UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

VITOR HENRIQUE CORREDOR

ANÁLISE GENÉTICA DOS PIGMENTOS VISUAIS DA TARTARUGA-DE-ORELHA-VERMELHA, *Trachemys scripta elegans* (Testudine, Emydidae).

São Paulo
2020

VITOR HENRIQUE CORREDOR

ANÁLISE GENÉTICA DOS PIGMENTOS VISUAIS DA TARTARUGA-DE-ORELHA-VERMELHA, *Trachemys scripta elegans* (Testudine, Emydidae).

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Neurociências e Comportamento.

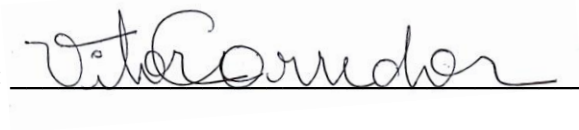
Orientação: Prof.ª Titular Dora Fix Ventura

Coorientação: Dr.ª Einat Hauzman

Departamento de Psicologia Experimental
Instituto de Psicologia
Universidade de São Paulo

São Paulo
2020

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

ASSINATURA:  **DATA:** 11/12/2020

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

Corredor, Vitor Henrique
Análise Genética dos Pigmentos Visuais da Tartaruga-de-Orelha-Vermelha, Trachemys scipta elegans (Testudine, Emydidae) / Vitor Henrique Corredor; orientadora Dora Selma Fix Ventura; co-orientadora Einat Hauzman. -- São Paulo, 2020.
174 f.
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento) -- Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2020.

1. Trachemys scipta elegans. 2. Retina. 3. Opsinas. 4. Fotorreceptores. 5. 11-cis-3,4-dehidroretinal. I. Fix Ventura, Dora Selma, orient. II. Hauzman, Einat, co-orient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Vitor Henrique Corredor
Título: "Análise genética dos pigmentos visuais da tartaruga-de-orelha-vermelha, *Trachemys scripta elegans* (Testudine, Emydidae)"

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Neurociências e Comportamento.

Dissertação defendida e aprovada em: 11/12/2020

Banca Examinadora

Orientador (a): Profa. Dra. Dora Selma Fix Ventura

Instituição: Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Examinador (a): Prof. Dr. Arlan da Silva Gonçalves

Instituição: Instituto Federal do Espírito Santo

Julgamento: Aprovado

Examinador (a): Prof. Dr. Fernando Allan de Farias Rocha

Instituição: Universidade Federal do Pará

Julgamento: Aprovado

À minha mãe Leni da Silva, por todo o apoio, incentivo e por, desde sempre, me instigar a percorrer o caminho do conhecimento.

Ao meu pai Daniel André Corredor, pelo apoio, carinho e por sempre se fazer presente em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) por meio da concessão de bolsa de estudo de Mestrado, nº de processo 88882.376504/2019-01.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Brasil (FAPESP) por meio de Projeto Temático, nº de processo 2014/26818-2.

Agradeço à minha orientadora, Professora Dr.ª Dora Fix Ventura, por todos os ensinamentos, pelo auxílio na realização deste trabalho e pelo grande exemplo de pesquisadora.

À minha coorientadora e amiga, Dr.ª Einat Hauzman, por todos os ensinamentos, pelo apoio, incentivo e pelo grande exemplo de dedicação e amor à ciência.

À Myriam Elizabeth Velloso Calleffo e ao Instituto Butantan pelo fornecimento das tartarugas.

Ao Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa (IIEP) do Hospital Israelita Albert Einstein, por aceitar a realização deste projeto e permitir a utilização dos equipamentos.

Ao Professor Dr. Arlan da Silva Gonçalves, do Instituto Federal do Espírito Santo, pelos importantes ensinamentos e por me receber com toda hospitalidade e cordialidade.

Às minhas amigas Juliana Hiromi Tashiro (Ju) e Maria Julia Vilani Naman (Maju) pelos valiosos apontamento e sugestões ao longo da escrita deste trabalho.

A todos os amigos e colegas do Labvis, professores, alunos e funcionários, por toda ajuda, pelo agradável convívio e pelo aprendizado diário.

Aos meus irmãos, pelo apoio e carinho.

E agradeço especialmente aos meus pais, Leni e Daniel, pelo carinho, apoio, incentivo e por sempre estarem ao meu lado. Muito obrigado!

"(...) Meu passo é o primeiro e, portanto, pequeno apesar de elaborado com muito pensamento e duro labor. Deve ser visto como um primeiro passo e julgado com indulgência. Vocês, meus leitores ou ouvintes de minhas palestras, se pensarem que fiz o tanto que se pode esperar, com justiça, de um ponto inicial, ... reconhecerão o que realizei e perdoarão o que deixei para outros realizarem (...)".

Aristóteles

Resumo

O sistema visual dos vertebrados é responsável pela captura e processamento das informações luminosas do ambiente, processo que se inicia na retina a partir da absorção de um quantum de luz pelos pigmentos visuais, localizados no segmento externo dos fotorreceptores, cones e bastonetes. Os pigmentos visuais são proteínas de membrana da família dos receptores acoplados à proteína G, opsinas e rodopsinas, ligados a uma molécula fotossensível derivada da vitamina A_1, retinal, e em algumas espécies, o 3,4-dehidroretinal, derivado da vitamina A_2. A interação do cromóforo com resíduos de aminoácidos específicos determina a banda de absorção espectral e respectivo comprimento de onda máximo (λ_{max}) do pigmento visual. Adicionalmente, a troca do cromóforo retinal pelo 3,4-dehidroretinal, ocasiona o deslocamento batocrômico do λ_{max}. A tartaruga-de-orelha-vermelha, *Trachemys scripta elegans*, utiliza o 3,4-dehidroretinal e expressa as cinco classes de opsinas de vertebrados, a rodopsina, RH1, em bastonetes, com λ_{max} em 518 nm, e quatro opsinas expressas em diferentes cones, SWS1 (λ_{max} 372 nm), SWS2 (λ_{max} 458 nm), RH2 (λ_{max} 518 nm) e LWS (λ_{max} 617 nm). Este estudo teve como objetivo sequenciar os cinco genes de opsinas visuais expressos na retina de *T. s. elegans* e predizer o λ_{max} das opsinas com base na sequência de aminoácidos e em modelos computacionais. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (Protocolo 5446131117). Um indivíduo adulto foi eutanasiado com tiopental sódico (100 mg/ kg), os olhos foram enucleados e preservados em RNA later a 4º C. O RNA total foi extraído a partir das retinas homogeneizadas, e convertido em DNA complementar (cDNA). Os genes de opsinas foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (*PCR*), utilizando primers específicos. Os produtos da *PCR* foram visualizados em gel de agarose (1%), purificados e sequenciados por sequenciamento Sanger. A identidade de cada gene foi confirmada com uso da ferramenta *BLASTn* e a partir de análises filogenéticas. O λ_{max} de cada pigmento visual foi estimado a partir dos aminoácidos presentes em posições importantes para o deslocamento espectral descritos na literatura. Estes valores de λ_{max} foram corrigidos considerando o deslocamento causado pelo uso do cromóforo 3,4-dehidroretinal, com base em curvas de calibração desenvolvidas a partir de valores de λ_{max} medidos em opsinas com ambos os tipos de cromóforos. Para todos os fotopigmentos a estimativa do λ_{max} foi próxima dos valores descritos em estudos prévios: SWS1 = 374 nm, SWS2 = 456 nm, RH1 = 518 nm, RH2 = 519 nm, e LWS = 617 nm. Os modelos computacionais foram elaborados a partir da técnica de modelagem comparativa (MC) e modelagem por *threading*. O espectro de absorção foi analisado com o auxílio do *software* ORCA segundo o método TD-DFT, aplicando-se a base de cálculo funcional B3LYP e 6-31G. Todos os modelos apresentaram boa qualidade estrutural, com mais de 90% dos aminoácidos dispostos em regiões altamente favoráveis, de acordo com o diagrama de Ramachandran. Para cada modelo, foram realizados estudos de docagem molecular para verificar o melhor posicionamento da estrutura do cromóforo na proteína. O λ_{max} estimado com base nos modelos computacionais foram coerentes com o λ_{max} da rodopsina, 517 nm, porém apresentou diferenças em relação às opsinas de cones: SWS1 = 400 nm, SWS2 = 437 nm, RH2 = 500 nm, e LWS = 627 nm. Estas diferenças podem ser resultantes da abordagem computacional utilizada, em que apenas aminoácidos distantes até 4 angströms do cromóforo foram considerados. Este trabalho estabeleceu uma equação capaz de determinar o λ_{max} de pigmentos visuais baseados no uso da vitamina A_2, e mostrou que as estimativas de λ_{max} baseadas nos aminoácidos nos resíduos de deslocamento espectral das cinco opsinas foram coerentes com registros de microespectrofotometria e eletrofisiologia. Embora as estimativas de λ_{max} obtidas a partir dos modelos computacionais tenham apresentado inconsistências, as análises *in silico* foram promissoras e possibilitam a aplicação de uma nova abordagem metodológica para investigações futuras da sensibilidade espectral de vertebrados.

Palavras-chave: *Trachemys scripta elegans*, Retina, Opsinas, Fotorreceptores, 11-cis-retinal, 11-cis-3,4-dehidroretinal.

Abstract

The visual system of vertebrates is responsible for capturing and processing light information from the environment. This process begins in the retina with the absorption of photons by the visual photopigments, located in the outer segments of the photoreceptors, cones, and rods. The visual pigments are G protein-coupled receptors, opsins, and rhodopsins, bound to a prosthetic photosensitive molecule, the retinal, derived from vitamin A_1, and in some species, the 3,4-dehydroretinal, derived from vitamin A_2. The interaction of the chromophore with specific amino acid residues of the protein determines the spectral absorption band and respective maximum wavelength (λ_{max}) of the visual pigment. Additionally, the replacement of the retinal chromophore by the 3,4-dehydroretinal causes a bathochromic shift of the λ_{max} of the visual pigments. The freshwater red-eared turtle, *Trachemys scripta elegans*, is known to use the 3,4-dehydroretinal and to express the five classes of visual pigments of vertebrates, the rhodopsin, RH1, in rods, with λ_{max} at 518 nm, and four cone-opsins in different types of cones: SWS1 (λ_{max} 372 nm), SWS2 (λ_{max} 458 nm), RH2 (λ_{max} 518 nm), and LWS (λ_{max} 617 nm). In this study, the five visual opsin genes expressed in retinas of *T. s. elegans* were sequenced, and the opsins λ_{max} were predict based on the amino acid sequences and using computational models. This project was approved by the Ethical Committee in the Use of Animals, from the Psychology Institute, University of São Paulo (Protocol 5446131117). One adult specimen was euthanized with sodium thiopental (100 mg/kg), the eyes were enucleated and preserved in RNA later at 4º C. The total RNA was extracted from homogenized retinas and converted to complementary DNA. The opsin genes were amplified by polymerase chain reactions (PCR) using specific primers. The PCR products were visualized in agarose gel (1%), purified, and directly sequenced by Sanger sequencing. The identity of each opsin gene was confirmed by BLAST searches and phylogenetic analysis. The λ_{max} of each visual pigment was estimated based on the amino acids located at known spectral tuning sites. These values have been corrected considering the shift caused by the use of the 3,4-dehydroretinal, based on calibration curves constructed from λ_{max} values measured in opsins associated with both chromophore types. The predicted λ_{max} of all visual pigments were close to the values measured in previous studies: SWS1 = 374 nm, SWS2 = 456 nm, RH1 = 518 nm, RH2 = 519 nm, and LWS = 617 nm. The computational models were elaborated by comparative modeling (MC) and threading modeling. The absorption spectrum was analyzed with ORCA software, according to the TD-DFT method, applying the functional calculation base B3LYP and 6-31G. All computational models had good structural quality, with more than 90% of the amino acids arranged in favorable regions according to the Ramachandran diagram. For each model, molecular docking studies were carried out to verify the best positioning of the chromophore structure in the protein. The estimated λ_{max} based on computational models agreed with the λ_{max} measured for rhodopsin, 517 nm, but had considerable differences for the cone opsins: SWS1 = 400 nm, SWS2 = 437 nm, RH2 = 500 nm, and LWS = 627 nm. These discrepancies might be resultant from the computational approach applied, in which only the amino acids located at 4 angstroms distance from the chromophore were considered for estimating the spectral peak. In conclusion, this study has established an equation capable of determining the λ_{max} of visual pigments based on the use of vitamin A_2 chromophore and our λ_{max} predictions based on the amino acids at known spectral tuning sites were consistent with previous electrophysiological and microspectrophotometry data, for all visual photopigments. Although the λ_{max} predictions from computational models had inconsistencies, the *in silico* analyses performed are promising, and opens up a new methodological approach for further investigations of vertebrates' spectral sensitivity.

Palavras-chave: *Trachemys scripta elegans*, Retina, Opsinas, fotorreceptores, 11-cis-retinal, 11-cis-3,4-dehidroretinal.

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema da secção horizontal do olho da tartaruga *Testudo graeca*. (c) Coroide; (co) conjuntiva; (cs) Canal de Schlemm; (cr) Córnea; (hc) Canal hialoide; (l) Lente; (mt) Tecido da malha trabecular; (n) Nasal; (o) Nervo óptico; (r) Retina; (sc) Cartilagem escleral; (so) Ossículos esclerais (t) Temporal; (z) Zonule. 29
Figura 2 - Corte radial da retina de *Trachemys scripta elegans* corada com Hematoxilina-Eosina. Na imagem observam-se as dez características camadas laminares. De cima para baixo: (1) Epitélio pigmentado; (2) Segmento externo de cones e bastonetes; (3) Membrana limitante externa; (4) Camada nuclear externa; (5) Camada Plexiforme externa; (6) Camada nuclear interna; (7) Camada Plexiforme interna; (8) Camada de células ganglionares; (9) Camada de fibras do nervo óptico e (10) Membrana limitante interna. Barra de escala = 10 µm. 30
Figura 3 – Representação esquemática de corte transversal dos fotorreceptores clássicos da retina de vertebrados, bastonete à direita e cone à esquerda. Em ambos os fotorreceptores é possível observar estruturas comuns como: (1) o segmento externo, constituído por discos membranosos; (2) o segmento interno, constituído por um (a) elipsoide contendo aglomerado de mitocôndrias, (b) mióide e (c) núcleo; (3) terminal sináptico..... 31
Figura 4 - Modelo representativo do fotopigmento RH1 de *Trachemys scripta elegans* construído a partir do método de Modelagem Comparativa com o auxílio do servidor SwissModel (Disponível em https://swissmodel.expasy.org). **(A)** A rodopsina pode ser observada em azul atravessando a membrana celular dos discos membranosos do segmento externo dos fotorreceptores. A porção lipídica que compõe a membrana celular pode ser observada em cinza e as moléculas de água que compõem o meio podem ser visualizadas em vermelho e em branco. **(B)** Cada uma das sete regiões transmembranares da proteína, organizadas em α-hélice, podem ser observadas em diferentes cores. O retinal, representado em cinza e indicado pela seta preta, aparece na região próxima à sexta e sétima hélice. 32
Figura 5 – Filogenia das cinco classes de opsinas em vertebrados. Na imagem, são mostrados representantes dos principais grupos de vertebrados. Os círculos indicam os eventos de duplicações gênicas, quatro ocorrendo anteriormente ao aparecimento da mandíbula nos vertebrados, cerca de 550 MA, e a duplicação do gene *Lws* ocorrendo há cerca de 35 MA. Nanômetro (nm)...... 33
Figura 6 - **(A)** Corte radial da retina de *Trachemys scripta elegans* com reação imunohistoquímica para anticorpo anti-opsina (JH 492). O anticorpo utilizado foi inespecífico para as opsinas de *Trachemys sp.* Na figura podem ser observadas gotículas de óleo com coloração amarelada localizadas logo abaixo do segmento externo dos cones. Barra de escala = 10 µm. 35
Figura 7 – Representação 2D da rodopsina RH1 bovina. O modelo é baseado em Palczewski e colaboradores (2000). Os círculos pretos indicam a posição dos aminoácidos envolvidos no deslocamento espectral da rodopsina. O cromóforo 11-cis-retinal está representado em preto (Yokoyama *et al*, 2008). 38

Figura 8 - Isoformas do retinal. **(A)** Molécula do retinal 11-cis-retinal antes (esquerda) e após (direita) a mudança conformacional sofrida em função da absorção de fótons de luz (γ). A fotoisomerização (representado pela seta) é um evento no sistema visual dependente da luz, a mudança conformacional sofrida pelo cromóforo dá origem ao processamento da informação visual na retina. **(B)** Isoformas do retinal antes (esquerda) e após (direita) a fotoisomerização em representação CPK (que indica as iniciais dos pesquisadores Corey, Pauling e Koltun responsáveis pelo desenvolvimento do modelo físico no qual foi inspirado esse tipo de representação). Barra de escala = 5 angströms (Å). A visualização das estruturas químicas dos cromóforos foi realizada por meio do *software* Discovery Studio Visualizer (Accelrys, San Diego, Califórnia, EUA). 40
Figura 9 - Molécula de 11-cis-retinal ligada covalentemente ao resíduo lisina na posição 296 (Lys296) da sétima hélice transmembranar da rodopsina bovina. A seta indica a ligação dupla que forma a base de Schiff responsável por manter o cromóforo unido à lisina. As esferas cinzas representam átomos de carbono; As esferas azuis representam átomos de nitrogênio; As esferas brancas representam átomos de hidrogênio; A esfera vermelha representa um átomo de oxigênio. A visualização das estruturas foi realizada com o auxílio do *software* Avogadro v.1.90.0. 41
Figura 10 - **(A)** Estrutura química de ambas as classes de cromóforos, na conformação *all-trans* encontradas nos fotopigmentos de vertebrados. À esquerda observa-se a estrutura do retinal. À direita observa-se a estrutura do dehidroretinal. A seta em vermelho indica a ligação dupla existente entre os carbonos 3 e 4 da molécula, característica do dehidroretinal. Em ambas as estruturas se encontra demarcada a contagem dos carbonos que as compõe. **(B)** Curvas de absorção espectral da rodopsina (λ_{max} = 500 nm; à esquerda) comparada ao seu correspondente porfiropsina (λ_{max} = 523 nm; à direita)..... 42
Figura 11 - Transmissividade espectral da luz em corpos d'água de diferentes profundidades. Nota-se que até cerca de 10 metros de profundidade há predominância de luz entre ~500 e 620 nm. Até cerca de 50 m, observa-se a atenuação majoritária da luz violeta e a verde. A luz azul-esverdeada com comprimento de onda centrado em 480 nm é a menos atenuada, atingindo 1% de seu valor de superfície a aproximadamente 100 m. 44
Figura 12 – Imunohistoquímica para identificação da expressão do citocromo Cyp27c1 realizada em cortes transversais da retina de Danio rerio tratado e não tratado com Hormônio da Tireoide (HT). Em verde, é revelada a presença do citocromo na camada do Epitélio Pigmentado (CEP) em indivíduos tratados. Em azul, observa-se a marcação com DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) dos núcleos celulares na Camada do Epitélio Pigmentar (CEP), Camada Nuclear Externa (CNE) e Camada Nuclear Interna (CNI). Barra de escala = 50 μm. 45
Figura 13 - **(A)** Indivíduo de *Trachemys scripta elegans*. **(B)** Detalhe apresentando a faixa vermelha característica, presente em ambos os lados da cabeça nos indivíduos desta espécie. 47
Figura 14 - **(A)** Mapa de isodensidade apresentando a distribuição de células da CCG de retina de *T. s. elegans*, com faixa visual ao longo do eixo meridional da retina.

