4), 587–601.
- Yokoyama, S.; & Starmer, W. T. (1996). *Evolution of the G-protein-coupled receptor superfamily* (pp. 93–119). Human Genome Evolution.
- Yokoyama, S. (2000). Molecular evolution of vertebrate visual pigments. *Progress in Retinal and Eye Research*, *19*(4), 385–419. <https://doi.org/10785616>
- Yokoyama, Shozo;, & Yokoyama, R. (1996). Adaptive Evolution of Photoreceptors and Visual Pigments in Vertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *27*(1), 543–567. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.543>
- Yokoyama, Shozo. (1997). Molecular Genetic Basis of Adaptive Selection: Examples From Color Vision in Vertebrates. *Annual Review of Genetics*, *31*(1), 315–336. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.31.1.315>
- Yokoyama, Shozo. (2002). Molecular evolution of color vision in vertebrates. *Gene*, *300*(1–2), 69–78. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00845-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00845-4)
- Yokoyama, Shozo. (2008). Evolution of Dim-Light and Color Vision Pigments. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *9*(1), 259–282. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164228>
- Zelanis, A., Tashima, A. K., Rocha, M. M. T., Furtado, M. F., Camargo, A. C. M., Ho, P. L., & Serrano, S. M. T. (2010). Analysis of the Ontogenetic Variation in the Venom Proteome/Peptidome of *Bothrops jararaca* Reveals Different Strategies to Deal with Prey. *Journal of Proteome Research*, *9*(5), 2278–2291. <https://doi.org/10.1021/pr901027r>

## 9. Anexo

### Anexo 1: Certificado da comissão de ética no uso de animais



INSTITUTO DE PSICOLOGIA

www.ip.usp.br

Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade de São Paulo

### CERTIFICADO

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

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

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

Vigência da Proposta: de [04/2017](#) a [04/2022](#)

Área: [Neurociências E Comportamento/psicologia](#)

Origem:	<a href="#">Animais provenientes de doação espontânea</a>			
Espécie:	<a href="#">Répteis</a>	sexo:	<a href="#">Machos e Fêmeas</a>	idade: <a href="#">1 a 10 anos</a> N: <a href="#">10</a>
Linhagem:	<a href="#">Crotalus durissus terrificus</a>		Peso: <a href="#">100 a 1000 g</a>	
Origem:	<a href="#">Animais provenientes de doação espontânea</a>			
Espécie:	<a href="#">Répteis</a>	sexo:	<a href="#">Machos e Fêmeas</a>	idade: <a href="#">1 a 10 anos</a> N: <a href="#">10</a>
Linhagem:	<a href="#">Crotalus durissus terrificus</a>		Peso: <a href="#">100 a 1000 g</a>	
Origem:	<a href="#">Animais provenientes de doação espontânea</a>			
Espécie:	<a href="#">Répteis</a>	sexo:	<a href="#">Machos e Fêmeas</a>	idade: <a href="#">1 a 10 anos</a> N: <a href="#">10</a>
Linhagem:	<a href="#">Micrurus corallinus</a>		Peso: <a href="#">100 a 1000 g</a>	

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

**INSTITUTO DE PSICOLOGIA**

www.ip.usp.br

*Comissão de Ética no Uso de Animais**Universidade de São Paulo*

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

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

São Paulo, 19 de abril de 2017

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

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

Anexo 2: Testes de Normalidade de Shapiro-Wilk

Variável	Grupo	Teste de Shapiro-Wilk		
		w	p-valor	
Área da Retina (mm <sup>2</sup> )	BjarA	0,89	0,30	
	BjarF	0,91	0,29	
	CdurA	0,94	0,53	
	CdurF	0,97	0,87	
Diâmetro do Olho (mm)	BjarA	0,71	< 0,01	
	BjarF	0,93	0,43	
	CdurA	0,97	0,86	
	CdurF	0,92	0,37	
Fotorreceptores Densidade Média (células/mm <sup>2</sup> )	BjarA	0,98	0,91	
	BjarF	0,95	0,58	
	CdurA	0,85	0,21	
	CdurF	0,89	0,38	
	População Total	BjarA	0,86	0,27
		BjarF	0,99	0,79
		CdurA	0,82	0,13
		CdurF	0,98	0,92
Bastonetes Densidade Média (células/mm <sup>2</sup> )	BjarA	0,99	0,95	
	BjarF	0,92	0,44	
	CdurA	0,85	0,20	
	CdurF	0,89	0,40	
	População Total	BjarA	0,92	0,52
		BjarF	0,95	0,58
		CdurA	0,83	0,14
		CdurF	1,00	0,99
Cones Totais Densidade Média (células/mm <sup>2</sup> )	BjarA	0,95	0,71	
	BjarF	1,00	0,96	
	CdurA	0,98	0,87	
	CdurF	0,93	0,59	
	População Total	BjarA	0,99	0,95
		BjarF	0,79	0,08
		CdurA	0,84	0,20
		CdurF	0,85	0,19
Cones S Densidade Média (células/mm <sup>2</sup> )	BjarA	0,87	0,31	
	BjarF	1,00	0,88	
	CdurA	0,85	0,23	
	CdurF	0,99	0,94	
	População Total	BjarA	0,78	0,07
		BjarF	0,96	0,60
		CdurA	0,92	0,45

		CdurF	0,95	0,69
Cones L	Densidade Média (células/mm <sup>2</sup> )	BjarA	1,00	0,89
		BjarF	0,94	0,53
		CdurA	0,97	0,86
		CdurF	0,88	0,96
		População Total	BjarA	0,87
		BjarF	0,99	0,73
		CdurA	0,95	0,72
		CdurF	0,95	0,75
Células da CCG	Densidade Média (células/mm <sup>2</sup> )	BjarA	0,90	0,43
		BjarF	0,79	0,02
		CdurA	0,92	0,51
		CdurF	0,94	0,66
		População Total	BjarA	0,96
		BjarF	0,93	0,54
		CdurA	0,95	0,70
		CdurF	0,90	0,37
Acuidade Visual (cpg)	Arranjo Quadrado	BjarA	0,96	0,80
		BjarF	0,85	0,09
		CdurA	0,95	0,74
		CdurF	0,96	0,83
		Arranjo Hexagonal	BjarA	0,63
		BjarF	0,84	0,07
		CdurA	0,88	0,25
		CdurF	0,95	0,76