Densidade x10^3 células/mm^2. O círculo preto indica a posição do nervo óptico. N: nasal; V: ventral. 48
Figura 15 - Representação de corte transversal dos fotorreceptores da tartaruga *Trachemys scripta elegans.* **(A)** Cone simples, **(B)** Cone duplo e **(C)** Bastonete. Pode-se observar as seguintes estruturas: (se) Segmento externo; (go) Gotícula de óleo; (el) Elipsoide; (pa) Paraboloide; (ml) Membrana limitante; (nu) Núcleo; (ts) Terminal sináptico. A seta localizada a direita indica o sentido da passagem da luz pela retina. . 50
Figura 16 – Representação esquemática de corte transversal de fotorreceptores da tartaruga *T. s. elegans* ilustrando a diversidade morfológica destas células na retina da espécie. Da esquerda para a direita pode-se listar: cones UV, com gotícula transparente (*tp*); os cones S, com gotícula transparente e fluorescente (*fc*); os cones M, com gotícula amarela (*a*); os cones L duplos, com gotícula laranja (*l*); os cones L simples, com gotícula laranja (*l*) e com gotícula vermelha (*v*); os bastonetes, sem gotícula. 50
Figura 17 – Mapas de isodensidade de fotorreceptores da retina da tartaruga *T. s. elegans* apresentando, em escala de cinza, os valores de densidade para **(A)** cones duplos, **(B)** cones L, **(C)** cones M, **(D)** cones S, **(E)** cones UV e **(F)** bastonetes. A escala à direita dos mapas indica os valores de densidade para as diferentes tonalidades de cinza. Em todos os mapas, com exceção dos bastonetes, pode-se observar como padrão, a especialização da retina em faixa visual. Os bastonetes apresentaram um padrão de distribuição assimétrico ao longo do eixo dorso-ventral, com maior densidade nas regiões próximas ao nervo óptico e na periferia ventral. Os discos brancos representam a posição do nervo óptico. D = dorsal; V = ventral; N = nasal; T = temporal. 51
Figura 18 - Curvas de absorção espectral obtidas por meio de microespectrofotometria para duas espécies de tartarugas. **(A)** λ_{max} de absorbância espectral, medidos nos segmentos externos de cones de *Chelonia mydas mydas*, em 440 nm (cones S), 502 nm (cones M), 562 nm (cones L) e bastonetes com λ_{max} em 502 nm. **(B)** λ_{max} de absorbância espectral, medidos nos segmentos externos de cones de *Trachemys scripta elegans*, em 450 nm (cones S), 518 nm (cones M) e 620 nm (cones L). 52
Figura 19 – Modelo computacional da rodopsina de *Trachemys scripta elegans*. Demarcado pelas linhas amarelas pode-se verificar a região denominada *Grid box*. 65
Figura 20 - Análise filigenética das sequências de nucleotídeos dos cinco grupos de opsina visuais de vertebrados, construída pelo método de Máxima Verossímilhança (MV). Sequências de melanopsina pertencentes a tartaruga *T. s. elegans*, ao peixe bagre *Ictalurus punctatus* e à ostra *Crassostrea gigas* (números de acesso no GenBank: HM197714.1, FJ839438.1, XM_011448368.2 respectivamente) foram utilizadas como grupo externo. (dado não apresentado). A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeo por sítio. 68
Figura 21 - Detalhe das árvores resultantes para cada gene de opsina expresso por *T. s. elegans* obtidas por MV, a partir de alinhamento das sequências de nucleotídeos dos genes de opsinas da tartaruga-de-orelha-vermelha e de outros vertebrados (Anexo III). A probabilidade bayesiana (PB) e o *bootstrap* da análise de MV estão representados para cada ramo resolvido, nesta ordem (PB/MV). O clado dos testudíneos está representado por linhas vermelhas, e a tartaruga *T. s. elegans* destacada em vermelho. As letras ao lado do clado dos testudíneos identificam as famílias aos quais as espécies

apresentadas pertencem. Ch = Cheloniidae; Em = Emydidae; Te = Testudinidae; Tr = Trionychidae. 70
Figura 22 – Fotografia de gel de agarose indicando a amplificação do gene do citocromo *cyp27c1* expresso na retina da tartaruga *T. s. elegans*. Na figura estão numeradas amostras de outras espécies de vertebrados: **(1)** Marcador de peso molecular: 100 pb *ladder*; **(2)** Serpente: *Philodryas patagoniensis*; **(3)** Anfíbio anuro: *Adenomera sp.*; **(4)** Ave: *Mivalgo chimachima*; **(5)** Mamífero: *Canis familiaris*; **(6)** Tartaruga *T. s. elegans*; **(7)** Controle negativo, sem amostra de *DNA*..... 71
Figura 23 - Comparação de diferentes regressões matemáticas estabelecidas para os valores de absorção espectral de pigmentos visuais que utilizam o retinal e o 3,4-dehidroretinal como grupo prostético. **(A)** Correlação realizada com um ajuste polinomial de grau 1 (R^2 = 0,9937). **(B)** Correlação realizada com um ajuste polinomial de grau 2 (R^2 = 0,9957). **(C)** Correlação realizada com um ajuste exponencial de grau 1 (R^2 = 0,9751). **(D)** Correlação realizada com um ajuste exponencial de grau 2 (R^2 = 0,9869). **(E)** Correlação realizada com um ajuste exponencial de grau 1 (R^2 = 0,9858). **(F)** Correlação realizada com um ajuste exponencial de grau 2 (R^2 = 0,9881). A despeito de os valores de R^2 apresentarem boas regressões, pode-se perceber que o melhor ajuste é obtido pela relação polinomial de segundo grau. 72
Figura 24 - Curva de calibração para conversão dos valores de absorção espectral de pigmentos visuais que utilizam o retinal (vitamina A_1) para os valores de absorção espectral dos que utilizam o 3,4-dehidroretinal (vitamina A_2). Na figura, os quadrados contornados em preto representam os valores de absorção espectral obtidos na literatura (Tabela 5; ver Material e Métodos). A média dos valores de absorção espectral pode ser observada a partir dos triângulos contornados em verde. A linha de tendência é mostrada em vermelho. A correlação entre os dados foi obtida a partir de um ajuste quadrático de equação y = 0,002531 * (x^2) + (-1,12) * x + 450,6. R^2 = 0,9957. Nanômetro (nm). 73
Figura 25 - Curvas de absorção espectral para os cinco grupos de opsinas de *T. s. elegans.* A linha vermelha indica a curva de absorção espectral do grupo LWS (λ_{max} = 617 nm). A linha verde indica a curva de absorção espectral do grupo RH2 (λ_{max} = 520 nm). A linha preta tracejada representa a curva de absorção espectral do grupo RH1 (λ_{max} = 518 nm). A linha azul indica a curva de absorção espectral do grupo SWS2 (λ_{max} = 456 nm). A linha lilás indica a curva de absorção espectral do grupo SWS1 (λ_{max} = 374 nm). Todos os valores estimados foram corrigidos de acordo com o ajuste quadrático. As curvas de absorção espectral foram estimadas com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (Govardovskii *et al*., 2000). Nanômetro (nm). 74
Figura 26 - Curva de absorção espectral obtida para o pigmento visual SWS1 da espécie *Trachemys scripta elegans* a partir de aminoácidos localizados em posições críticas para o deslocamento espectral. A presença do aminoácido Fenilalanina na posição 86 permite estimar o λ_{max} na faixa do UV com λ_{max} em 358 nm (linha preta tracejada). A aplicação da relação polinomial proposta pelo presente trabalho para a correção da banda de absorção espectral em função da utilização do 3,4-dehidroretinal como cromóforo, resultou em um λ_{max} em ~375 nm (linha vermelha contínua). As

curvas de absorção espectral foram estimadas com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (Govardovskii *et al*., 2000). nm = nanômetro. 75
Figura 27 - Curva de absorção espectral obtida para o pigmento visual SWS2 de *Trachemys scripta elegans* a partir de aminoácidos localizados em posições críticas para o deslocamento espectral. Foram identificadas as substituições F46L, F52V, S91T, M99S, H100Q, T116A, F159L, A164G, A166V, T169A e T217S sendo que apenas dois eventos de substituições apresentaram influência conhecida sobre o λ_{max} da espécie. As substituições F46L e F52V contribuem com o deslocamento espectral batocrômico de 6 e 1nm, respectivamente (Yokoyama *et al*., 2007; Yokoyama & Tada, 2003). Assim, o λ_{max} da opsina SWS2 foi estimado, primeiramente, em 447 nm (linha preta tracejada). Entretanto, a aplicação da relação polinomial resultou em um λ_{max} em ~456 nm (linha vermelha contínua). As curvas de absorção espectral foram estimadas com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (2000). nm = nanômetro. 77
Figura 28 - Curva de absorção espectral obtida para o fotopigmento RH1 da espécie *T. s. elegans* a partir de aminoácidos localizados em posições críticas para o deslocamento espectral. Dentre os treze resíduos analisados foram identificadas as substituições D83N e M183L responsáveis por contribuir, cada uma, com o deslocamento hipsocrômico de 2 nm (Zhao *et al*., 2009). Deste modo, o λ_{max} da opsina RH1 foi estimado, primeiramente, em 496 nm (linha preta tracejada). Entretanto, a aplicação da relação para a correção da banda de absorção espectral em função da utilização do 3,4-dehidroretinal como cromóforo, resultou em um λ_{max} de ~518 nm (linha vermelha contínua). As curvas de absorção espectral foram estimadas com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (2000). nm = nanômetro. 78
Figura 29 - Curva de absorção espectral obtida para o pigmento visual RH2 da tartaruga *T. s. elegans* a partir de aminoácidos localizados em posições críticas para o deslocamento espectral. Considerando o deslocamento hipsocrômico de 13 nm ocasionado pela substituição E122Q, o λ_{max} deste pigmento pode ser estimado em 498 nm (linha tracejada). O valor de λ_{max} da opsina RH2 corrigido pela curva de calibração resultou em um λ_{max} de ~520 nm (linha contínua). As curvas de absorção espectral foram estimadas com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (2000). nm = nanômetro. 79
Figura 30 - Curva de absorção espectral obtida para o pigmento visual LWS da espécie *T. s. elegans* a partir de aminoácidos localizados em posições críticas para o deslocamento espectral. A curva apresenta seu λ_{max} em 560 nm, correspondendo ao perfil SHYTA observado nos resíduos 164, 181, 261, 269 e 292 (linha preta tracejada). A submissão deste valor ao parâmetro de correção proposto pelo presente trabalho nos permitiu corrigir o valor do λ_{max} da opsina LWS considerando a influência da molécula 3,4-dehidroretinal como cromóforo. A correção resultou em um λ_{max} em ~617 nm (linha vermelha contínua). As curvas de absorção espectral foram estimadas com base no *template* proposto por Govardowski (Govardovskii *et al*., 2000). nm = nanômetro..... 80
Figura 31 - Resultado da análise dos modelos computacionais das opsinas expressas pela tartaruga *T. s. elegans* realizada pelo servidor *Verify3D*. Os modelos SWS1, SWS2 e RH1 apresentaram boa qualidade estrutural, com restrições à posição de poucos aminoácidos. Os modelos RH2 e LWS, apresentaram qualidade estrutural mais baixa,

com restrições em vários aminoácidos. Na figura, os aminoácidos com restrições podem ser observados abaixo da linha tracejada. 82
Figura 32 - Diagramas de Ramachandran obtidos para os modelos computacionais das opsinas expressas pela tartaruga *T. s. elegans*, com o auxílio do servidor PROCHECK. Os diagramas foram construídos baseando-se na posição de resíduos de 118 estruturas com resolução de, pelo menos, 2 Å. Os modelos apresentaram boa qualidade estrutural uma vez que todos apresentaram mais de 90% dos resíduos em regiões favoráveis do diagrama (regiões vermelhas). Os aminoácidos destacados em vermelho indicam aminoácidos de referência. 83
Figura 33 - **(A)** Estrutura computacional da opsina SWS1 da tartaruga *T. s. elegans*. O modelo construído a partir da técnica de *Threading* (cinza) apresentou grande similaridade com a estrutura cristalina da rodopsina bovina (azul), com ambas as estruturas se sobrepondo em diversas regiões. O cromóforo está representado em laranja **(B)** A posição da vitamina A2 + K296 (laranja), determinada por meio do processo de *docking*, foi coerente com a posição do retinal + K296 (cinza) na estrutura da rodopsina bovina. RET = Retinal. 84
Figura 34 - **(A)** Molécula de 11-cis-4,3-dehidroretinal ligada ao resíduo lisina no sítio 296 da opsina SWS1 de *T. s.* elegans. Detalhe apresentando as ligações convencionais de hidrogênio (linha preta tracejada) estabelecidas entre a K196 e os resíduos F293 (2,3 Å) e A292 (3,0 Å). Observa-se também duas ligações de carbono-hidrogênio (linha cinza tracejada) formada entre a K296 e os resíduos S186 (2,9 Å) e o sítio crítico E113 (2,3 Å). Além destas, o nitrogênio da Base de Schiff (amarelo) interage com o resíduo glicina no sítio 113 (azul) por meio de uma ponte salina (1,5 Å) (linha vermelha tracejada). A estrutura do 3,4-dehidroretinal e da lisina 296 podem ser observados em laranja. **(B)** Rede de interação pi-sigma (linha azul tracejada) e do tipo alquil (linha laranja tracejada) entre o cromóforo e aminoácidos no entorno. RET = Retinal. A = Alanina; E = Glutamato; F = Fenilalanina; K = Lisina; L = Leucina; P = Prolina; S = Serina; T = Treonina; W = Triptofano. 85
Figura 35 - **(A)** Estrutura computacional da opsina SWS2 da tartaruga *T. s. elegans*. O modelo construído a partir da técnica de *Threading* (cinza) apresentou grande similaridade com a estrutura cristalina da rodopsina bovina (azul), com ambas as estruturas se sobrepondo em diversas regiões. O cromóforo aparece, na figura, destacado em laranja **(B)** A posição da vitamina A2 + K296 (Lys, laranja), determinada por meio do processo de *docking*, foi coerente com a posição do retinal + K296 (cinza) na estrutura da rodopsina bovina. RET = Retinal. 86
Figura 36 – **(A)** Molécula de 11-cis-3,4-dehidroretinal ligada ao resíduo lisina no sítio 296 da opsina SWS2 de *T. s.* elegans. Detalhe apresentando as ligações convencionais de hidrogênio (linha tracejada preta) estabelecidas entre o resíduo K296 e os aminoácidos T299 (1,9 e 1,8 Å) e V293 (2,4 Å). Também pode-se observar uma ligação de carbono-hidrogênio (linha cinza tracejada) formada entre os resíduos K296 e E113 (2,0 Å). A estrutura do 3,4-dehidroretinal e do resíduo lisina 296 podem ser observados em laranja. O nitrogênio da Base de Schiff está destacado em amarelo. **(B)** Rede de interação do tipo alquil (linha laranja tracejada) estabelecida entre o cromóforo e aminoácidos no entorno. RET = Retinal. A = Alanina; E = Glutamato; F = Fenilalanina;

K = Lisina; M = Metionina; P = Prolina; T = Treonina; V = Valina; W = Triptofano; Y = Tirosina..... 87
Figura 37 - (A) Estrutura computacional da rodopsina da tartaruga *T. s. elegans*. O modelo construído a partir da Modelagem Comparativa (cinza) apresentou ~85% de identidade de sequência com a estrutura da rodopsina bovina utilizada como molde (azul), com ambas as estruturas se sobrepondo em diversas regiões. O cromóforo aparece destacado em laranja **(B)** A posição da vitamina A2 + K296 (Lys, laranja), determinada por meio do processo de *docking*, foi coerente com a posição do retinal + K296 (cinza) na estrutura da rodopsina bovina. RET = Retinal..... 88
Figura 38 - (A) Molécula de 11-cis-3,4-dehidroretinal ligada ao resíduo K296 da rodopsina de *T. s.* elegans. Detalhe apresentando as ligações convencionais de hidrogênio (linha tracejada preta) estabelecidas entre o resíduo K296 e os aminoácidos A299 (2,7 Å), A295 (2,1 Å) e F293 (2,4 Å). O nitrogênio da base de Schiff interage com o resíduo E113 (2,5 Å). Também pode-se observar três ligações de carbono-hidrogênio (linha cinza tracejada) formada entre K296 e os resíduos E113 (2,5 Å), S186 (2,7 Å) e A292 (2,9 Å). Além destas, observa-se uma ligação π-alquil (4,3 Å) entre K296 e F91 (linha laranja tracejada). A estrutura do 3,4-dehidroretinal e do resíduo K296 podem ser observados em laranja. O nitrogênio da Base de Schiff está destacado em amarelo. **(B)** Rede de interação pi-sigma (linha azul tracejada) e do tipo alquil (linha laranja tracejada) estabelecidas entre o cromóforo e aminoácidos no entorno. RET = Retinal. A = Alanina; E = Glutamato; F = Fenilalanina; I = Isoleucina; K = Lisina; S = Serina; Y = Tirosina..... 88
Figura 39 - (A) Estrutura computacional da opsina RH2 da tartaruga *T. s. elegans*. O modelo construído a partir do método de modelagem por *Threading* (cinza) foi similar a estrutura da rodopsina bovina (azul), com ambas as estruturas se sobrepondo em diversas regiões. O cromóforo aparece destacado em laranja **(B)** O processo de *docking* molecular posicionou a estrutura do cromóforo apresentando um considerável desvio em relação à posição do retinal no cristal da rodopsina bovina. A posição do complexo A2 + K296 (Lys, laranja), determinada por meio do processo de *docking*, foi relativamente coerente com a posição do complexo retinal + K296 (cinza) na estrutura da rodopsina bovina. RET = Retinal. 89
Figura 40 - Molécula de 11-cis-3,4-dehidroretinal ligada ao resíduo lisina no sítio 296 da opsina RH2 de *T. s. elegans*. Detalhe das ligações hidrogênio estabelecidas entre o resíduo K296 e dois aminoácidos no entorno. Destas duas, uma primeira foi formada com o resíduo A292 (2,4 Å), ao passo que a outra aparece formada com o resíduo S299. Os aminoácidos A292 e S299 são indicados em magenta. A estrutura do 3,4-dehidroretinal e do resíduo lisina 296 são observados em laranja. RET = Retinal. A = Alanina; D = Aspartato; E = Glutamato; F = Fenilalanina; K = Lisina; M = Metionina; P = Prolina; S = Serina; W = Triptofano; Y = Tirosina..... 90
Figura 41 - (A) Estrutura computacional da opsina LWS da tartaruga *T. s. elegans*. O modelo construído a partir do método de modelagem por *Threading* (cinza) foi similar a estrutura da rodopsina bovina (azul), com ambas as estruturas se sobrepondo em diversas regiões. O cromóforo aparece destacado em laranja **(B)** O processo de *docking* molecular foi bastante eficiente no posicionamento da estrutura do cromóforo no sítio

ativo da proteína. A posição da vitamina A2 + K296 (Lys, laranja), determinada por meio do processo de *docking*, foi coerente com a posição do retinal + K296 (cinza) na estrutura da rodopsina bovina. RET = Retinal. 91
Figura 42 - Molécula de 11-cis-3,4-dehidroretinal ligada ao resíduo K296 da opsina LWS de *T. s. elegans*. Detalhe apresentando as ligações hidrogênio estabelecidas entre K296 e aminoácidos no entorno. Podem ser observadas três ligações sendo duas delas formadas com o resíduo T299 (magenta) e uma última formada com A292 (azul). Em laranja, o 3,4-dehidroretinal e do resíduo K296. RET = Retinal. A = Alanina; C = Cisteina; G = Glicina; H = Histidina; I = Isoleucina; K = Lisina; P = Prolina; T = Treonina; V = Valina; W = Triptofano; Y = Tirosina. 91
Figura 43 - Curvas de absorção espectral dos modelos computacionais construídos para os cinco grupos de opsinas presentes em *T. s. elegans*. A linha vermelha indica a curva de absorção espectral do grupo LWS (λ_{max} = 627 nm). A linha verde indica a curva de absorção espectral do grupo RH2 (λ_{max} = 500 nm). A linha preta representa a curva de absorção espectral do grupo RH1 (λ_{max} = 517 nm). A linha azul indica a curva de absorção espectral do grupo SWS2 (λ_{max} = 437 nm). A linha lilás indica a curva de absorção espectral do grupo SWS1 (λ_{max} = 400 nm). O λ_{max} de cada modelo foi estimado com o auxílio do *software* ORCA utilizando como base a Teoria do Funcional de Densidade Tempo-Dependente (*Time Dependent Density Functional Theory* - TD-DFT) com funcional de correlação-troca B3LYP e conjunto de base 6-31G para o estudo do estado excitado. nm = nanômetros. 92
Figura 44 - Curva de absorção espectral obtida para o modelo computacional construído para o pigmento SWS1 de *T. s. elegans* a partir da sequência de aminoácidos do fotopigmento. A avaliação do espectro de absorção foi realizada a partir da interação entre o 11-cis-3,4-dehidroretinal com os aminoácidos imediatamente próximos à molécula (~4 A). O modelo apresentou λ_{max} em 400 nm. Curva de absorção espectral estimada com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (2000). nm = nanômetros. 93
Figura 45 - Curva de absorção espectral obtida para o modelo computacional construído para o pigmento SWS2 de *T. s. elegans* a partir da sequência de aminoácidos do fotopigmento. A avaliação do espectro de absorção foi realizada a partir da interação entre o 11-cis-3,4-dehidroretinal com os aminoácidos imediatamente próximos à molécula (~4 A). O modelo apresentou λ_{max} em 437 nm. Curva de absorção espectral estimada com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (2000). nm = nanômetros. 94
Figura 46 - Curva de absorção espectral obtida para o modelo computacional construído para o pigmento RH1 de *T. s. elegans* a partir da sequência de aminoácidos do fotopigmento. A avaliação do espectro de absorção foi realizada a partir da interação entre o 11-cis-3,4-dehidroretinal com os aminoácidos imediatamente próximos à molécula (~4 A). O modelo apresentou λ_{max} em 517 nm. Curva de absorção espectral estimada com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (2000). nm = nanômetros. 95
Figura 47 - Curva de absorção espectral obtida para o modelo computacional construído para o pigmento RH2 de *T. s. elegans* a partir da sequência de aminoácidos

do fotopigmento. A avaliação do espectro de absorção foi realizada a partir da interação entre o 11-cis-3,4-dehidroretinal com os aminoácidos imediatamente próximos à molécula (~4 A). O modelo apresentou λ_{max} em 500 nm. Curva de absorção espectral estimada com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (2000). nm = nanômetros. 96
Figura 48 - Curva de absorção espectral obtida para o modelo computacional construído para o pigmento LWS de *T. s. elegans* a partir da sequência de aminoácidos do fotopigmento. A avaliação do espectro de absorção foi realizada a partir da interação entre o 11-cis-3,4-dehidroretinal com os aminoácidos imediatamente próximos à molécula (~4 A). O modelo apresentou λ_{max} em 627 nm. Curva de absorção espectral estimada com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (2000). nm = nanômetros. 97
Figura 49 - Comparação da correlação dos valores de absorção espectral para opsinas que utilizam as vitaminas A1 e/ou A2 como grupo prostético elaborada com base na correlação exponencial proposta por Parry & Bowmaker (2000) (linha preta) com a curva de calibração obtida a partir do ajuste quadrático proposto pelo presente trabalho (linha vermelha). A relação quadrática proposta pelo presente trabalho apresenta um poder descritivo maior. A equação referente a cada uma das curvas e os valores de R^2 encontram-se descritos na figura. nm = nanômetros. 100
Figura 50 - A relação entre os valores de absorção espectral (λ_{max}) medidos experimentalmente (MSP e RI) e os valores estimados pela análise genética realizada neste trabalho para as opsinas LWS (quadrado), RH1 (triângulo para cima), RH2 (losango), SWS2 (círculo) e SWS1 (triângulo para baixo), apresentou uma correlação linear de equação y = a + b*x. Foi encontrado um alto coeficiente de correlação entre os valores estimados pela genética e os dados de microespectrofotometria de Loew & Govardovskii (2001) (azul) e de Liebman & Granda (1971) (laranja), bem como registro intracelular de Ventura *et al*. (2001) (verde). nm = nanômetros. 102
Figura 51 - Curvas de absorção espectral para a opsina SWS1 corrigida a partir da aplicação da curva de calibração proposta no presente trabalho (linha preta contínua). O valor obtido é coerente com os valores descritos na literatura para a mesma opsina (linha vermelha pontilhada). nm = nanômetros. 103
Figura 52 - Análise filogenética das sequências de nucleotídeos do pigmento visual SWS1 de tartarugas construída por meio do método de Máxima Verossimilhança. Os valores observados em cada nó correspondem aos suportes de *bootstrap* e probabilidade *bayesiana*. Ramos com valores de *bootstrap* abaixo de 50% não foram indicados. As tartarugas que supõem-se utilizar o 3,4-dehidroretinal então destacadas em vermelho. Estão demarcados em preto os valores de absorção espectral medidos com o auxílio de técnicas de Microespectrofotometria e/ou Registro Intracelular. Em cinza, podem ser verificados os valores estimados em função da presença do aminoácido fenilalanina na posição 86 da opsina SWS1. nm = nanômetros. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeo por posição. 104
Figura 53 - Comparação das curvas de absorção espectral apresentadas pela literatura para a opsina SWS2 com aquela obtida por meio das análises genéticas conduzidas pelo presente trabalho (linha preta contínua). As análises mostraram uma diferença de ~6 nm

em relação aos dados de Liebman e Granda (1971) (linha vermelha tracejada) e ~3 nm de diferença em relação aos dados apresentados por Loew e Govardovskii (2001) (linha roxa pontilhada). nm = nanômetros. 105
Figura 54 - Reconstrução filogenética das sequências de nucleotídeos do pigmento visual SWS2 de tartarugas construída por meio do método de Máxima Verossimilhança. Os valores observados em cada nó correspondem aos suportes de *bootstrap* e probabilidade *bayesiana*. As tartarugas que supõem-se utilizar o 3,4-dehidroretinal então destacadas em vermelho. A figura apresenta os aminoácidos críticos de deslocamento espectral da opsina SWS2, onde foram identificadas substituições na sequência de aminoácidos da tartaruga-de-orelha-vermelha com relação à opsina ancestral. Destacado em verde os aminoácidos presentes na sequência ancestral da opsina SWS2 dos vertebrados. Os valores entre parênteses representam o λ_{max} da opsina SWS2, medidos por Microespectrofotometria ou Registro Intracelular em preto, e em cinza, estimados a partir da sequência de aminoácidos observada. nm = nanômetros. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeo por posição. 106
Figura 55 - Comparação das curvas de absorção espectral apresentadas pela literatura para a rodopsina RH1 com o valor obtido por meio das análises genéticas conduzidas pelo presente trabalho (linha preta contínua). As análises mostraram uma diferença de ~2 nm em relação aos dados de Liebman e Granda (1971) (linha roxa pontilhada) e menos de 1 nm de diferença em relação aos dados apresentados por Loew e Govardovskii (2001) (linha vermelha tracejada). A linha vermelha está sobreposta à linha preta. nm = nanômetros. 107
Figura 56 - Reconstrução filogenética das sequências de nucleotídeos do pigmento visual RH1 de tartarugas construída por meio do método de Máxima Verossimilhança. Os valores observados em cada nó correspondem aos suportes de *bootstrap* e probabilidade *bayesiana*. As tartarugas que supõem-se utilizar o 3,4-dehidroretinal então destacadas em vermelho. A figura apresenta os aminoácidos presentes em todos os resíduos críticos para a absorção espectral da rodopsina dos vertebrados. Destacados em verde os aminoácidos onde são observadas mutações, com relação à rodopsina ancestral. Entre parênteses, valores das bandas de sensibilidade espectral do fotopigmento RH1, em preto valores medidos por MSP e/ou RI, em cinza, valores estimados em função da sequência de aminoácidos críticos. nm = nanômetros. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeo por posição..... 107
Figura 57 - Comparação das curvas de absorção espectral apresentadas pela literatura para a opsina RH2 com o valor obtido por meio das análises genéticas conduzidas pelo presente trabalho (linha preta contínua). As análises mostraram uma diferença de ~2 nm em relação aos dados de Loew e Govardovskii (2001) (linha roxa pontilhada), sendo compatível com os dados apresentados por Liebman e Granda (1971) (linha vermelha tracejada). A linha vermelha está sobreposta à linha preta. nm = nanômetros..... 108
Figura 58 - Reconstrução filogenética das sequências de nucleotídeos do pigmento visual RH2 de tartarugas, obtida por Máxima Verossimilhança. Os valores observados em cada nó correspondem aos suportes de *bootstrap* e probabilidade *bayesiana*. As tartarugas que supõem-se utilizar o 3,4-dehidroretinal então destacadas em vermelho. A figura apresenta os aminoácidos presentes em todos os resíduos críticos para a absorção

espectral da opsina RH2 dos vertebrados. Estão destacados em verde os aminoácidos onde são observadas mutações, com relação a opsina RH2 ancestral. Entre parênteses, os valores de λ_{max}, em preto os valores medidos por Microespectrofotometria e/ou Registro Intracelular, e em cinza, aqueles estimados em função da sequência de aminoácidos críticos. nm = nanômetros. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeo por posição..... 109
Figura 59 - Comparação das curvas de absorção espectral apresentadas pela literatura para a opsina LWS com o valor obtido por meio das análises genéticas conduzidas pelo presente trabalho (linha preta contínua). As análises mostraram uma diferença de ~2 nm em relação aos dados de Liebman e Granda (1971) (linha roxa pontilhada), sendo compatível com os dados apresentados por Loew e Govardovskii (2001) (linha vermelha tracejada). A linha vermelha está sobreposta à linha preta. nm = nanômetros. 110
Figura 60 - Análise filogenética das sequências de nucleotídeos do pigmento visual LWS de tartarugas construída por meio do método de Máxima Verossimilhança. Os valores observados em cada nó correspondem aos suportes de *bootstrap* e probabilidade *bayesiana*. Ramos com valores de *bootstrap* abaixo de 50% não foram indicados. As tartarugas que supõem-se utilizar o 3,4-dehidroretinal então destacadas em vermelho. Estão demarcados em preto os valores de absorção espectral medidos com o auxílio de técnicas de Microespectrofotometria e/ou Registro Intracelular. Em cinza, podem ser verificados os valores estimados em função da sequência de aminoácidos críticos para a absorção espectral da opsina LWS. A figura apresenta os aminoácidos presentes em todos os resíduos críticos para a absorção espectral da rodopsina dos vertebrados. Estão destacados em verde os aminoácidos onde são observadas mutações. nm = nanômetros. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeo por posição. . 111
Figura 61 - Comparação das curvas de absorção espectral obtidas para os modelos computacionais dos pigmentos visuais de *T. s. elegans* com os resultados das análises genéticas realizadas pelo presente trabalho. Em todos os casos, exceto para a rodopsina (C), observaram-se divergências nos valores de λmax que variaram entre ~10 e 30 nm (nanômetro). 113
Figura 62 - Comparação de modelos de opsinas oriundas de diferentes espécies, criados a partir do método de Modelagem Comparativa. Todos os modelos utilizaram a estrutura da rodopsina bovina (verde; Nº de acesso no *PDB*: 1F88) como *template*. **(A)** Modelo da rodopsina RH1 da tartaruga *T. s. elegans* (azul) sobreposta à estrutura da rodopsina bovina (verde). Ambas as estruturas, modelo e molde, apresentaram 86% de identidade de sequência. Como pode ser observado, as estruturas se sobrepõem com alto grau de precisão. **(B)** Estrutura da opsina SWS1 da tartaruga *T. s. elegans* (amarelo) sobreposta à estrutura da rodopsina bovina (verde). Ambas as estruturas, molde e modelo, apresentaram 47% de identidade de sequência. Apesar de a identidade de sequência, neste caso ser quase a metade da observada na situação anterior, ambas as estruturas apresentam um alto grau de sobreposição. **(C)** Estrutura da rodopsina RH1 da mosca *Bactrocera dorsalis* (magenta; Nº acesso no GenBank: NM_001304973.1) sobreposta à estrutura da rodopsina bovina (verde). Ambas as estruturas, molde e modelo, apresentaram 29% de identidade de sequência. Pode ser observado que as

estruturas apresentam um maior grau de desalinhamento focado, principalmente na região das alças da proteína. Todos os modelos foram construídos com o auxílio do servidor SwissModel. A sobreposição das estruturas foi realizada com o auxílio do *software* PyMol. 140
Figura 63 - Representação esquemática de três classes de potenciais componentes aos Campos de Força. **(A)** O potencial de estiramento considera a variação (Δl) na taxa de compressão e/ ou estiramento de ligações estabelecidas entre dois átomos. A variação é calculada a partir da subtração do comprimento da ligação estirada pelo comprimento da ligação no estado de repouso. Os círculos cinzas representam os átomos pertencentes ao sistema de interesse e as molas representam as ligações entre os átomos. **(B)** O potencial de deformação angular, desta mesma maneira, considera a variação (Δa) da deformação angular como a subtração da deformação angular pelo ângulo da ligação em estado de repouso. Os círculos cinzas representam os átomos pertencentes ao sistema de interesse e as molas representam as ligações entre os átomos. **(C)** Representação da variação angular que dá origem ao potencial diedral. Na imagem, as letras A, B, C e D representam átomos ligados a um eixo em comum, representado pelo círculo cinza. A rotação do eixo causa uma alteração na posição do átomo “D”, indicado em vermelho. 143

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Aminoácidos críticos para a absorção espectral da rodopsina (RH1) de vertebrados..... 37
Tabela 2 - Relação dos valores de sensibilidade espectral (em nm) dos fotopigmentos de cones e bastonetes da tartaruga *T. s. elegans*, obtidos experimentalmente por microespectrofotometria (MSP) e Registro Intracelular (RI)..... 53
Tabela 3 – Descrição dos *primers* desenhados para amplificação dos genes de opsinas de *T. s. elegans.* 59
Tabela 4 – Relação de resíduos críticos de deslocamento espectral das opsinas, investigados neste estudo. 60
Tabela 5 - Valores de absorção espectral correlacionados para o estabelecimento de correlação matemática das bandas espectrais de pigmentos visuais utilizando os cromóforos derivados da vitamina A1 e A2..... 61
Tabela 6 - Sumarização de dados estatísticos referentes a diferentes ajustes utilizados na correlação de dados de absorção espectral para pigmentos visuais que utilizam o retinal e o 3,4-dehidroretinal como grupo prostético. Para cada uma das regressões propostas pode-se observar a equação referente..... 72
Tabela 7 - Descrição e comparação dos aminoácidos encontrados nas posições críticas na sequência ancestral da opsina SWS1 dos vertebrados e da opsina SWS1 de *T. s. elegans*..... 75
Tabela 8 - Descrição e comparação dos aminoácidos encontrados nas posições críticas da opsina SWS2 ancestral dos vertebrados e da opsina SWS2 de *T. s. elegans*. 76
Tabela 9 - Descrição dos aminoácidos encontrados nas posições críticas da opsina RH1 ancestral dos vertebrados e da tartaruga *T. s. elegans*..... 78
Tabela 10 - Descrição dos aminoácidos encontrados nas posições críticas da opsina RH2 ancestral dos vertebrados e da tartaruga *T. s. elegans*. 79
Tabela 11 - Descrição dos aminoácidos encontrados nas posições críticas da opsina LWS ancestral dos vertebrados e da tartaruga *T. s. elegans*..... 80
Tabela 12 -Aminoácidos presentes no complexo 3,4-dehidroretinal-SWS1 utilizado para a análise do espectro de absorção espectral do modelo computacional da opsina SWS1 de *T. s. elegans*. 93
Tabela 13 - Aminoácidos presentes no complexo 3,4-dehidroretinal-SWS2 utilizado para a análise do espectro de absorção espectral do modelo computacional da opsina SWS2 de *T. s. elegans*. 94
Tabela 14 - Aminoácidos presentes no complexo 3,4-dehidroretinal-RH1 utilizado para a análise do espectro de absorção espectral do modelo computacional da opsina RH1 de *T. s. elegans*. 95
Tabela 15 - Aminoácidos presentes no complexo 3,4-dehidroretinal-RH2 utilizado para a análise do espectro de absorção espectral do modelo computacional da opsina RH2 de *T. s. elegans*. 96

Tabela 16 - Aminoácidos presentes no complexo 3,4-dehidroretinal-RH2 utilizado para a análise do espectro de absorção espectral do modelo computacional da opsina RH2 de *T. s. elegans*. 97
Tabela 17 – Comparação dos valores de absorção espectral estimados a partir da sequência de aminoácidos com os valores corrigidos considerando a curva de calibração proposta por Parry e Bowmaker (2000) e a proposta pelo presente trabalho..... 100
Tabela 18 - Valores de absorção espectral das cinco opsinas visuais de *T. s. elegans*.101

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

A	Alanina
Å	Angström – Unidade de medida equivalente à 1e-10 Metros
AA	Aminoácido
BLASTn	*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*
C	Cisteina
cDNA	*Complementary deoxyribonucleic acid*
CPK	Indica as iniciais dos pesquisadores Corey, Pauling e Koltun responsáveis pelo desenvolvimento do modelo físico no qual é inspirado um tipo específico de representação
CYP27C1	Citocromo membro da família P450
cyp27c1	Gene do citocromo CYP27C1, membro da família P450
D	Aspartato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico – do inglês: *Deoxyribonucleic acid*
E	Glutamato
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
IB	Inferência *Bayesiana*
ipRGCs	Subpopulação de células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis – do inglês: *Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells*
K	Lisina
L	Leucina
LWS	Grupo de opsina sensível à comprimentos de onda longo – do inglês: *Long Wavelength Sensitive*
lws	Gene da opsina LWS
M	Metionina
MSP	Microespectrofotometria
MV	Máxima Verossimilhança
MWS	Grupo de opsina sensível à comprimentos de onda médio – do inglês: *Medium Wavelength Sensitive*
N	Asparagina
nm	Nanômetro – Unidade de medida equivalente à 1e-9 Metros
P	Prolina
PB	Probabilidade *Bayesiana*
pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase – do inglês: *Polimerase Chain Reaction*
PDB	Banco de Dados de Proteínas – do inglês *Protein Data Bank*
Q	Glutamina
R	Arginina
Ref.	Referências
Ret.	Retinal
RH1	Grupo de rodopsinas – do inglês: *Rhodopsin-like*
rh1	Gene da rodopsina
RH2	Grupo de opsina sensível à comprimentos de onda médio – do inglês: *Rhodopsin-like 2*
rh2	Gene da opsina RH2
RI	Registro Intracelular

RMSE	Raiz quadrada do erro médio - do inglês: *Root Mean Square Error*
RMSF	Raiz quadrada média da flutuação – do inglês: *Root Mean Square Flutuations*
RNA	Ácido ribonucleico – do inglês: *Ribonucleic Acid*
S	Serina
SSE	Soma dos quadrados residuais – do inglês: S*um of Squared Estimate of Errors*
SWS1	Grupo de opsina sensível à comprimentos de onda curto na região do ultravioleta/violeta – do inglês: *Short Wavelength Sensitive 1*
sws1	Gene da opsina SWS1
SWS2	Grupo de opsina sensível à comprimentos de onda curto na região do violeta – do inglês: *Short Wavelength Sensitive 2*
sws2	Gene da opsina SWS2
T	Treonina
TD-DFT	Teoria do Funcional de Densidade Tempo-Dependente – do inglês: *Time Dependent Density Functional Theory*
UV	Ultravioleta
V	Valina
VS	Visível
W	Triptofano
Y	Tirosina
$\Delta\lambda$max	Deslocamento do comprimento de onda máximo
λmax	Comprimento de onda máximo

Sumário

1. INTRODUÇÃO 28

1.1. Organização das Estruturas Oculares e da Retina em Vertebrados 28

1.2. Os Fotorreceptores e o Início do Processamento Visual 30

1.2.1. Os Genes de Opsinas e sua Sensibilidade Espectral 32

1.2.2. A Fotoisomerização do Cromóforo 39

1.2.3. Rodopsinas e Porfiropsinas: Contrastes e Similaridades 41

1.3. A Retina da Tartaruga *Trachemys scripta elegans* 46

1.3.1. Distribuição de Células da Camada de Células Ganglionares e a Resolução espacial 47

1.3.2. Diversidade e Densidade de Fotorreceptores 49

1.3.3. Sensibilidade Espectral 51

2. JUSTIFICATIVA 55

3. OBJETIVOS 57

3.1. Objetivo Geral 57

3.2. Objetivos Específicos 57

4. MATERIAIS E MÉTODOS 58

4.1. Animais 58

4.2. Genética de Opsinas 58

4.2.1. Isolamento de *RNA* Total 58

4.2.2. Síntese de *DNA* Complementar 58

4.2.3. Reação em Cadeia de Polimerase 58

4.2.4. Sequenciamento de *DNA* 59

4.2.5. Estimativa das bandas de Absorção Espectral 60

4.3. Identificação da Presença do Citocromo CYP27C1 62

4.4. Análises Filogenéticas 63

4.5. Modelagem Computacional 63

4.5.1. Construção dos Modelos *In silico* das Opsinas de *T. s. elegans* 64

4.5.2. Docagem Molecular 64

4.5.3. Estimativa do Espectro de Absorção UV/visível 66

5. RESULTADOS 67

5.1. Análises Filogenéticas 67

5.2. Identificação da Expressão da CYP27C1 na Retina de *T. s. elegans* 71
5.2.1. Curvas de Calibração 71
5.3. Absorção Espectral das Opsinas de *T. s. elegans* 73
5.3.1. Grupo SWS1 74
5.3.2. Grupo SWS2 76
5.3.3. Grupo RH1 77
5.3.4. Grupo RH2 78
5.3.5. Grupo LWS 80
5.4. Modelagem Computacional 81
5.4.1. Caracterização Estrutural dos Modelos de Opsinas de *T. s. elegans* 81
5.4.2. Análise do Espectro de Absorção 92
6. DISCUSSÃO 98
6.1. Estimativa da Absorção Espectral dos Pigmentos Visuais de *T. s. elegans* 99
6.1.1. Absorção espectral da opsina SWS1 102
6.1.2. Absorção espectral da opsina SWS2 104
6.1.3. Absorção espectral da rodopsina RH1 106
6.1.4. Absorção espectral da opsina RH2 108
6.1.5. Absorção espectral da opsina LWS 109
6.2. Estimativa Computacional do Espectro de Absorção UV/visível 111
7. CONCLUSÕES 115
8. REFERÊNCIAS 118
9. APÊNDICE I 138
9.1. Modelagem Molecular 138
9.1.1. Modelagem Estrutural de Proteínas 139
9.1.2. Docagem Molecular 141
9.1.3. Dinâmica Molecular 142
9.1.4. Métodos Semi-empíricos 144
10. ANEXO I 146
11. ANEXO II 147
12. ANEXO III 148

1. INTRODUÇÃO

A interação dos organismos com o meio ambiente ocorre por intermédio dos sistemas sensoriais, responsáveis por captar e converter uma grande gama de informações e estímulos físicos em respostas neurais (Abrahamson *et al*., 1972). A grande variedade de informações e estímulos ambientais tende a exercer forte pressão seletiva sobre estes sistemas, conduzindo-os por diferentes rumos adaptativos. Particularmente, o sistema visual apresenta grande importância para a manutenção de comportamentos vitais nas diferentes classes de vertebrados (Davies *et al*., 2012; Yokoyama, 2002). Este sistema sensorial é responsável pela captação e processamento da informação luminosa do ambiente, e se desenvolveu de diferentes formas ao longo da história evolutiva dos animais, segundo as demandas das espécies (Walls, 1942). De fato, alguns aspectos ecológicos são fatores atuantes no direcionamento da evolução do sistema visual, uma vez que contribuem para o surgimento de adaptações como resposta à qualidade fótica do ambiente (Hauser & Chang, 2017; Castiglione *et al*., 2018; Gutierrez *et al*., 2018; Van Nynatten *et al*., 2019; Wright *et al*., 2019). Embora possam ser observadas uma série de homologias das estruturas visuais dos vertebrados, a grande variação fótica dos nichos ecológicos leva a possíveis alterações estruturais deste sistema. Neste sentido, estudos do sistema visual a partir de diferentes modelos animais possibilitam a observação destas variações e suas relações com a ecologia das espécies.

1.1. Organização das Estruturas Oculares e da Retina em Vertebrados

Os olhos dos vertebrados são responsáveis por fornecer um aparato óptico e neural que permite a captação de fótons do ambiente, marcando o início do processamento visual. O olho dos vertebrados é organizado em três camadas de tecidos dispostos de maneira concêntrica, a esclera, a úvea e a retina (**Figura 1**) (Walls, 1942). A esclera é a camada mais externa do olho formada por fibras colágenas estruturadas de maneira a fornecer suporte e sustentação ao olho. A córnea, contínua à esclera, na região anterior do olho, apresenta um alto grau de organização das fibras colágenas, o que torna o tecido transparente. Tal conformação faz-se necessária para possibilitar a passagem da luz e a focalização da imagem no plano da retina. O cristalino, situado entre a câmara anterior e o humor vítreo, é a segunda lente responsável pelo foco da imagem na retina. De maneira geral, o cristalino das tartarugas tende a ser altamente maleável, o que permite a alteração de seu formato pela contração e relaxamento de

músculos ciliares estriados em associação com ossículos dispostos em torno da lente, possibilitando dessa forma a focalização da imagem na retina (Granda & Dvorak, 1977). A cavidade anterior do olho, entre a córnea e o cristalino, é preenchida pelo humor aquoso. O humor vítreo, por sua vez, é a substância gelatinosa e espessa que preenche o globo ocular na cavidade posterior, entre o cristalino e a retina (Walls, 1942). A úvea, camada intermediária, pode ser subdividida em outras três estruturas, a íris, o corpo ciliar e a coroide, esta última, sendo responsável por nutrir a retina, camada mais interna do olho (**Figura 1**).

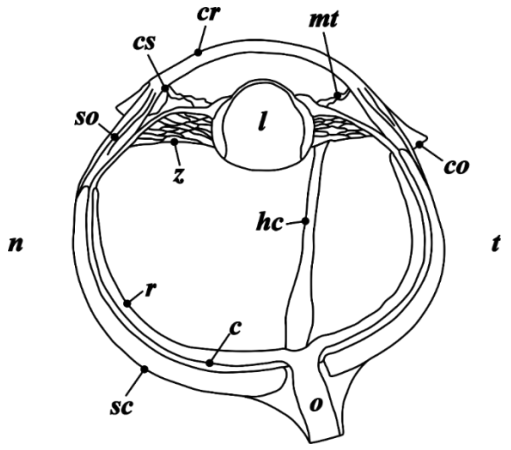


Figura 1 - Esquema da secção horizontal do olho da tartaruga *Testudo graeca*. (c) Coroide; (co) conjuntiva; (cs) Canal de Schlemm; (cr) Córnea; (hc) Canal hialoide; (l) Lente; (mt) Tecido da malha trabecular; (n) Nasal; (o) Nervo óptico; (r) Retina; (sc) Cartilagem escleral; (so) Ossículos esclerais (t) Temporal; (z) Zonule.
Fonte: "The Vertebrate Eyes and its Adaptative Radiations" de G. L. Walls, 1942.

A retina é o tecido neural responsável pela captação do sinal luminoso e início do processamento visual. É um tecido altamente complexo que apresenta organização laminar, constituído pelos corpos celulares dos neurônios, seus processos neuronais e células da glia (Ramón y Cajal, 1893). É classicamente dividida em dez camadas, tendo seu padrão de organização estabelecido da seguinte forma: (1) Camada do Epitélio Pigmentado, na região mais externa da retina, próximo à coroide, formada por células epiteliais com grânulos de pigmentos; (2) Camada de Fotorreceptores, formada pelos segmentos externos e internos de cones e bastonetes; (3) Membrana Limitante Externa, formada por prolongamentos de células de Müller; (4) Camada Nuclear Externa, formada pelos núcleos dos fotorreceptores; (5) Camada Plexiforme Externa, onde ocorrem as sinapses entre fotorreceptores e células bipolares e horizontais; (6) Camada Nuclear Interna, formada pelos núcleos de células bipolares, amácrinas, horizontais e de Müller; (7) Camada Plexiforme Interna, de ocorrência das sinapses entre células

bipolares e amácrinas e as células ganglionares; (8) Camada de Células Ganglionares, com os corpos de células ganglionares e população de amácrinas deslocadas; (9) Camada de Fibras do Nervo Óptico, onde os axônios de células ganglionares dão origem ao nervo óptico; (10) Membrana Limitante Interna, formada pelas porções mais internas de prolongamentos de células de Müller (Ramón y Cajal, 1893). Além da laminação dos corpos celulares e dos plexos nervosos, a coroide e a camada do epitélio pigmentado são divididas por um tecido pentelaminar formado, em suma, por fibras colágenas denominado Membrana de Bruch (**Figura 2**) (Booij *et al*., 2010).

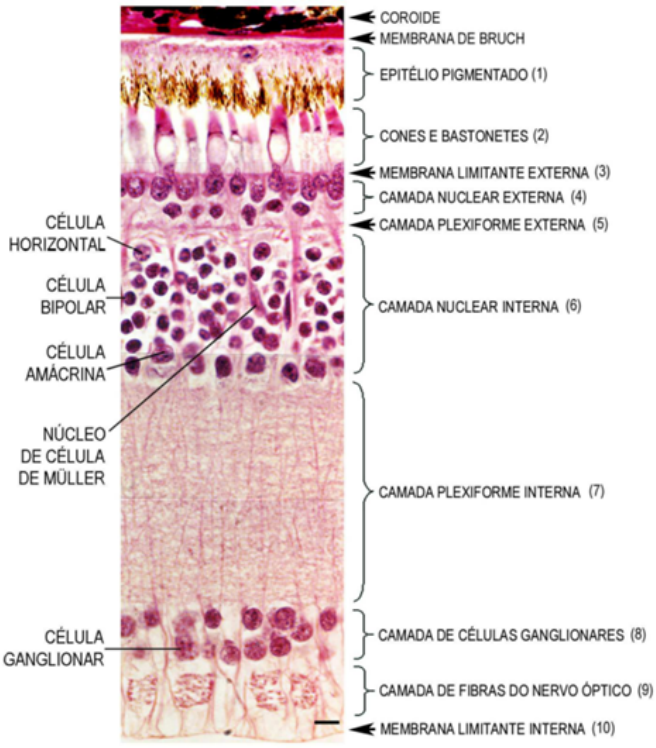


Figura 2 - Corte radial da retina de *Trachemys scripta elegans* corada com Hematoxilina-Eosina. Na imagem observam-se as dez características camadas laminares. De cima para baixo: (1) Epitélio pigmentado; (2) Segmento externo de cones e bastonetes; (3) Membrana limitante externa; (4) Camada nuclear externa; (5) Camada Plexiforme externa; (6) Camada nuclear interna; (7) Camada Plexiforme interna; (8) Camada de células ganglionares; (9) Camada de fibras do nervo óptico e (10) Membrana limitante interna. Barra de escala = 10 µm.
Fonte: "Densidade e topografia dos fotorreceptores da retina da tartaruga *Trachemys scripta elegans* com imunohistoquímica de opsinas" de S. R. Grötzner, 2005 (Tese). Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

1.2. Os Fotorreceptores e o Início do Processamento Visual

Os fotorreceptores são neurônios especializados responsáveis pelo início do processamento da informação visual na retina, capazes de converter energia luminosa em energia eletroquímica, por meio de uma série de cascatas bioquímicas. Tal processo inicia-se a partir da interação entre fótons e moléculas presentes em regiões específicas dos fotorreceptores (Bowmaker & Dartnall, 1980; Langmack & Saibil, 1991). Os

fotorreceptores clássicos são encontrados na camada de fotorreceptores da retina externa dos vertebrados. Denominados cones e bastonetes, estes fotorreceptores são formados por quatro regiões distintas: segmento externo, segmento interno, núcleo e terminal sináptico (**Figura 3**) (Walls, 1942). Cones apresentam um segmento externo com formato cônico e terminal sináptico com formato de pedículo, enquanto os bastonetes apresentam seu segmento externo com formato cilíndrico e terminal sináptico em formato de esférula (**Figura 3**) (Ali & Klyne, 1985).

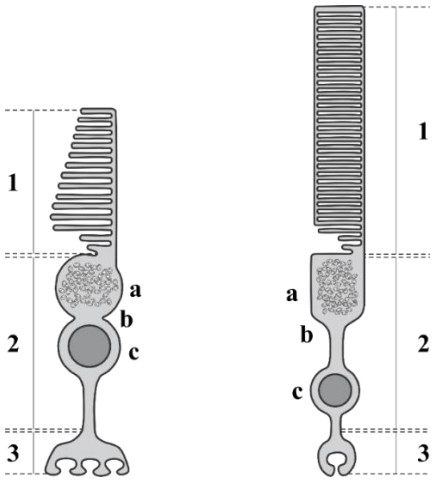


Figura 3 – Representação esquemática de corte transversal dos fotorreceptores clássicos da retina de vertebrados, bastonete à direita e cone à esquerda. Em ambos os fotorreceptores é possível observar estruturas comuns como: (1) o segmento externo, constituído por discos membranosos; (2) o segmento interno, constituído por um (a) elipsoide contendo aglomerado de mitocôndrias, (b) mióide e (c) núcleo; (3) terminal sináptico.

Um outro tipo de fotorreceptor, envolvido no processamento da informação luminosa para gerar uma série de respostas metabólicas do organismo à luz, como controle do ritmo circadiano, da temperatura corporal, e do reflexo pupilar à luz (Bellingham *et al*., 2002; Berson, 2002; Lucas *et al*., 1999; Ignacio Provencio *et al*., 2000), foi descrito por Provencio e colaboradores (1998). Este grupo de fotorreceptores, contém o fotopigmento melanopsina e constitui uma subpopulação de células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis (*ipRGCs*, do inglês: *Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells*), localizadas na camada de células ganglionares de mamíferos. Em vertebrados não mamíferos as melanopsinas já foram descritas também em outras camadas da retina, como as camadas nucleares externa e interna (Bellingham *et al*., 2002; Davies *et al*., 2011; Hauzman *et al*., 2019).

Os segmentos externos dos fotorreceptores clássicos são constituídos por discos membranosos empilhados que contém os pigmentos visuais (ou fotopigmentos), responsáveis pela absorção de fótons e por dar início ao processamento visual (Walls,

1942). Além das diferenças morfológicas observadas, os fotorreceptores da retina externa são responsáveis por garantir a visão em diferentes níveis de iluminação ambiental, com cones e bastonetes apresentando, cada um, uma faixa ótima de atuação. Os bastonetes atuam principalmente em ambientes de baixa luminosidade, compondo o sistema de visão escotópico, ou noturno. Cones, por outro lado, compõem o sistema de visão fotópico, ou diurno (Walls, 1942). Os fotopigmentos são formados por uma porção proteica, a opsina, constituída por uma proteína de membrana integral da família dos receptores acoplados à proteína G, ligada a um cromóforo fotossensível, o 11-cis-retinal, derivado da vitamina A_1, ou o 11-cis-3,4-dehydroretinal, derivado da vitamina A_2 (Bowmaker, 1991). As opsinas são constituídas por cerca de 350 aminoácidos, formando um canal com sete regiões transmembranares organizadas em α-hélice (**Figura 4**).

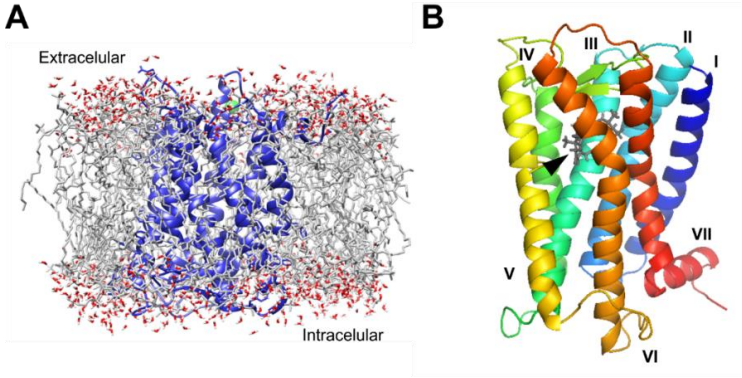


Figura 4 - Modelo representativo do fotopigmento RH1 de *Trachemys scripta elegans* construído a partir do método de Modelagem Comparativa com o auxílio do servidor SwissModel (Disponível em https://swissmodel.expasy.org). **(A)** A rodopsina pode ser observada em azul atravessando a membrana celular dos discos membranosos do segmento externo dos fotorreceptores. A porção lipídica que compõe a membrana celular pode ser observada em cinza e as moléculas de água que compõem o meio podem ser visualizadas em vermelho e em branco. **(B)** Cada uma das sete regiões transmembranares da proteína, organizadas em α-hélice, podem ser observadas em diferentes cores. O retinal, representado em cinza e indicado pela seta preta, aparece na região próxima à sexta e sétima hélice.

1.2.1. Os Genes de Opsinas e sua Sensibilidade Espectral

A evolução dos genes de opsinas é marcada por eventos de duplicação e mutações que culminam no surgimento de classes distintas de pigmentos visuais. A presença de diferentes fotopigmentos em diferentes tipos de fotorreceptores, somados a um sistema pós-receptoral de processamento visual, responsável por comparar os diferentes sinais recebidos, possibilita a percepção de cores pelos animais (Bowmaker, 2008; Carleton *et al*., 2020). Análises de filogenia molecular, da composição de aminoácidos e da banda de absorção espectral destes pigmentos visuais, permitem classificá-los em cinco grupos: RH1, RH2 (do inglês, *Rhodopsin-like*), SWS (do inglês,

Short-Wave Sensitive) 1, SWS2 e LWS (do inglês, *Long-Wave Sensitive*) /MWS (do inglês, *Middle-Wave Sensitive*) (**Figura 5**) (Yokoyama, 1996, 2000; Yokoyama & Yokoyama, 1996; Ebrey & Takahashy, 2002).

Estimativas da taxa de divergência dos genes sugerem que os quatro genes de opsinas geralmente presentes em cones (*lws*, *sws1*, *sws2* e *rh*) sejam anteriores ao desenvolvimento da mandíbula, com seu aparecimento ocorrendo há cerca de 540 milhões de anos (M.a.), ao final do Éon Proterozoico, no período Pré-Cambriano (Collin *et al*., 2003), uma vez que análises realizadas em peixes primitivos não mandibulados, como lampreias e peixes-bruxa, mostraram a presença de genes funcionais das quatro classes de cones (Bailes *et al*., 2007). O aparecimento dos genes *rh1* e *rh2* ocorreu após um evento de duplicação do gene de opsina ancestral *rh*, processo que teria ocorrido após o desenvolvimento da mandíbula (Collin *et al*., 2003). Assim, cronologicamente, o gene *rh1* é mais recente e relacionado ao gene *rh2*, precedidos pelos genes *sws2*, *sws1* e *lws/mws*, dentre os quais este último é o mais antigo (**Figura 5**) (Collin *et al*., 2003; Yokoyama, 2000; Yokoyama & Yokoyama, 1996). A expressão destas cinco classes de pigmentos visuais difere entre as espécies de vertebrados. Enquanto aves e lagartos, por exemplo, expressam os cinco genes de opsinas nas retinas, em outros grupos, como mamíferos e serpentes, alguns destes genes foram perdidos ao longo de sua história evolutiva (Yokoyama, 2008; Davies *et al*., 2009).

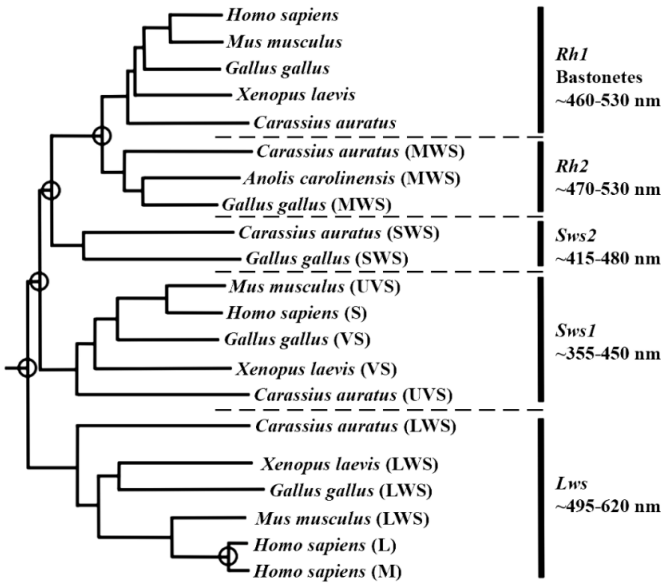


Figura 5 – Filogenia das cinco classes de opsinas em vertebrados. Na imagem, são mostrados representantes dos principais grupos de vertebrados. Os círculos indicam os eventos de duplicações gênicas, quatro ocorrendo anteriormente ao aparecimento da mandíbula nos vertebrados, cerca de 550 MA, e a duplicação do gene *Lws* ocorrendo há cerca de 35 MA. Nanômetro (nm).
Modificado de: "Evolution of vertebrate visual pigments" de J.K. Bowmaker, 2008, *Vision Research*, p. 2022-2041.

No segmento externo dos fotorreceptores clássicos estão presentes diferentes opsinas responsáveis pela absorção de fótons com comprimentos de onda distintos (Walls, 1942). O comorimento de onda máximo de sensibilidade espectral (λ_{max}) das opsinas é determinado pela interação entre o retinal e aminoácidos específicos da proteína (Sakmar & Fahmy, 1995). O gene *rh1*, geralmente expresso em bastonetes que possuem a rodopsina (RH1) como pigmento visual, apresenta seu λ_{max} variando entre 480 e 510 nanômetros (nm). Os demais grupos são geralmente expressos em cones e possuem λ_{max} variando entre 355 a 620 nm. O grupo RH2 apresenta absorção em comprimentos de onda médios, com valores de λ_{max} entre 470-530 nm. Por apresentarem um λ_{max} em regiões com comprimento de onda médio, diz-se que as opsinas do grupo RH2 são expressas em cones M (do inglês: *Middle*). As opsinas do grupo SWS1 são responsáveis pela absorção de comprimentos de onda curtos, com λ_{max} entre 355-445 nm, de modo que estão presentes em cones S (do inglês, *Short*), sensíveis a comprimentos de onda curto com sensibilidade que varia do ultravioleta (UV) ao violeta. O grupo SWS2 apresenta pigmentos capazes de absorver luz, novamente, com comprimentos de onda curtos, porém com valores de λ_{max} entre 400-470 nm, e são expressos em um segundo grupo de cones S. As opsinas do grupo LWS/MWS são, por sua vez, mais sensíveis a comprimentos de onda longos e médios, com valores de λ_{max} entre 500-620 nm, e estão presentes nos cones L ou M (do inglês: *Long* e *Middle*, respectivamente) (Yokoyama & Yokoyama, 1996; Yokoyama, 2000; Ebrey & Koutalos, 2001; Bowmaker, 2008; Davies *et al*., 2012).

Além dos pigmentos visuais, outras estruturas podem contribuir para a sensibilidade espectral do fotorreceptor, como as gotículas de óleo (Toomey & Corbo, 2017), estruturas capazes de alterar a sensibilidade espectral determinada pelo fotopigmento. As gotículas de óleo são estruturas localizadas no segmento interno dos cones, interpostas entre a luz incidente e a região de interação com fótons, nos segmentos externos (**Figura 6**) (Goldsmith *et al*., 1984). Estão presentes nas retinas de diversos grupos de vertebrados, como peixes, répteis, aves, mamíferos monotremados e marsupiais (Goldsmith *et al*. 1984; Walls & Judd, 1933). Essas estruturas atuam como filtros passa alta, capazes de bloquear a luz de menor comprimento de onda e consequentemente, alterar o λ_{max} correspondente à absorção espectral das opsinas do fotorreceptor de modo a aprimorar a discriminação e a constância de cores (Liebman & Granda, 1971; Vorobyev *et al*., 1998; Vorobyev, 2003). Deste modo, a banda de

absorção espectral destas células depende da filtragem espectral das gotículas de óleo e da sensibilidade espectral do fotopigmento presente em cada subtipo de cone (Toomey & Corbo, 2017).

Com tamanhos e colorações distintas, as gotículas de óleo são organelas compostas por uma mistura de diferentes carotenóides (Stavenga & Wilts, 2014), de modo que a composição de cada gotícula de óleo influencia diretamente na sua função de filtragem espectral (**Figura 6**) (Goldsmith *et al*., 1984; Toomey & Corbo, 2017). Em aves, os carotenóides predominantes nos cones L, M e S simples são as astaxantinas, zeaxantinas e galoxantinas, respectivamente (Toomey *et al*., 2015). Na gotícula de óleo presente no membro principal dos cones L duplos, verifica-se a predominância de uma mistura de galoxantina e dois hidroxicarotenóides (luteína e zeaxantina) (Toomey *et al*., 2015). Apocarotenoides, responsáveis pela absorção de comprimento de onda curto, estão presentes em todos os tipos de gotículas (Toomey *et al*., 2015). Assim, a presença de gotículas de óleo com diferentes composições de pigmentos influência de maneira significativa na sensibilidade espectral dos diferentes tipos de cones. Na tartaruga *T. s. elegans*, cada tipo de cone também possui um tipo específico de gotícula de óleo, com coloração variando dentre as diferentes famílias de cones a que estão associadas. Tais estruturas estão ausentes apenas nos bastonetes e no membro acessório de cones duplos (**Figura 6 A**) (Baylor & Fettiplace, 1975; Kolb & Jones, 1987).

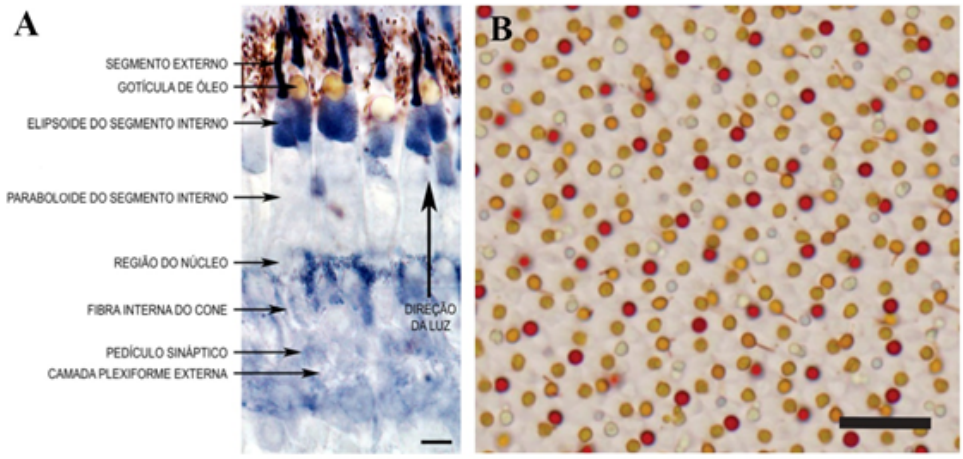


Figura 6 - **(A)** Corte radial da retina de *Trachemys scripta elegans* com reação imunohistoquímica para anticorpo anti-opsina (JH 492). O anticorpo utilizado foi inespecífico para as opsinas de *Trachemys sp.* Na figura podem ser observadas gotículas de óleo com coloração amarelada localizadas logo abaixo do segmento externo dos cones. Barra de escala = 10 µm.
Modificado de: "Densidade e topografia dos fotorreceptores da retina da tartaruga *Trachemys scripta elegans* com imunocitoquímica de opsinas" de S. R. Grötzner, 2005 (Tese). Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
(B) Imagem de campo claro de uma retina de galinha (*Gallus gallus*) em montagem plana onde pode-se observar as diferentes colorações das gotículas de óleo. Barra de escala = 10 µm.
Modificado de: "A complex carotenoid palette tunes avian color vision" de M.B. Toomey, A.M. Collins, R. Frederiksen, M.C. Cornwall, J.A. Timlin, J. C. Corbo, 2015, *Journal of the Royal Society Interface*.

1.2.1.1. O Deslocamento Espectral de Pigmentos Visuais

A clonagem de genes de opsinas bovinas e humanas marca o início das análises genéticas dos pigmentos visuais (Nathans *et al*., 1986; Nathans & Hogness, 1983, 1984). A partir destes clones tornou-se possível isolar outros genes ortólogos e parálogos, pertencentes a várias espécies (Yokoyama, 2002). Opsinas reconstruídas com o 11-cis-retinal em cultura de células permitiram medir *in vitro* a absorção espectral dos pigmentos visuais (Chinen *et al*., 2005b, 2005a). Com base nestes estudos, hipóteses evolutivas começaram a ser testadas por meio da reconstrução de pigmentos visuais a partir da técnica de mutação sítio-direcionada (*site-directed mutagenesis*). A aplicação de tal técnica permite incorporar determinados aminoácidos em posições específicas de opsinas existentes, de modo que se torna possível verificar como esses aminoácidos afetam a absorção espectral das opsinas e a visão de cores dos animais (Yokoyama, 2002). O uso de ensaios *in vitro* permite medir o efeito de uma única ou de múltiplas mutações sobre o deslocamento espectral de cada opsina (Yokoyama, 2002). Os resultados obtidos a partir destes ensaios estão de modo geral, de acordo com os dados de absorção espectral dos diferentes pigmentos visuais obtidos com base no uso de métodos fisiológicos e de microespectrofotometria (MSP) (Jacobs, 1993; Lythgoe, 1972; Yokoyama, 1997). Além disso, a reconstrução de opsinas a partir da substituição do cromóforo nativo por um isômero sintético do 11-cis-3,4-dehidroretinal permitiu investigar o deslocamento da banda de sensibilidade espectral causado pela utilização deste cromóforo (Wald *et al*., 1953; Parry & Bowmaker, 2000).

Assim, diferentes grupos de vertebrados apresentam fotorreceptores com sensibilidade espectral distinta, geralmente com valores de λ_{max} que refletem as características fóticas do ambiente ocupado (Walls, 1942; Yokoyama & Yokoyama, 1996; Jacobs & Rowe, 2004). Dentro de cada grupo de opsinas, o deslocamento espectral será determinado pela mudança de aminoácidos em posições específicas, definidos pela literatura como resíduos críticos (Yokoyama, 2000). O comprimento de onda máximo da opsina RH1, por exemplo, é mediado por aminoácidos presentes em 11 posições: 83, 98, 102, 122, 183, 253, 261, 289, 292, 299 e 317 (Hunt *et al*., 2001; Levenson *et al*., 2006; Yokoyama, 2000, 2008), numerados com base na sequência da rodopsina bovina (**Figura 7**). A combinação de aminoácidos específicos (**Tabela 1**), somado ao uso do cromóforo 11-cis-retinal, confere à rodopsina um λ_{max} entre 500 e 503 nm (**Tabela 1**). A ocorrência de eventuais mutações nestas posições pode levar a deslocamentos do λ_{max} em maior ou menor grau, como as mutações D83N, E122Q e

A292S, que isoladamente levam ao deslocamento hipsocrômico de 2, 19 e 10 nm, respectivamente (Yokoyama, 2000; Zhao *et al*., 2009).

Tabela 1 – Aminoácidos críticos para a absorção espectral da rodopsina (RH1) de vertebrados.

Espécie	Resíduos críticos											λmax	Ref
	83	**96**	**102**	**122**	**183**	**253**	**261**	**289**	**292**	**299**	**317**		
Bothrops atrox	D	Y	Y	E	M	M	F	T	A	A	M	500	[1]
Bos taurus	D	Y	Y	E	M	M	F	T	A	A	M	500	[2]
Danio rerio	D	Y	Y	E	M	M	F	T	A	A	M	500	[3]
Gallus gallus	D	Y	Y	E	M	M	F	T	A	A	M	503	[4]
Macaca fascicularis	D	Y	Y	E	M	M	F	T	A	A	M	500	[5]
Taenopygia guttata	D	Y	Y	E	M	M	F	T	A	A	M	501	[6]

Nota: [1] Katti e colaboradores (2018); [2] Collins & Morton (1950); [3] Schwanzara (1967); [4] Okano e colaboradores (1992); [5] Bowmaker e colaboradores (1980); [6] Yokoyama e colaboradores (2000).

Os mecanismos responsáveis pelo deslocamento espectral da opsina RH2, entretanto, aparentam ser mais complexos e de difícil entendimento. A literatura descreve sete resíduos associados na determinação do λ_{max} desta opsina: F49, L52, D83, M86, T97, Q122, A164 (Takenaka & Yokoyama, 2007; Zhao *et al*., 2009). Ainda que estes resíduos sejam conhecidos, o λ_{max} do pigmento RH2 ancestral ainda não foi determinado com exatidão. Experimentos realizados a partir da reconstrução do fotopigmento RH2 ancestral dos peixes *Carassius auratus* (peixe-dourado) e *Danio rerio* (peixe-zebra), indicam um λ_{max} em 506 nm (Chinen *et al*., 2005b). Se supusermos que nenhuma mutação tenha ocorrido nas posições de interesse antes deste ponto, o λ_{max} da opsina RH2 ancestral dos vertebrados poderia ser estimado em 506 nm (Takenaka & Yokoyama, 2007). Entretanto, Yokoyama e colaboradores (1999) descrevem as substituições E122Q e M207L como as responsáveis por influenciar na absorção espectral máxima da opsina RH2 de celacantos, e estimam o λ_{max} do RH2 ancestral em 499 nm. Ainda, supondo que a evolução do fotopigmento ocorreu em função das substituições S49F, E122Q e A164S, como sugerem Takenaka e Yokoyama (2007), a opsina ancestral apresentaria um λ_{max} em 511 nm, observados a partir da inserção das mutações inversas: F49S, Q122E e S164A (Takenaka & Yokoyama, 2007). Diante disso, a literatura sugere que o λ_{max} do fotopigmento RH2 ancestral varia entre ~490-511 nm.

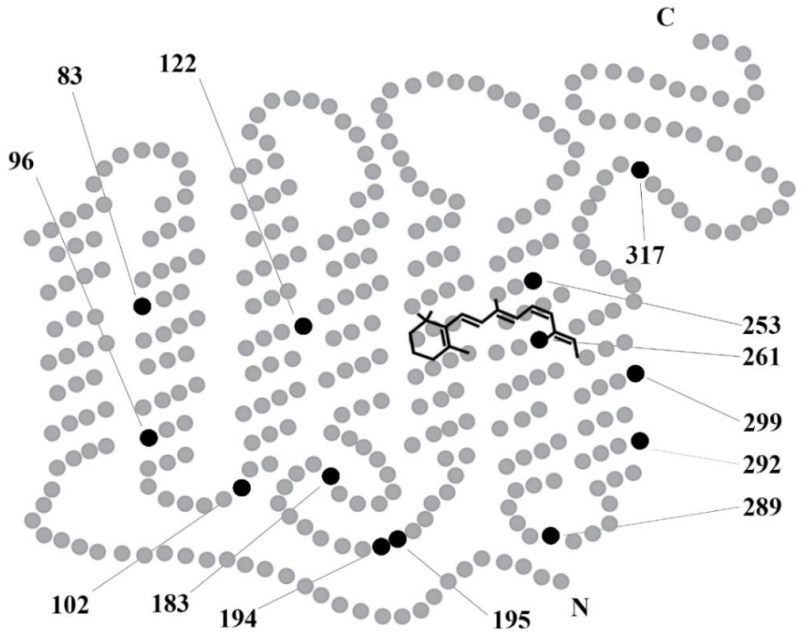


Figura 7 – Representação 2D da rodopsina RH1 bovina. O modelo é baseado em Palczewski e colaboradores (2000). Os círculos pretos indicam a posição dos aminoácidos envolvidos no deslocamento espectral da rodopsina. O cromóforo 11-cis-retinal está representado em preto (Yokoyama *et al*, 2008). Modificado de: "Evolution of dim-light and color vision pigments" de S. Yokoyama, 2008, *Annu. Rev. Genom. Human Genet.*, p. 259-282.

Os pigmentos visuais sensíveis a comprimentos de onda curtos são subdivididos em duas classes: SWS1, com λ_{max} variando de ~355 a 400 nm na faixa do UV, e ~400 a 430 na faixa do violeta (VS), e SWS2 com λ_{max} que variam de ~400 a 470 nm. As opsinas do grupo SWS1 apresentam mecanismos de deslocamento espectral particularmente distintos. De maneira geral, a literatura descreve 13 resíduos críticos responsáveis por interferir no deslocamento espectral da opina SWS1: 46, 49, 52, 86, 90, 91, 93, 97, 109, 113, 114, 116 e 118 (Yokoyama *et al*., 2006). Estudos realizados a partir da elaboração de mutantes quiméricos entre os fotopigmentos SWS1 de camundongos e humanos, com λ_{max} em 359 e 414 nm, respectivamente (Fasick *et al*., 1999; Yokoyama *et al*., 1998), mostraram a importância de tais resíduos. A partir da inserção das mutações F46T, F49L, T52F, F86L, T93P, A114G e S118T no fotopigmento UV de camundongo observou-se um deslocamento batocrômico[1] da banda de absorção para a região do VS com λ_{max} em 411 nm (Yokoyama *et al*., 1998). Por outro lado, as mutações reversas no fotopigmento humano ocasionaram um deslocamento hipsocrômico[2], para a região do UV com λ_{max} em 360 nm (Fasick *et al*.,

[1]Deslocamento batocrômico: Deslocamento da banda de absorção espectral para comprimentos de onda mais longos.
[2]Deslocamento hipsocrômico: Deslocamento da banda de absorção espectral para comprimentos de onda mais curtos.

1999). Entretanto, para a grande maioria dos vertebrados que expressam a opsina SWS1, o resíduo presente na posição 86 parece apresentar maior importância para a determinação da banda de absorção espectral do fotopigmento (Hunt *et al*., 2007). Em particular, a presença do aminoácido F86 deve ter importância ímpar na determinação do λ_{max} desta opsina em ~360 nm para diversos grupos de vertebrados (Cowing *et al*., 2002; Fasick *et al*., 2002), uma vez que ocasiona a desprotonação da base de Schiff entre o cromóforo e o resíduo Lisina na posição 296 (Cowing *et al*., 2002). Em aves, por outro lado, a mutação S90C parece ser responsável pelo ajuste espectral na região do VS (Wilkie *et al*., 2000; Yokoyama *et al*., 2000).

Tal disparidade observada entre os mecanismos de deslocamento espectral de diferentes grupos de vertebrados parece estar atrelada à origem evolutiva de cada opsina. Análises filogenéticas realizadas para a opsina SWS1 indicam que o fotopigmento ancestral era UV e que fotopigmentos do tipo VS evoluíram a partir de mutações em diferentes linhagens de vertebrados (Cowing *et al*., 2002). Em aves, entretanto, a sensibilidade ao UV foi readquirida a partir de mutações sofridas por um ancestral VS, levando ao surgimento de diferentes posições responsáveis pelo deslocamento espectral neste grupo de vertebrados (Wilkie *et al*., 2000; Yokoyama, 2000). Para o grupo SWS2, são descritos 21 resíduos responsáveis pelo deslocamento espectral da opsina: F46, I48, V49, F52, S91, T93, A94, M99, H100, T116, M122, T151, F159, A164, A166, T169, L207, T217, A269, S292 e V304 (Yokoyama & Tada, 2003; Davies *et al*., 2007; Yokoyama, 2008), responsáveis por conferir um λ_{max} de 440 nm (Yokoyama & Tada, 2003). Os fotopigmentos LWS de diversos grupos de vertebrados apresentam diferenças no λ_{max} de absorção espectral decorrentes de alterações em aminoácidos presentes em cinco resíduos, 164, 181, 261, 269 e 292 (Yokoyama, 2000). As mutações S164A, H181Y, Y261F, T269A e A292S nas opsinas LWS, deslocam o λ_{max} em cerca de 7, 28, 10, 16 e 18 nm, respectivamente (Yokoyama & Radlwimmer, 1999).

1.2.2. A Fotoisomerização do Cromóforo

A isomerização do cromóforo é ocasionada pela absorção de um fóton pelo retinal. Este processo provoca uma mudança na conformação espacial da molécula 11-cis-retinal ou 11-cis-3,4-dehidroretinal, passando da conformação *cis* para sua forma *all trans* (**Figura 8**) (Rodieck, 1998; Wald, 1968). Com isso, a opsina adquire sua forma ativada, o que desencadeia uma série de cascatas bioquímicas no fotorreceptor (Patel *et*

al., 2004). Reações enzimáticas ocorridas no interior da célula levam ao fechamento de canais de cátions na membrana, acarretando sua hiperpolarização. O processo influencia diretamente a taxa de liberação de neurotransmissores para células bipolares e horizontais da retina (Barnes & Kelly, 2002).

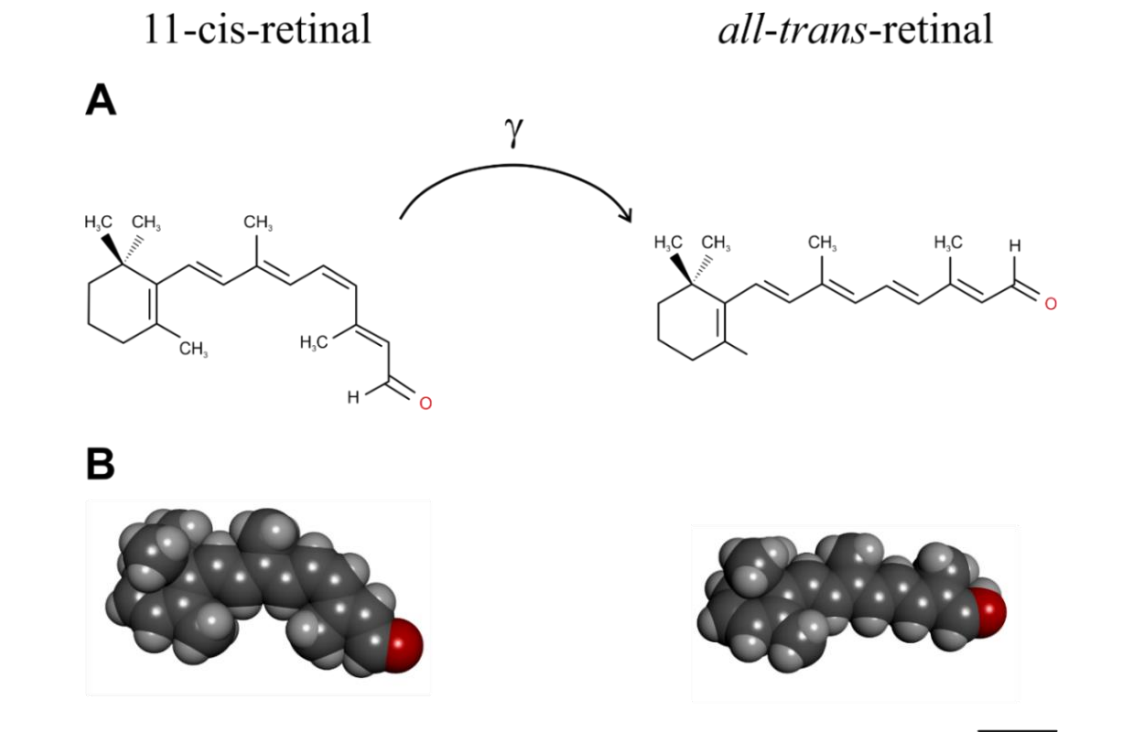


Figura 8 - Isoformas do retinal. **(A)** Molécula do retinal 11-cis-retinal antes (esquerda) e após (direita) a mudança conformacional sofrida em função da absorção de fótons de luz (γ). A fotoisomerização (representado pela seta) é um evento no sistema visual dependente da luz, a mudança conformacional sofrida pelo cromóforo dá origem ao processamento da informação visual na retina. **(B)** Isoformas do retinal antes (esquerda) e após (direita) a fotoisomerização em representação CPK (que indica as iniciais dos pesquisadores Corey, Pauling e Koltun responsáveis pelo desenvolvimento do modelo físico no qual foi inspirado esse tipo de representação). Barra de escala = 5 angströms (Å). A visualização das estruturas químicas dos cromóforos foi realizada por meio do *software* Discovery Studio Visualizer (Accelrys, San Diego, Califórnia, EUA).

Ainda que diferentes pigmentos visuais apresentem variações em sua resposta espectral máxima devido à substituições de aminoácidos em posições específicas da proteína, a utilização de diferentes classes de cromóforos pelos vertebrados também apresenta importância para a determinação dos valores de absorção espectral das opsinas (Reuter *et al*., 1971; Wald, 1938; Wald *et al*., 1953, 1958). Até o momento, apenas os isômeros 11-cis-retinal e 11-cis-3,4-dehidroretinal foram observados naturalmente nas retinas dos vertebrados (Hubbard & Wald, 1952). O cromóforo está ligado covalentemente a um resíduo lisina no posição 296 (K296) altamente conservado nas opsinas, via base de Schiff protonada, na sétima hélice transmembranar (**Figura 9**) (Wald, 1935, 1955, 1968).

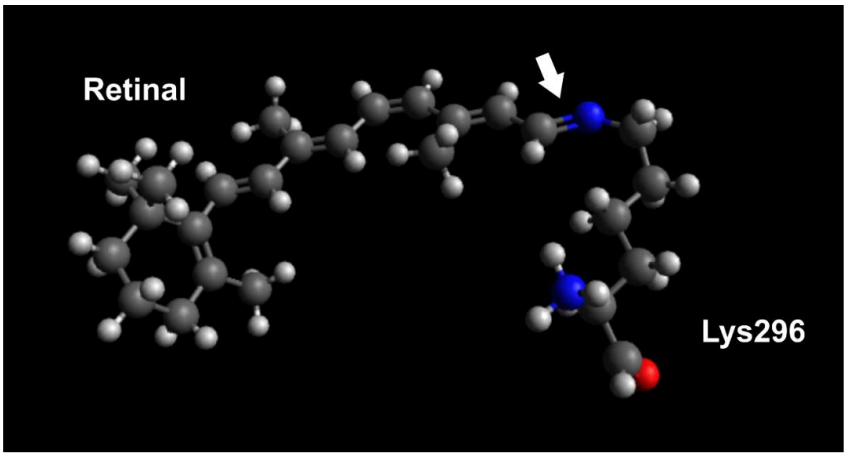


Figura 9 - Molécula de 11-cis-retinal ligada covalentemente ao resíduo lisina na posição 296 (Lys296) da sétima hélice transmembranar da rodopsina bovina. A seta indica a ligação dupla que forma a base de Schiff responsável por manter o cromóforo unido à lisina. As esferas cinzas representam átomos de carbono; As esferas azuis representam átomos de nitrogênio; As esferas brancas representam átomos de hidrogênio; A esfera vermelha representa um átomo de oxigênio. A visualização das estruturas foi realizada com o auxílio do *software* Avogadro v.1.90.0.

Supõe-se que ambas as classes de cromóforos apresentem diferentes valores de λ_{max}. A partir de análises do espectro de absorção da molécula 11-cis-retinal em solução de etanol, seu λ_{max} foi medido em 440 nm (Kito *et al*., 1968). Contudo, o λ_{max} da molécula 11-cis-3,4-dehidroretinal não apresenta descrição experimental até o momento. Entretanto, sabe-se que, a interação destes dois cromóforos com aminoácidos das opsinas ocasiona o deslocamento de sua faixa de absorção que pode variar entre 350 e 560 nm, no caso do 11-cis-retinal (Yokoyama, 2008), atingindo até 620 nm, no caso do 11-cis-3,4-dehidroretinal (Wald, 1938, 1939). A interação direta ou indireta do cromóforo com aminoácidos localizados em posições específicas da opsina leva a alterações do $\lambda_{max.}$ do pigmento visual. Desta forma, diferentes estruturas das opsinas resultam em diferentes valores de λ_{max} do fotopigmento (Sakmar & Fahmy, 1995).

1.2.3. Rodopsinas e Porfiropsinas: Contrastes e Similaridades

Desde os estudos realizados por Ewald e Kühne (1878) os pigmentos visuais são reconhecidos como proteínas associadas a uma molécula fotossensível, ainda que a constatação da importância apresentada pelo grupo prostético tenha ocorrido anos mais tarde (Hubbard & Wald, 1952). Aos pigmentos visuais capazes de utilizar o 11-cis-retinal como grupo prostético, dá-se o nome de rodopsina (Bridges, 1972). Por outro lado, as porfiropsinas caracterizam-se como pigmentos visuais baseados na utilização do 11-cis-3,4-dehidroretinal (Wald, 1938, 1939). As estruturas de ambos os cromóforos

podem ser observadas na **Figura 10**. Tal como a rodopsina, a porfiropsina consiste em uma opsina combinada a um cis estereoisômero como grupo prostético capaz de sofrer isomerização para a forma all-trans quando o cromóforo interage com a luz (Bridges, 1972).

Embora apresentem certa semelhança no que se refere à sua conformação espacial, a associação do pigmento visual com um ou outro cromóforo tende a apresentar um grande impacto no comprimento de onda máximo do pigmento visual. Espectroscopicamente, a substituição do cromóforo 11-cis-retinal pelo isômero 11-cis-3,4-dehidroretinal é sempre acompanhada pelo deslocamento batocrômico do λmax (Bridges, 1972). Experimentos realizados a partir da incubação da rodopsina bovina com o 3,4-dehidroretinal, por exemplo, resultaram na sintetização de uma porfiropsina com absorção máxima em ~517 nm, apresentando um deslocamento batocrômico de ~17 nm em relação a rodopsina bovina (Wald et al., 1958). Resultado semelhante foi obtido após a associação de opsina L de galinha, com λ_{max} em 560 nm, com o cromóforo 11-cis-3,4-dehidroretinal. O fotopigmento foi sintetizado em solução a partir da adição do cromóforo 11-cis-3,4-dehidroretinal em um extrato contendo cones e bastonetes de Gallus gallus, gerando espectro de absorção da solução medido no escuro com valores de λmax em ~620 nm (Wald et al., 1953). O espectro de absorção típico observado para o sistema rodopsina-porfiropsina é ilustrado na **Figura 10**.

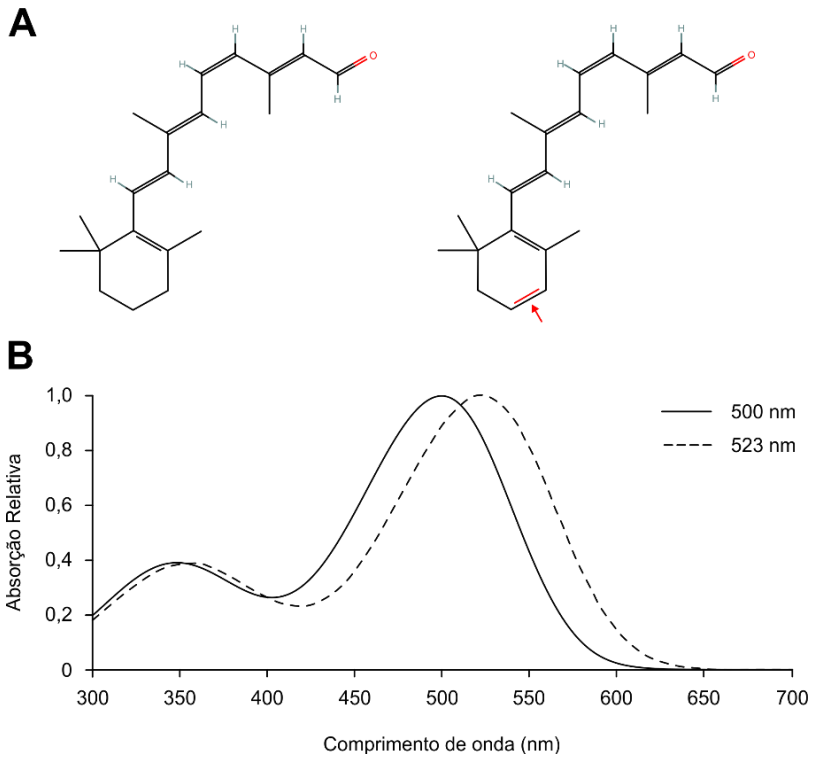


Figura 10 - (A) Estrutura química de ambas as classes de cromóforos, na conformação *all-trans* encontradas nos fotopigmentos de vertebrados. À esquerda observa-se a estrutura do retinal. À direita

observa-se a estrutura do dehidroretinal. A seta em vermelho indica a ligação dupla existente entre os carbonos 3 e 4 da molécula, característica do dehidroretinal. Em ambas as estruturas se encontra demarcada a contagem dos carbonos que as compõe. **(B)** Curvas de absorção espectral da rodopsina (λ_{max} = 500 nm; à esquerda) comparada ao seu correspondente porfiropsina (λ_{max} = 523 nm; à direita).
Modificado de: "Spectroscopic proprierties of porphyropsins" de C.D.B. Bridges, 1967, *Vision Research*, p. 349 – 369.

1.2.3.1. Utilização das Vitaminas A_1 e A_2 por Vertebrados

A variedade fótica dos diferentes habitats implica em desafios fundamentais para o sistema visual, resultando em uma característica plasticidade em diferentes aspectos deste sistema. Ambientes aquáticos, especialmente de água doce como lagos, córregos ou rios, podem apresentar uma composição espectral específica, devido à presença de matéria orgânica dissolvida, causando a dispersão ou absorção de determinados comprimentos de onda que resultam, geralmente, em maior quantidade de luz com comprimentos de onda mais longos (**Figura 11**) (Clarke, 1939; Jerlow, 1976; Johnsen, 2014; Jokela-Määttä et al., 2007). Uma estratégia utilizada por diversos organismos para otimizar a captação de fótons disponíveis no ambiente ocupado é o ajuste da sensibilidade espectral de seus fotorreceptores com o espectro de luz disponível (Cheng & Flamarique, 2004; Temple et al., 2008).

Os mecanismos de ajuste espectral podem, por exemplo, se basear na mudança dos padrões de expressão de diferentes opsinas na retina, ao longo da vida, ou ainda na substituição do uso de uma classe de cromóforo por outra, dependendo do estágio de desenvolvimento e das condições ambientais (Hauser & Chang, 2017). Peixes, por exemplo, expressam uma grande variedade de pigmentos visuais o que pode estar associado com a pressão evolutiva correspondente à exposição destes indivíduos à distribuição luminosa de diferentes habitats aquáticos (Granda & Dvorak, 1977). Assim, peixes que habitam regiões de água doce possuem pigmentos visuais com banda de absorção ajustada para comprimentos de onda mais deslocados para a região do vermelho no espectro. Peixes marinhos que ocupam ambientes de grandes profundidades, onde a radiação solar disponível corresponde a uma faixa estreita de comprimentos de onda centrados em ~480 nm (**Figura 11**) (Clarke, 1939; Johnsen, 2014), tendem a apresentar pigmentos visuais com absorção máxima nesta região (λmax = 477 a 490 nm) (Douglas et al., 1998). Assim, vertebrados terrestres e marinhos tendem a apresentar seus sistemas visuais baseados na utilização do retinal (vitamina A1) como cromóforo. De maneira análoga, o 3,4-dehidroretinal deverá estar presente principalmente em espécies que ocupam ambientes de água doce (Bridges, 1972), cuja

presença ocorre em profundidades bem menores. Importante ressaltar que a proporção de vitamina A1 e A2 na retina desses vertebrados irá apresentar grande variação, com alguns vertebrados apresentando o uso prioritário de uma ou outra classe de cromóforo em diferentes períodos do desenvolvimento (Wald, 1957; Wilt, 1959; Beatty, 1966; Liebman & Entine, 1968; Bridges, 1972; Bowmaker, 1995; Enright et al., 2015).

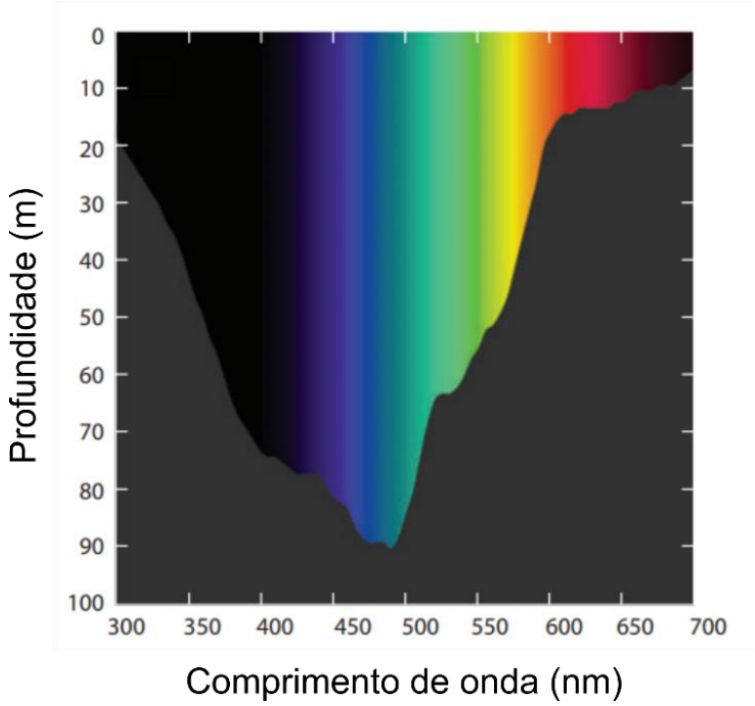


Figura 11 - Transmissividade espectral da luz em corpos d'água de diferentes profundidades. Nota-se que até cerca de 10 metros de profundidade há predominância de luz entre ~500 e 620 nm. Até cerca de 50 m, observa-se a atenuação majoritária da luz violeta e a verde. A luz azul-esverdeada com comprimento de onda centrado em 480 nm é a menos atenuada, atingindo 1% de seu valor de superfície a aproximadamente 100 m.
Modificado de: "Hide and seek in the open sea: pelagic camouflage and visual countermeasures" de S. Johnsen (2014), Annual Review of Marine Science, 6(1), 369–392.

A conversão do retinal para o dehidroretinal parece estar atrelada à expressão do gene do citocromo cyp27c1, membro da família P450 (Allison et al., 2004). Experimentos realizados em indivíduos da espécie Danio rerio (peixe-zebra) demonstraram esta relação. Com predominância na utilização da vitamina A1 como base para o seu sistema visual, indivíduos de Danio rerio tratados com o hormônio da tireoide (HT) apresentaram uma conversão quase completa da vitamina A1 para a vitamina A2, analisada no segmento externo dos fotorreceptores e no epitélio pigmentar (**Figura 12**) (Allison et al., 2004; Enright et al., 2015).

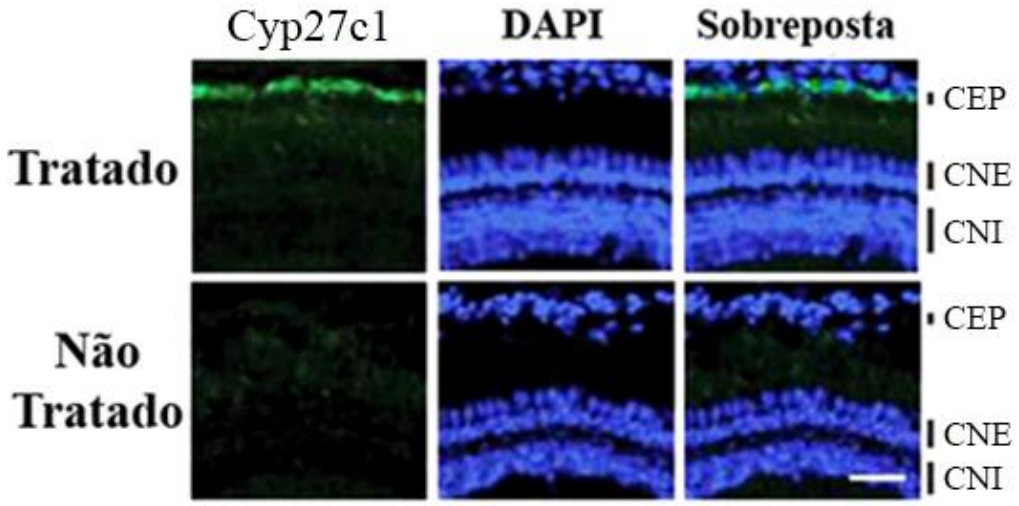


Figura 12 – Imunohistoquímica para identificação da expressão do citocromo Cyp27c1 realizada em cortes transversais da retina de Danio rerio tratado e não tratado com Hormônio da Tireoide (HT). Em verde, é revelada a presença do citocromo na camada do Epitélio Pigmentado (CEP) em indivíduos tratados. Em azul, observa-se a marcação com DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) dos núcleos celulares na Camada do Epitélio Pigmentar (CEP), Camada Nuclear Externa (CNE) e Camada Nuclear Interna (CNI). Barra de escala = 50 μm.
Modificado de: "Cyp27c1 red-shifts the spectral sensitivity of photoreceptors by converting vitamin A1 into A2" de J.M Enright, M.B. Toomey, S. Sato, V.J. Kefalov, F.P. Guengerich e J.C. Corbo, 2015, Current Biology, p. 3048 – 3057.

Estudos recentes indicam que o hormônio tireoidiano endógeno (HT) pode apresentar grande importância na coordenação de mudanças fisiológicas associadas à alteração do cromóforo utilizado pelos fotorreceptores, atuando na substituição da vitamina A_1 para a vitamina A_2 (Beatty, 1969; Temple *et al*., 2008). O aumento da expressão do gene *cyp27c1* induzido pelo HT pode indicar o papel deste hormônio na regulação da capacidade de resposta à luz com comprimento de onda longo em condições naturais (Enright *et al*., 2015). Em peixes salmonídeos, por exemplo, supõe-se que o HT seja responsável por coordenar ocorridas durante sua migração, mediando a troca entre fotopigmentos baseados na vitamina A_1 por aqueles baseados na vitamina A_2 (Beatty, 1969; Temple *et al*., 2008). Além disso, nestes animais, observou-se que a expressão de genes paralelos de opsinas verdes e vermelhas (comprimentos de onda médios e longos) está associada à presença do HT, uma vez que sua presença induz uma mudança na expressão destas opsinas a favor daquelas que apresentam maior desvio para o vermelho (Temple *et al*., 2008). Tais achados sugerem, portanto, que a sinalização promovida por este hormônio pode representar um mecanismo de regulação da sensibilidade à luz de comprimentos de onda mais longos, influenciando tanto na substituição do cromóforo, por meio da *cyp27c1*, quanto na regulação da expressão de genes de determinadas opsinas (Beatty, 1969; Temple *et al*., 2008).

1.3. A Retina da Tartaruga *Trachemys scripta elegans*

A ordem Testudinata compreende cerca de 360 espécies de tartarugas, distribuídas em 14 famílias (Uetz and Hošek, 2020). Espécies de testudíneos estão presentes nos mais diversos ambientes, distribuídas em todos os continentes, com exceção da Antártida (Ernst & Barbour, 1989). Além da ampla distribuição geográfica, as tartarugas podem ser encontradas em uma grande variedade de habitats, desde ambientes terrestres (por exemplo, família Testudinidae), de água doce (por exemplo, as famílias Emydidae, Chelydridae e Dermatemydae) e ambientes marinhos (famílias Cheloniidae e Dermochelidae) (Ernst & Barbour, 1989). Alguns aspectos ecológicos, como por exemplo, as características fóticas específicas do ambiente ocupado pelas diferentes espécies, podem exercer pressão seletiva sobre o sistema visual levando a modulação da sensibilidade espectral dos pigmentos visuais e promovendo diversidade na morfologia da retina das espécies de tartarugas (Walls, 1942).

A tartaruga-de-orelha-vermelha, *Trachemys scripta elegans* (**Figura 13 A**) é um modelo consolidado para o estudo da neurociência visual de vertebrados. Nativa do Vale do Mississipi, a espécie é endêmica do sul dos Estados Unidos e norte do México (Wied-Neuwied, 1839). Morfologicamente, pode ser identificada pela presença de uma faixa avermelhada em ambos os lados da cabeça (**Figura 13 B**). A espécie, pertencente à família Emydidae (Seidel & Smith, 1986), possui carapaça oval e moderadamente curva, especialmente em fêmeas. Tendem a apresentar porte médio/grande com comprimento variando de 20 a 60 centímetros na fase adulta. A abertura das narinas e o arco zigomático, conjunto de ossos temporais, são relativamente estreitos e as órbitas oculares localizam-se ântero-lateralmente (Ernst, 1990). A tartaruga-de-orelha-vermelha é diurna e possui hábito semiaquático, geralmente habitando locais com vegetação aquática abundante. São animais onívoros oportunistas, ou seja, se alimentam de uma grande variedade de invertebrados e vertebrados, como girinos, pequenos peixes e anfíbios, e também vegetações diversas incluindo algas, folhas, caules, frutos e sementes de plantas vasculares (Parmenter & Avery, 1990). Embora apresentem uma dieta muito diversificada, seu padrão alimentar varia sazonalmente. Em períodos mais quentes indivíduos de *T. s. elegans* possuem uma alimentação rica em presas animais, ao passo que, na época do inverno, adotam uma dieta à base de vegetação aquática. (Parmenter & Avery, 1990). Tais variações parecem estar atreladas a uma diminuição do comportamento de forrageamento ou do apetite em climas mais frios, além de uma maior escassez de presas (Cagle & Chaney, 1950; Ernst, 1972).

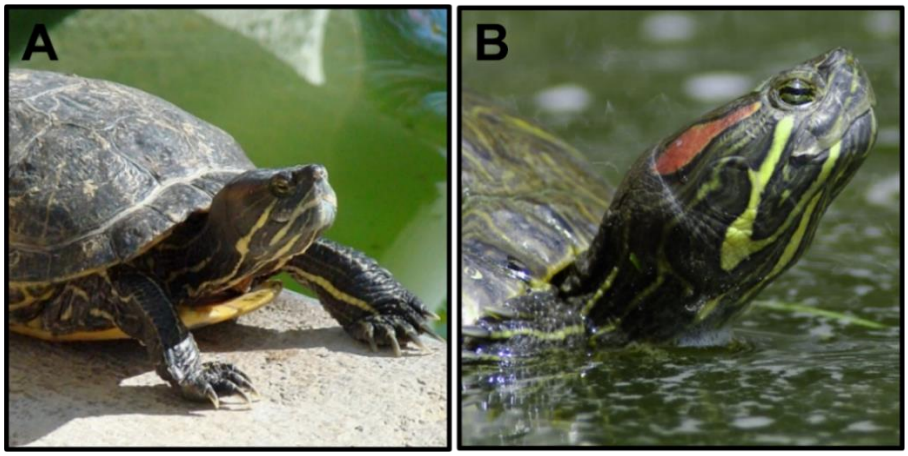


Figura 13 - (A) Indivíduo de *Trachemys scripta elegans.* **(B)** Detalhe apresentando a faixa vermelha característica, presente em ambos os lados da cabeça nos indivíduos desta espécie.
Modificado de: "Naturdata: Biodiversidade online" de Machado, 2011. Disponível em: https://naturdata.com.

Indivíduos desta espécie geralmente apresentam comportamento de forrageamento durante o dia, em regiões de águas rasas (de 1 a 3 metros de profundidade), dedicando de 6 a 11 horas por dia a tais atividades (Moll & Legler, 1971). Durante o forrageamento reviram aglomerados de vegetação aquática na busca por invertebrados. Animais jovens são facilmente atraídos pelos movimentos de pequenos peixes, girinos e sapos (Parmenter & Avery, 1990). Diante disto, não há dúvida de que o sistema visual tem grande importância para a manutenção destes e de outros comportamentos da espécie (Parmenter & Avery, 1990). Esta importância pode se refletir em diferentes adaptações moleculares das proteínas envolvidas no processamento da informação visual para formação de imagem e na funcionalidade das estruturas visuais desta tartaruga de água doce.

1.3.1. Distribuição de Células da Camada de Células Ganglionares e a Resolução espacial

Com base em estudos realizados a partir do método de Golgi de impregnação com prata, foram identificados 24 tipos morfologicamente distintos de células ganglionares na retina da tartaruga *T. s. elegans* (Kolb, 1982). Os diferentes subtipos de células ganglionares são classificados em função do tamanho do seu corpo celular, tamanho do campo dendrítico e padrões de estratificação (Kolb, 1982). A distribuição das células da Camada de Células Ganglionares (CCG) na retina de *T. s. elegans*, foi avaliada por Peterson & Ulinski (1979) que descreveram um padrão de distribuição em faixa visual horizontal com um pico médio de densidade de ~20.000 células/mm^2.

Referente à distribuição topográfica das células CCG da retina, a faixa visual caracteriza-se por apresentar uma nítida demarcação periférica dorsal ao longo de toda a sua extensão naso-temporal (**Figura 14 A**) (Peterson & Ulinski, 1979). Tal padrão de especialização retiniano justifica-se no uso do habitat por estes animais (Brown, 1969; Granda & Haden, 1970), uma vez que a faixa visual estabilizada horizontalmente por reflexos da cabeça e dos olhos (**Figura 14 B e C**) parece representar uma especialização extremamente funcional para um animal que obtém grande parte de suas informações visuais da linha do horizonte (Brown, 1969).

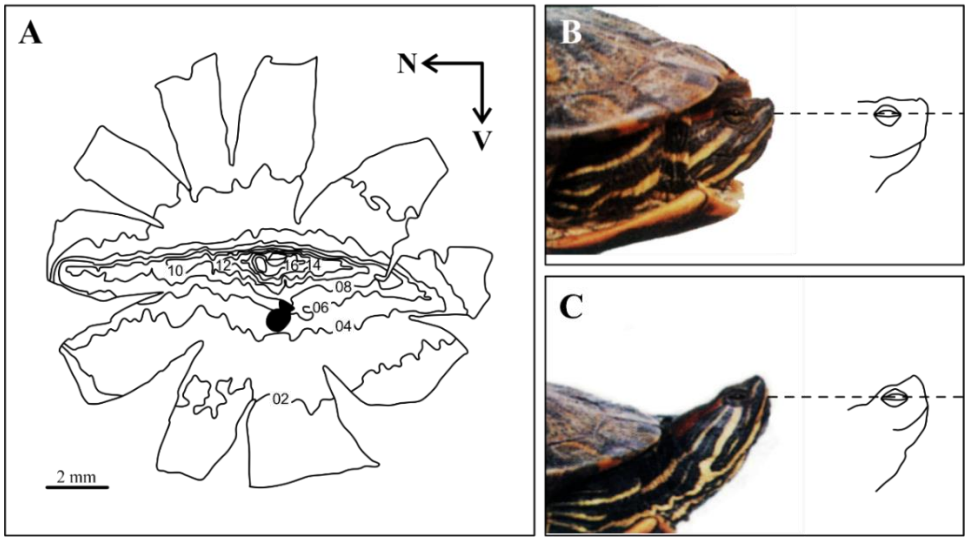


Figura 14 - **(A)** Mapa de isodensidade apresentando a distribuição de células da CCG de retina de *T. s. elegans*, com faixa visual ao longo do eixo meridional da retina. Densidade $x10^3$ células/mm^2. O círculo preto indica a posição do nervo óptico. N: nasal; V: ventral.
Modificado de: "The morphology of the bipolar cells, amagrine cells and ganglion cells in the retina of the turtle *Pseudemys scripta elegans*" de H. Kolb, 1982, *Phil. Trans. R. Soc. Land*, p. 355 – 393.
(B) e **(C)** Detalhe indicando o ajuste automático da fenda pupilar ao horizonte (linha tracejada). Ao ser inclinado para a esquerda ou direita, e para trás (B) ou para frente (C), o animal automaticamente volta sua cabeça e seus olhos para a posição oposta, de forma que a estria visual sempre é posicionada paralelamente à linha do horizonte (linha tracejada).
Modificado de: "A linear area centralis extending across the turtle retina and stabilized to the horizon by non-visual cues" de K.T. Brown, 1969, *Vision Research*, p. 1053 – 1062.

De fato, como um animal semiaquático, a tartaruga-de-orelha-vermelha apresenta hábitos alimentares de fundo e de superfície, com a lâmina d'água caracterizando-se como seu horizonte (Brown, 1969; Granda & Haden, 1970; Parmenter & Avery, 1990). Entretanto, embora já tenha sido determinado o padrão de especialização da retina e o pico de densidade celular, não há trabalhos na literatura responsáveis por avaliar a acuidade visual da espécie a partir de medidas anatômicas. Para a espécie, até o momento, a acuidade visual foi avaliada por meio de potenciais

evocados visuais (PVE), estabelecendo valores de acuidade visual que variam de 4,4 até 9,9 ciclos/grau (Northmore & Granda, 1991).

1.3.2. Diversidade e Densidade de Fotorreceptores

A tartaruga *T. s. elegans* apresenta retina duplex, com cones e bastonetes, como observado na maioria dos vertebrados (Kolb & Jones, 1982, 1987; Goede & Kolb, 1994; Grötzner, 2005), apresentando seus pigmentos visuais baseados na utilização da vitamina A_2, o que desloca o λ_{max} de suas opsinas em direção a comprimentos de onda mais longos (Wald, 1939). Sua retina apresenta predominância de cones, com bastonetes representando menos de 10% da população total de fotorreceptores (Grötzner *et al*., 2020). A população total de cones é dividida em seis tipos morfológicos: cinco classes de cones simples e uma classe de cone duplo (Kolb & Jones, 1982, 1987; Goede & Kolb, 1994). Os cones duplos são caracterizados pela presença de um membro principal e um membro acessório (Walls, 1942). Em *T. s.* elegans, o membro acessório é menor com relação ao membro principal (Kolb & Jones, 1982). Os cones simples, além de serem predominantes na retina das tartarugas, possuem sua morfologia geral semelhante ao membro principal dos cones duplos (Granda & Dvorak, 1977; Goede & Kolb, 1994). Cones simples e o membro principal de cones duplos possuem gotículas de óleo, localizadas na porção superior do segmento interno, estruturas ausentes nos bastonetes e no membro acessório de cones duplos (**Figura 15**) (Kolb & Jones, 1987).

Além dos cones L duplos e dos bastonetes, a retina de *T. s. elegans* apresenta outras cinco classes de cones simples com três subtipos de cones grandes: duas classes de cones L, diferentes apenas no que se refere às suas gotículas de óleo, os cones M, e dois subtipos de cones pequenos, cones S e cones UV (**Figura 16**) (Kolb & Jones, 1987). Suas gotículas de óleo apresentam diferentes colorações que variam desde o vermelho até o amarelo claro e o transparente (Granda & Dvorak, 1977). Cada uma das classes de cones apresenta uma gotícula de óleo particular, são transparentes nos cones UV e S, apresentando, apenas nestes últimos, fluorescência à luz de 488 nm e amareladas nos cones M. No caso dos cones L simples, uma de suas classes apresenta gotícula vermelha, ao passo que a outra apresenta gotícula laranja. Os cones L duplos, por sua vez, apresentam gotícula laranja apenas no membro principal (**Figura 16**) (Baylor & Fettiplace, 1975; Kolb & Jones, 1987).

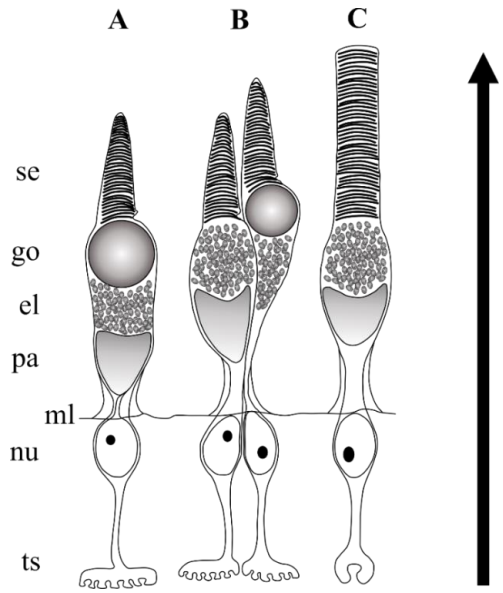


Figura 15 - Representação de corte transversal dos fotorreceptores da tartaruga *Trachemys scripta elegans.* **(A)** Cone simples, **(B)** Cone duplo e **(C)** Bastonete. Pode-se observar as seguintes estruturas: (se) Segmento externo; (go) Gotícula de óleo; (el) Elipsoide; (pa) Paraboloide; (ml) Membrana limitante; (nu) Núcleo; (ts) Terminal sináptico. A seta localizada a direita indica o sentido da passagem da luz pela retina.
Modificado de: "Conquering the cold shudder: the origins and evolution of snakes eyes" de C.L. Caprette, 2005 (Tese), The Ohio State University, Ohio, EUA.

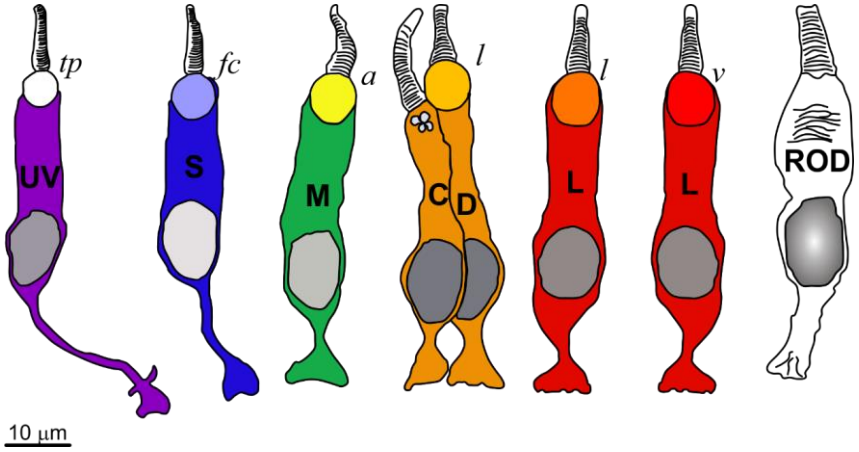


Figura 16 – Representação esquemática de corte transversal de fotorreceptores da tartaruga *T. s. elegans* ilustrando a diversidade morfológica destas células na retina da espécie. Da esquerda para a direita pode-se listar: cones UV, com gotícula transparente (*tp*); os cones S, com gotícula transparente e fluorescente (*fc*); os cones M, com gotícula amarela (*a*); os cones L duplos, com gotícula laranja (*l*); os cones L simples, com gotícula laranja (*l*) e com gotícula vermelha (*v*); os bastonetes, sem gotícula.
Modificado de: "Identification of the synaptic pedicles belonging to the different spectral types of photoreceptor in the turtle retina" de P. Goede e H. Holb, 1994, *Vision Research*, p. 2801 – 2811.

A distribuição topográfica de cada classe de fotorreceptor em *T. s. elegans* apresenta variação nas diferentes regiões da retina, demonstrando um padrão de especialização em faixa visual (**Figura 17**). Segundo Grötzner e colaboradores (2020), a densidade média de fotorreceptores é de 12.557 células/mm^2, apresentando uma variação de 5.309 a 41.908 células/mm^2 (estimados da periferia da região dorsal até o

ponto de maior densidade na faixa visual). A população de bastonetes representa cerca de 8,9% de toda a população de fotorreceptores, com densidade média de 845,3 células/mm^2 (**Figura 17**). No que se refere aos cones, a densidade média observada para a população de cones duplos foi de 2.710 células/mm^2, correspondendo a cerca de 23% da população total de fotorreceptores (**Figura 17**). Para os cones simples L, M, S e UV a densidade média foi estimada em 3.853, 4.223, 3.585 e 722 células/mm^2, respectivamente (**Figura 17**) (Grötzner *et al*., 2020).

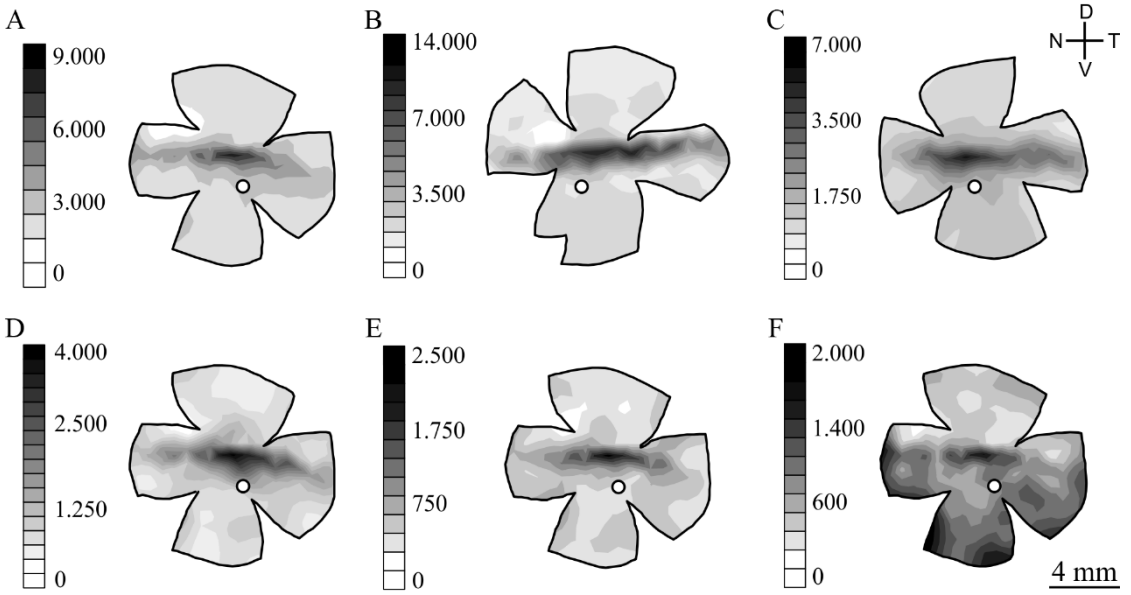


Figura 17 – Mapas de isodensidade de fotorreceptores da retina da tartaruga *T. s. elegans* apresentando, em escala de cinza, os valores de densidade para **(A)** cones duplos, **(B)** cones L, **(C)** cones M, **(D)** cones S, **(E)** cones UV e **(F)** bastonetes. A escala à direita dos mapas indica os valores de densidade para as diferentes tonalidades de cinza. Em todos os mapas, com exceção dos bastonetes, pode-se observar como padrão, a especialização da retina em faixa visual. Os bastonetes apresentaram um padrão de distribuição assimétrico ao longo do eixo dorso-ventral, com maior densidade nas regiões próximas ao nervo óptico e na periferia ventral. Os discos brancos representam a posição do nervo óptico. D = dorsal; V = ventral; N = nasal; T = temporal.
Modificado de: "Distribution of rods and cones in the red-eared turtle retina (*Trachemys scripta elegans*)" de S.R. Grötzner, F.A.F. Rocha, V.H. Corredor, A.M.P. Liber, D.E. Hamassaki, D.M.O. Bonci e D. F. Ventura, 2020, *The Journal of Comparative Neurology*, p. 1 – 13.

1.3.3. Sensibilidade Espectral

Os valores de sensibilidade espectral das opsinas da tartaruga *T. s. elegans* foram experimentalmente definidos por diferentes autores. Liebman & Granda (1971) determinaram com microespectrofotometria (MSP) as curvas de absorbância espectral dos fotopigmentos da tartaruga de água-doce *T. s. elegans* e da tartaruga marinha *Chelonia mydas mydas*. Os autores determinaram a sensibilidade espectral medida no segmento externo de três classes de cones simples, S, M e L, e do bastonete, em 450, 520, 620 e 520 nm, respectivamente, para *T. s. elegans* (**Figura 18**; **Tabela 2**) (Liebman

& Granda, 1971), para *C. m. mydas*, a sensibilidade espectral medida foi de 440, 502, 562 e 502 nm, respectivamente (**Figura 18**) (Liebman & Granda, 1971). Como observado, os valores de sensibilidade espectral medidos em *T. s. elegans* foram, em todos os casos, deslocados para comprimentos de onda mais longos que aqueles observados nos fotopigmentos de *C. mydas*. Esta variação na sensibilidade dos pigmentos visuais entre ambas as espécies de tartarugas, caracterizada por um deslocamento batocrômico da banda de absorção dos fotopigmentos de *T. s. elegans*, se dá pela utilização da vitamina A_2 (Wald, 1938, 1939).

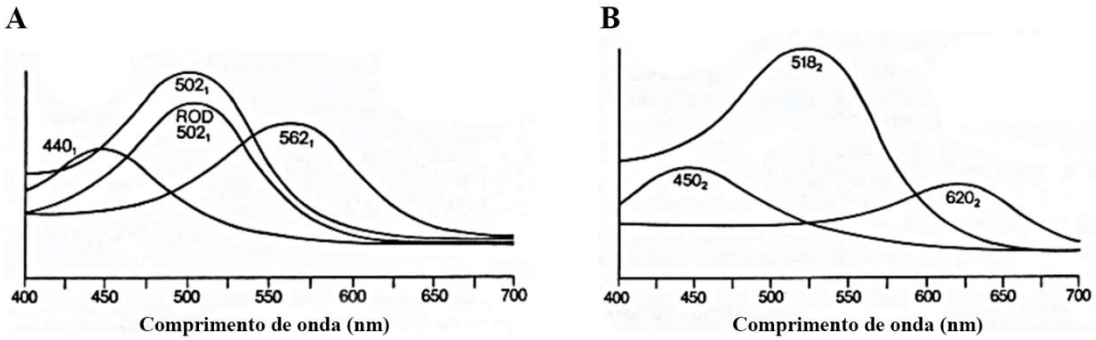


Figura 18 - Curvas de absorção espectral obtidas por meio de microespectrofotometria para duas espécies de tartarugas. **(A)** λ_{max} de absorbância espectral, medidos nos segmentos externos de cones de *Chelonia mydas mydas*, em 440 nm (cones S), 502 nm (cones M), 562 nm (cones L) e bastonetes com λ_{max} em 502 nm. **(B)** λ_{max} de absorbância espectral, medidos nos segmentos externos de cones de *Trachemys scripta elegans*, em 450 nm (cones S), 518 nm (cones M) e 620 nm (cones L).
Modificado de: "Vision in Turtles" de A.M. Granda e C.A. Dvorak,1977, In: Crescitelli F, editor. The Visual System in Vertebrates. Handbook of Sensory Physiology. Springer Berlin Heidelberg.

Valores de absorção espectral para os fotopigmentos UV de *T. s. elegans* foram descritos três décadas mais tarde, por intermédio de duas técnicas distintas. Por meio de medidas realizadas por MSP, Loew & Govardovskii (2001) determinaram o λ_{max} do fotopigmento UV em 372 nm. O mesmo valor foi encontrado por meio de registro eletrofisiológico por Ventura e colaboradores (2001) e Zana e colaboradores (2001). Além do fotopigmento UV, Loew & Govardovskii (2001) determinaram também os valores de λ_{max} para todas as outras classes de cones e para o bastonete (**Tabela 2**).

Dados obtidos com registro intracelular (RI) por Yazulla (1976) identificaram valores de 550 e 630 nm para os cones M e L simples, respectivamente. A diferença observada entre os valores apresentados por Yazulla (1976) e os valores medidos por Loew & Govardovskii (2001) deve estar relacionada com a atuação das gotículas de óleo que, devido à sua composição, tendem a absorver comprimentos de ondas mais curtos (Toomey *et al*., 2015). Esta condição resulta no deslocamento batocrômico da banda de absorção espectral dos fotopigmentos destes cones (Yazulla, 1976).

Estudos comportamentais realizados por Neumeyer e colaboradores (1985) comprovaram a funcionalidade do sistema visual cromático da espécie, revelando a capacidade de discriminação de comprimentos de onda em tartarugas treinadas para discriminar entre dois discos coloridos (Neumeyer & Jäger, 1985; Arnold & Neumeyer, 1987). O grupo também identificou a presença de λ_{max} em 450 nm, 570 ou 540 nm e 640 nm, resultado conjunto da curva de absorção espectral dos fotopigmentos em 450, 518 e 620 nm, e da filtragem cromática exercida pelas gotículas de óleo (Neumeyer & Jäger, 1985). Registros eletrofisiológicos intracelulares realizados em células ganglionares mostraram a existência de capacidade de processamento de discriminação cromática no UV, propondo a existência de cinco canais de oponência cromática: UVBG/R, UVB/GR, UVGR/B, UVR/BG, e UV/BGR (Rocha *et al*., 2008), que proporcionariam amplas possibilidades de discriminação de cores (Jacobs, 2018).

Tabela 2 - Relação dos valores de sensibilidade espectral (em nm) dos fotopigmentos de cones e bastonetes da tartaruga *T. s. elegans*, obtidos experimentalmente por microespectrofotometria (MSP) e Registro Intracelular (RI).

Cones							**Bastonetes**	**Técnica**	**Ref**
UV	**S**	**M**	**L [*v*]**	**L [*l*]**	**Cones L Duplos**				
					M.P.	**M.A.**			
-	450	518	620	620	620	518	518	MSP	[1]
-	462	522	623	-	623	623	519	MSP	[2]
372	458	515	617	617	617	617	518	MSP	[3]
372	-	-	-	-	-	-	-	RI	[4] [5]

Nota: [1] Liebman & Granda (1971); [2] Lipetz & MacNichol (1982); [3] Loew & Govardovskii (2001); [4] Ventura *et al* (2001) [5] Zana *et al* (2001). [*v*] Gotícula vermelha; [*l*] Gotícula laranja. M.P. = Membro Principal; M.A. = Membro Acessório.

As variações na sensibilidade espectral dos pigmentos visuais das tartarugas, e dos vertebrados de modo geral, podem ser decorrentes de adaptações sofridas pelos seus ancestrais aos vários ambientes fóticos (Lythgoe, 1979), e de aspectos da ecologia visual, como padrão de ritmo circadiano, tipo de alimento, e seleção sexual (Hauser & Chang, 2017; Castiglione *et al*., 2018; Gutierrez *et al*., 2018; Van Nynatten *et al*., 2019; Wright *et al*., 2019). Uma vez que o sistema visual apresenta papel ímpar na sobrevivência de grande parte dos vertebrados, suas estruturas estão sob forte pressão seletiva, conduzindo a adaptações relacionadas às características fóticas do ambiente. Em especial, são observadas modificações importantes na sequência de aminoácidos dos pigmentos visuais de cada grupo de opsina, que alteram a sensibilidade espectral

dos pigmentos visuais (Davies *et al*., 2012; Moritz *et al*., 2013; Yokoyama, 2000). A tartaruga *T. s. elegans* é um modelo já consolidado para o estudo do sistema visual e, embora estudos eletrofisiológicos, comportamentais e de MSP tenham determinado as curvas de absorção dos fotopigmentos de cones e bastonete da espécie, não existem na literatura estudos moleculares focados na investigação dos mecanismos genéticos responsáveis pela expressão das diferentes classes de opsinas visuais. Assim, o presente estudo tem como proposta sequenciar os cinco genes de opsinas expressos em retinas da tartaruga *T. s. elegans*, e estimar a resposta espectral máxima com base na sequência de aminoácidos dos diferentes fotopigmentos, considerando o uso do cromóforo 11-cis-3,4-dehidroretinal, somado a análises de modelagem computacional para compreender os mecanismos moleculares envolvidos no deslocamento espectral das opsinas desta espécie.

2. JUSTIFICATIVA

O processamento da informação visual se inicia a partir da absorção de um *quantum* de luz pelo cromóforo e a consequente ativação da opsina. A maioria dos vertebrados utiliza como grupo prostético a molécula de retinal (Krzysztof Palczewski, 2012; Wald, 1968). Entretanto, algumas espécies de vertebrados, geralmente de hábitos aquáticos ou semiaquáticos, como a tartaruga-de-orelha-vermelha, *Trachemys scripta elegans*, apresentam seus pigmentos visuais baseados na utilização de uma outra classe de cromóforo, derivado da vitamina A_2, denominada 11-cis-3,4-dehidroretinal. A presença desta molécula gera um deslocamento batocrômico da faixa de absorção espectral, alterando o comprimento de onda maximamente absorvido pelos pigmentos visuais em direção a comprimentos de onda mais longos (Wald, 1938; Wald *et al*., 1953, 1958).

Ainda que se desconheça a razão pela qual algumas espécies de vertebrados utilizem o 3,4-dehidroretinal em detrimento ou em conjunto com o retinal, pressupõe-se que seu uso esteja intimamente relacionado com a composição fótica do ambiente (Bridges, 1972; Musilova *et al*., 2019). Estudos que avaliaram a transmitância espectral em corpos d'água e compararam com os valores de disponibilidade luminosa obtidos para colunas d'água entre 3 e 100 metros de profundidade, identificaram em ambientes de água rasa a prevalência de luz com comprimentos de onda longos, ao passo que ambientes de águas mais profundas apresentaram gradativamente uma predominância de luz com comprimentos de onda deslocados para os mais curtos (Clarke, 1939; Douglas *et al*., 1998). Uma vez que os vertebrados dependem, de modo geral, do sistema visual para a manutenção de uma série de comportamentos vitais, a utilização de uma ou outra classe de cromóforo pode ser entendida como resposta à pressão seletiva exercida pelas diferentes características fóticas dos ambientes.

A tartaruga *T. s. elegans* caracteriza-se como um modelo consolidado para o estudo do sistema visual dos vertebrados, e uma gama de informações a respeito de diferentes aspectos do seu sistema visual está disponível na literatura. Descrições morfológicas identificaram os tipos celulares presentes em sua retina (Baylor & Fettiplace, 1975; Goede & Kolb, 1994; Kolb & Jones, 1987) e demonstraram seus padrões de distribuição e especialização (Grötzner *et al*., 2019). Estudos eletrofisiológicos e de microespectrofotometria demonstraram a funcionalidade de cones e bastonetes em seu aspecto cromático (Liebman & Granda, 1971; Loew &

Govardovskii, 2001; Ventura *et al*., 2001; Ventura *et al*., 1999; Zana *et al*., 2001). Estudos comportamentais identificaram que esta tartaruga é capaz de responder à estímulos luminosos entre 370 e 700 nm (Arnold & Neumeyer, 1987; Neumeyer & Jäger, 1985). Esta ampla gama de informações fornece uma base sólida para a investigação de aspectos moleculares relacionados à interação entre os aminoácidos críticos para a sensibilidade espectral de seus pigmentos visuais e o cromóforo 11-cis-3,4-dehidroretinal, o que nos permite compreender a sua atuação e interferência nos mecanismos gênicos responsáveis pela visão de cores.

A partir da identificação das sequências de aminoácidos que compõem as diferentes opsinas expressas na retina de *T. s. elegans* e da comparação da sensibilidade espectral das opsinas inferida com base nestas sequências com os valores de λ_{max} já conhecidos das opsinas, torna-se possível identificar o perfil de aminoácidos críticos responsáveis por modular a resposta máxima e o ajuste causado pela utilização do cromóforo 11-cis-3,4-dehidroretinal. A tartaruga *T. s. elegans* também representa uma ferramenta importante para testar a aplicação de modelos computacionais, e compreender as bases moleculares que geram os diferentes fenótipos espectrais das opsinas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Determinar as bases moleculares das bandas de absorção espectral das cinco classes de opsinas visuais presentes na retina da tartaruga *Trachemys scripta elegans*.

3.2. Objetivos Específicos

- Amplificar e sequenciar os cinco genes de opsinas expressos em retinas de *T. s. elegans*, *sws1, sws2, rh1, rh2 e lws/mws*, e determinar as relações filogenéticas entre os genes de opsinas da tartaruga e de outras espécies de vertebrados.

- Estimar o comprimento de onda maximamente absorvido (λ_{max}) por uma das opsinas de *T. s. elegans* com base na sequência de aminoácidos encontrada nas posições responsáveis pelo deslocamento espectral das opsinas;

- Desenvolver modelos computacionais, baseados na sequência de aminoácidos encontrada para cada opsina, para predizer de forma satisfatória, sua resposta espectral máxima.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Um indivíduo macho adulto de *Trachemys scripta elegans* foi obtido junto ao Biotério de Quelônios e Lagartos do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil) (Anexo I). Foi tomada a medida de massa do animal e em seguida realizada a eutanásia por meio da injeção letal do anestésico tiopental sódico (100 mg/ kg). Os procedimentos realizados estão de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (Protocolo 5446131117) (Anexo II).

4.2. Genética de Opsinas

4.2.1. Isolamento de *RNA* Total

Após a eutanásia, os olhos foram imediatamente enucleados e preservados em *RNAlater* (Ambion) a 4ºC. O *RNA* (do inglês, *Ribonucleic Acid*) total foi extraído a partir das retinas homogeneizadas com uso do mini kit de RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

4.2.2. Síntese de *DNA* Complementar

Foi preparada uma diluição de 1/10 de *RNA* com 500 ng de *primer* oligo-dT (12-mer) e o *RNA* total foi convertido para *DNA* complementar (*cDNA*) com uso da enzima transcriptase reversa MultiScribe (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

4.2.3. Reação em Cadeia de Polimerase

A reação em cadeia de polimerase (*PCR* - do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) foi realizada para amplificar as sequências de nucleotídeos que compõem o *cDNA* das opsinas expressas nas retinas de *T. s. elegans*, com uso de *primers* desenhados a partir de sequências de opsinas de outras espécies de quelônios ou outros répteis (**Tabela 3**), por meio do servidor Primer 3 (v.0.4.0) (Untergasser *et al*., 2012). As reações de *PCR* foram realizadas usando o *Kit Platinum Taq DNA Polymerase* (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), com a enzima *High Fidelity Platinum Taq Polymerase*, 10× *High Fidelity Buffer*, $MgCl_2$ a 50 mM, 10 mM *GeneAmp dNTPs* (Life

Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) e 20 μM de *primers* diluídos em H_2O *Rnase-Dnase free*, em reações com volume final de 50 μL. As reações, para cada par de *primer*, foram realizadas em termociclador de acordo com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 94°C por 1 min; 37 ciclos a 94°C por 15 segundos, temperatura de anelamento variada, por 30 segundos (**Tabela 3**), temperatura de extensão de 72°C por 30 segundos; e extensão final a 72°C, por 10 min. Os produtos obtidos da *PCR* foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (1%) e armazenados a -20ºC até o momento da purificação. A purificação foi feita por meio do *Kit Illustra GFX*™ *PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), conforme protocolo fornecido pelo fabricante. As amostras purificadas foram mantidas a -20ºC, para posterior sequenciamento.

Tabela 3 – Descrição dos *primers* desenhados para amplificação dos genes de opsinas de *T. s. elegans.*

Primer	Opsina	Espécie	Sequência	Temp (°C)
Emyd_LWS_Fw	LWS	*Chrysemys picta bellii*	GTCTACACCAACAGCAACAACAC	61
Emyd_LWS_Rv	LWS	*Chrysemys picta bellii*	GTCCACCTTCTTCCCAAACA	61
Uta_RH1_Fw	RH1	*Uta stanburiana*	TGTTGTTCGGAGTCCATTTGAAT	57
Uta_RH1_Rv	RH1	*Uta stansburiana*	TGACTTGTGGAGACTGTAGATGT	57
Emyd_RH2_Fw	RH2	*Chrysemys picta bellii*	TATCAATTTCTATGTGCCGCTCT	62
Emyd_RH2_Rv	RH2	*Chrysemys picta bellii*	GATACGGTTGAGGAGACATCATC	62
RH2_Ts_Fw1	RH2	*T. s. elegans*	CCCCTTTGAGTACCCACAGTATT	60
RH2_Ts_Rv1	RH2	*T. s. elegans*	TTACACACCACGATATAACGCTCT	60
RH2_Ts_Fw2	RH2	*T. s. elegans*	CTTGATGGGCATCAGTTTTACCT	63
RH2_Ts_Rv2	RH2	*T. s. elegans*	ATGAGAAAGCCCAGAACCATTAG	63
Emyd_SWS1_Fw	SWS1	*Chrysemys picta bellii*	TTTACCTCTTTGAGAACGTCTCCT	61
Emyd_SWS1_Rv	SWS1	*Chrysemys picta bellii*	GACTCGTCTGTGATGGGTTTC	61
Cpicta_SWS2_Fw	SWS2	*Chrysemys picta bellii*	GGTGCCTCTGGACACAAACA	62
Cpicta_SWS2_Rv	SWS2	*Chrysemys picta bellii*	GCCACAGAACACCAGCTTCA	62
Cpicta_SWS2_Fw1	SWS2	*Chrysemys picta bellii*	CATACATCCTGTAGCCTCTCCAT	62
Cpicta_SWS2_Rv1	SWS2	*Chrysemys picta bellii*	GAGACCAGAGACTCACCATGC	62
Cpicta_SWS2_Fw2	SWS2	*Chrysemys picta bellii*	GATCTTCCTCTTCTGCTTCTGCT	62
Cpicta_SWS2_Rv2	SWS2	*Chrysemys picta bellii*	GAGGAGACGGAGGAGACCTG	62

Nota: Temp, Temperatura de Anelamento.

4.2.4. Sequenciamento de *DNA*

O sequenciamento das amostras foi realizado com o *Kit Big Dye Terminator* (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), com o sequenciador 3500xL (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa do Hospital Albert Einstein (IIEPAE). As sequências de nucleotídeos obtidas foram analisadas com o programa BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999).

4.2.5. Estimativa das bandas de Absorção Espectral

Os valores de λ_{max} dos pigmentos visuais da tartaruga *T. s. elegans* foram estimados a partir de aminoácidos em posições específicas da proteína. As sequências de aminoácidos foram alinhadas com a sequência da rodopsina bovina (número de acesso no GenBank: NM_001014890.2), usada como base para a numeração dos aminoácidos e determinação das posições de deslocamento espectral. Para cada uma das opsinas foram analisados resíduos específicos, descritos na literatura como críticos para o deslocamento espectral (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Relação de resíduos críticos de deslocamento espectral das opsinas, investigados neste estudo.

Posição	SWS1	SWS2	RH1	RH2	LWS
46	[1];[2];[3]	[2];[5];[6]			
48		[7]			
49	[1];[2];[3]	[2];[5];[6]		[11]	
52	[1];[2];[3]	[2];[5];[6]		[11]	
83			[5];[9];[10]	[11]	
86	[1];[2];[3]			[11]	
90	[1];[2];[3]				
91	[3]	[1]			
93	[1];[2];[3]	[2];[5];[6]			
94		[1]			
96			[5];[9];[10]		
97	[3];[4]			[11]	
99		[7]			
100		[7]			
102			[5];[9];[10]		
109	[3]				
113	[3];[4]				
114	[1];[2];[3]				
116	[3];[4]	[8]			
118	[1];[2];[3]				
122		[1]	[5];[9];[10]	[11]	
151		[7]			
159		[7]			
164		[2];[5];[6]		[11]	[5]
166		[7]			
169		[7]			
181					[5]
183			[5];[9];[10]		
207		[2];[5];[6]			
217		[7]			
253			[5];[9];[10]		
261			[5];[9];[10]		[5]
269		[2];[5];[6]			[5]
289			[5];[9];[10]		
292		[1]	[5];[9];[10]		[5]
299			[5];[9];[10]		
304		[7]			
317			[5];[9];[10]		

Nota: [1] Davies *et al* (2007); [2] Yokoyama (2000); [3] Miyazaki *et al* (2017); [4] Yokoyama *et al* (2006); [5] Yokoyama (2008); [6] Yokoyama & Tada (2003); [7] Bloch *et al* (2015); [8] Coyle *et al* (2012); [9] Hunt *et al* (2001); [10] Levenson *et al* (2006); [11] Takenaka & Yokoyama (2007).

A interferência de cada aminoácido considerado para a estimativa da banda de absorção espectral dos pigmentos visuais foi verificada a partir de dados da literatura.

Entretanto, uma vez que trabalhos investigando a interferência destes aminoácidos em pigmentos visuais associados ao 3,4-dehidroretinal são escassos, a estimativa do λ_{max} das opsinas foi realizada inicialmente considerando uma suposta presença do retinal. Estes valores foram posteriormente corrigidos por meio de regressões matemáticas construídas a partir dos valores de absorção espectral mensurados em opsinas associadas a ambas as classes de cromóforos (**Tabela 5**). A correção dos valores foi feita segundo a proposição de diferentes regressões: quadrática, exponencial e logarítmica. Como critério de seleção do melhor modelo foram observados fatores como o Coeficiente de Determinação (R^2), a Soma dos Quadrados Residuais (*SSE* – do inglês, *sum of squared estimate of errors*) e a Raiz Quadrada do Erro Médio (*RMSE* do inglês, *Root Mean Square Error*).

Tabela 5 - Valores de absorção espectral correlacionados para o estabelecimento de correlação matemática das bandas espectrais de pigmentos visuais utilizando os cromóforos derivados da vitamina A1 e A2.

Espécie	Opsina	A1 (nm)	A2 (nm)	Ref
Carassius auratus	LWS	565,6	617,5	Parry & Bowmaker (2000)
Gallus gallus	LWS	560	620	Wald *et al*. (1953)
Scardinus erythrophthalmus	LWS	562	620	Loew & Dartnall (1975)
Danio rerio	LWS	561	618	Enright *et al*. (2015)
Carassius auratus	RH1	502,7	522,2	Parry & Bowmaker (2000)
Rana catesbeiana	RH1	502	525	Saarinen, P. (2012)
Danio rerio	RH1	503	527	Allison *et al*. (2004)
Scardinus erythrophthalmus	RH1	510	540	Loew & Dartnall (1976)
Salmo gairdneri	RH1	503	527	Allen *et al*. (1973)
Salmo clarki	RH1	503	527	Allen *et al*. (1973)
Salmo trutta	RH1	507	534	Allen *et al*. (1973)
Salvelinus fontinalis	RH1	503	527	Allen *et al*. (1973)
Scardinus erythrophthalmus	RH1	507	535	Allen *et al*. (1973)
Nototemigonus crysoleucas boscii	RH1	502	529	Allen *et al*. (1973)
Nototemigonus crysoleucas aureatus	RH1	504	530	Allen *et al*. (1973)
Richardsonius bauteatus	RH1	506	530	Allen *et al*. (1973)
Belonesox belizanus	RH1	498	521	Allen *et al*. (1973)
Lota lota	RH1	503	527	Allen *et al*. (1973)
Carassius auratus	RH2	515,9	534,9	Parry & Bowmaker (2000)
Danio rerio	RH2	482	504	Allison *et al*. (2004)
Scardinus erythrophthalmus	RH2	500	523	Loew & Dartnall (1976)
Chelonia mydas	RH2	440	450	Liebman & Granda (1971)
Oncorhynchus mykiss	RH2	434	441	Hawryshyn & Hárosi (1994)
Platichthys stellatus	RH2	545	557	Savelli *et al*. (2018)
Carassius auratus	SWS1	370,1	381,9	Parry & Bowmaker (2000)
Danio rerio	SWS1	362	377,5	Robinson *et al*. (1993)
Carassius auratus	SWS2	447,2	454,1	Parry & Bowmaker (2000)
Platichthys stellatus	SWS2	527	556	Savelli *et al*. (2018)

As curvas de absorção espectral foram determinadas a partir do modelo proposto por Govardovskii e colaboradores (2000), para pigmentos visuais de vertebrados. A

descrição das bandas que compõem as curvas de absorção ocorreu de acordo com as funções abaixo. A descrição da banda α ocorreu com a aplicação da seguinte fórmula:

$$S(x) = \frac{1}{(\exp[A(a-x)]+\exp[B(b-x)]+\exp[C(c-x)]+D)} \quad \textbf{(1)}$$

Onde $x = \lambda_{max}/\lambda$. Os demais parâmetros da fórmula foram obtidos a partir de análises realizadas para a rodopsina bovina e são expressos como A = 69,7; B = 28; b = 0,922; C = -14,0; c = 1,104; D = 0,674 (Govardovskii *et al*., 2000).

Para o cálculo de *a* foi utilizada a seguinte fórmula:

$$a = 0{,}8759 + 0{,}0459.\frac{\exp[-(\lambda_{max}-300)^2}{11940} \quad \textbf{(2)}$$

A banda β foi descrita a partir da aplicação da fórmula:

$$S_\beta\ (\lambda) = \left(\frac{1}{A_\beta.\exp\{-[(\lambda-\lambda_{m\beta})/b]^2\}}\right).10 \quad \textbf{(3)}$$

O valor de A_β foi fixado em 0,26 (Govardovskii *et al*., 2000). Os valores referentes a $\lambda_{m\beta}$ e *b* foram estimados, respectivamente, a partir das equações:

$$\lambda_{m\beta} = 189 + 0{,}315.\lambda_{max} \quad \textbf{(4)}$$

$$b = -40{,}5 + 0{,}195.\lambda_{max} \quad \textbf{(5)}$$

A curva de absorção espectral total, considerando a soma das bandas α (**Equação 1**) e β (**Equação 3**), foi inferida de acordo com a seguinte função:

$$S = \left(\frac{1}{\exp\,[A(a-x)+\exp[B(b-x)]+\exp[C(c-x)]+D}\right) + \left(\frac{1}{(A_\beta*\exp\{-[(\lambda-\lambda_{m\beta})^2]\})/10)}\right) \quad \textbf{(6)}$$

4.3. Identificação da Presença do Citocromo CYP27C1

A presença do cromóforo 3,4-dehidroretinal (Vitamina A_2) como grupo prostético das opsinas visuais de *T. s. elegans* foi determinada pela identificação da expressão do gene *cyp27c1* na retina, responsável por transcrever o citocromo

CYP27C1, membro da família P450, responsável por converter o retinal em 3,4-dehidroretinal. Para verificação da expressão do gene foram desenhados *primers* com base na sequência nucleotídica deste gene da tartaruga *Chrysemys picta bellii* (Genbank: XM_005279747.3). A expressão do gene do citocromo CYP27C1 na retina de *T. s. elegans* foi verificada a partir de *PCR* e sequenciamento Sanger.

4.4. Análises Filogenéticas

Para as análises filogenéticas, as sequências obtidas para os genes das opsinas expressas na retina de *T. s. elegans* foram comparadas com sequências dos genes das cinco classes de pigmentos visuais de outras espécies de vertebrados (Anexo III), disponíveis no banco de dados GenBank, com uso das ferramentas de *BLASTn* (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*) e *Batch Entrez*. Todas as sequências foram submetidas ao alinhamento múltiplo com o auxílio do *software* ClustalW (Larkin *et al*., 2007). Sequências de melanopsinas das tartarugas *Chelonia mydas* e *Pelodiscus sinensis*, e das aves *Chiroxiphia lanceolata* e *Gallus gallus* foram utilizadas como grupo externo.

As reconstruções filogenéticas foram realizadas utilizando o método de Máxima Verossimilhança (MV), e inferência *Bayesiana* (IB). Para tanto, os esquemas de partições ideais foram selecionados com o *software* MEGA X (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) v.10.1 (Kumar *et al*., 2018). As análises de MV foram realizadas a partir do *software* MEGA X v.10.1 (Kumar *et al*., 2018) e os suportes estatísticos das árvores de MV foram estipulados a partir de *bootstrap* não paramétrico (Felsenstein, 1985) com 1000 pseudo-repetições. As análises *Bayesianas* foram desenvolvidas com o *software* MrBayes 3.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). As *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) foram iniciadas a partir de uma árvore aleatória, amostrando a cada 1000 gerações a partir de duas corridas paralelas de $1.0x10^7$ gerações. Pontos amostrados antes da fase de platô foram descartados como *burn-in*, e as árvores remanescentes foram combinadas para estabelecer a probabilidade máxima da filogenia. As árvores resultantes foram visualizadas e editadas com o programa FigTree v1.4.2 (Rambaut, 2007).

4.5. Modelagem Computacional

Análises *in silico* de modelagem computacional foram realizadas com o intuito de simular o comportamento de sistemas químicos e biológicos, com a construção da

estrutura tridimensional das proteínas de interesse em ambiente virtual a da aplicação de diferentes métodos de cálculo que visam prever suas propriedades físico-químicas. Para detalhes teóricos acerca dos métodos utilizados, vide Apêndice I. A construção dos modelos computacionais das opsinas foi realizada com o auxílio de um computador *Laptop* DELL (Inspiron 15 Série 3000) de uso pessoal, equipado com processador I7 de oitava geração, 8 GB de memória RAM, 2 TB de SSD e placa de vídeo AMD Radeon 520 (2 GB).

4.5.1. Construção dos Modelos *In silico* das Opsinas de *T. s. elegans*

A partir das sequências de aminoácidos dos pigmentos visuais da tartaruga *T. s. elegans*, foram construídos modelos computacionais para as opsinas SWS1, SWS2, RH1, RH2 e LWS. A estrutura proteica da opsina RH1 foi modelada a partir da técnica de Modelagem Comparativa, com o auxílio do servidor *SwissModel* (Waterhouse *et al*., 2018). Inicialmente, a sequência de aminoácidos obtida para a rodopsina RH1 foi submetida ao *SwissModel*, que construiu o modelo utilizando como base a estrutura cristalina da rodopsina bovina (número de acesso no *Protein Data Bank, PDB*: 1F88) (Palczewski *et al*., 2000). Uma vez que não existem descrições da estrutura cristalina para as outras classes de opsinas, a construção do modelo computacional das opsinas SWS1, SWS2, RH2 e LWS foi feita a partir da utilização da técnica de *Threading*, com auxílio do servidor LOMETS (*LOcal Meta-Threading-Server*) (Wu & Zhang, 2007; Zheng *et al*., 2019). O modelo para cada classe de opsina foi construído a partir da submissão das sequências de aminoácidos obtidas para cada proteína: SWS1, SWS2, RH2 e LWS. Após a obtenção das estruturas terciárias das opsinas, a qualidade de cada um destes modelos foi avaliada com o servidor *Verify3D* (https://servicesn.mbi.ucla.edu/Verify3D/) (Bowie *et al*., 1991; Lüthy *et al*., 1992) e, também, segundo o diagrama de Ramachandran obtido a partir servidor PROCHECK (https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/).

4.5.2. Docagem Molecular

O processo de docagem molecular foi utilizado para determinar a melhor posição do cromóforo na região de interação da proteína. A molécula 11-cis-3,4-dehidroretinal (número de acesso PubChem: 5280867) foi utilizada como ligante. A preparação do ligante foi realizada com o auxílio do *software* UCFS CHIMERA v1.11.2 (Universidade da Califórnia, São Francisco, EUA) (Pettersen *et al*., 2004), utilizando

para a adição de cargas o modelo *AM1-BCC* (Jakalian *et al*., 2002). Dada a parametrização do estado das cargas, o arquivo resultante foi salvo com a extensão *mol2*.

As coordenadas da posição do cromóforo em relação à porção proteica do pigmento visual foi avaliada de acordo com a posição do retinal na estrutura cristalina da rodopsina bovina (número de acesso no *PDB*: 1F88) (Palczewski *et al*., 2000). Após a adição das cargas na estrutura do ligante, o arquivo *mol2* foi exportado para o *software* AUTODOCKTOOLS v1.4.5 (*Molecular Graphics Laboratory*, TSRI, Kirkland, EUA) (Morris *et al*., 2009), onde foi feita a análise dos diedros ativos e preparação desta molécula para o processo de docagem. Para cada proteína estudada, a região de interação da proteína (região da proteína onde o cromóforo deverá interagir) com o ligante foi determinada a partir da posição do cromóforo na estrutura cristalina da rodopsina bovina. Esta região, onde foi determinado o *Grid box* (**Figura 19**), foi estabelecida para cada um dos modelos de receptores (estruturas das opsinas SWS1, SWS2, RH1, RH2 e LWS).

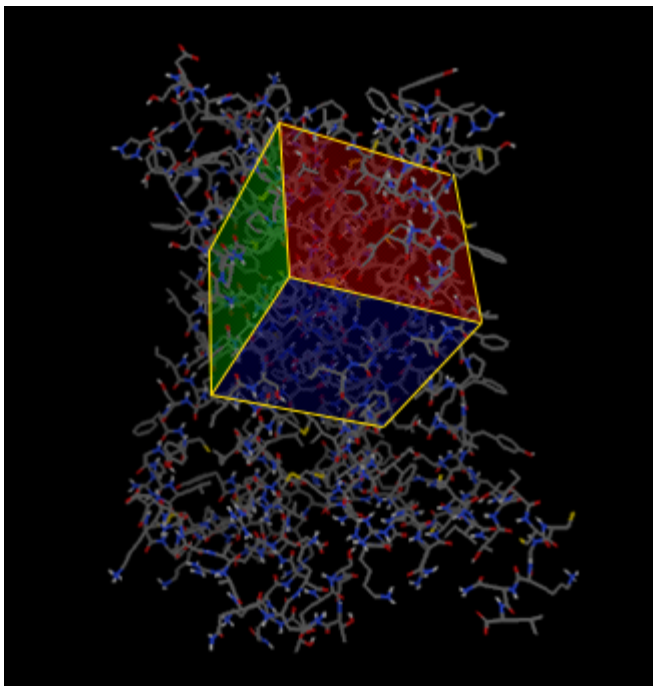


Figura 19 – Modelo computacional da rodopsina de *Trachemys scripta elegans*. Demarcado pelas linhas amarelas pode-se verificar a região denominada *Grid box*.

Foram realizadas 100 repetições de *docking* para o ligante em cada um dos cinco modelos construídos. O *docking* molecular foi realizado com o auxílio do *software* AUTODOCK VINA v1.1.2 (*Molecular Graphics Laboratory*, TSRI, Kirkland, EUA)

(Trott & Olson, 2010). Dos resultados obtidos para cada receptor, foram selecionadas as conformações moleculares que apresentaram a menor energia livre de interação.

4.5.3. Estimativa do Espectro de Absorção UV/visível

Para a estimativa da banda de absorção espectral foram considerados os aminoácidos distantes em até 4 angströms em relação ao 3,4-dehidroretinal. Após a seleção destes aminoácidos e do 3,4-dehidroretinal, a estrutura resultante foi submetida ao processo de otimização semi-empíricos com o *software* MOPAC. O estudo teórico do espectro eletrônico de absorção das opsinas SWS1, SWS2, RH1, RH2 e LWS foi realizado com o *software* ORCA (*Max Planck Institut*, Munique, Alemanha) (Neese, 2012, 2018). Para todas as famílias de opsinas estudadas, o *software* utilizou como base a Teoria do Funcional de Densidade Tempo-Dependente (TD-DFT - *Time Dependent Density Functional Theory*) com funcional de correlação-troca B3LYP e conjunto de base 6-31G para o estudo do estado excitado.

5. RESULTADOS

Neste estudo, os cinco genes de opsinas expressos na retina de *T. s. elegans* foram amplificados e sequenciados, análises comparativas feitas por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e filogenia molecular confirmaram a identidade dos cinco genes, ortólogos aos genes *sws1*, *sws2*, *rh1*, *rh2*, e *lws*, de vertebrados. A utilização do cromóforo 3,4-dehidroretinal, derivado da vitamina A_2, foi inferida a partir da expressão do gene *cyp27c1* na retina de *T. s. elegans*, demonstrado por meio da sua amplificação e sequenciamento. Para a determinação dos valores de absorção espectral de cada opsina foram analisados aminoácidos em posições específicas de deslocamento espectral, e a estimativa do λ_{max} foi corrigida levando em consideração o uso do cromóforo 3,4-dehidroretinal. A identificação das sequências de aminoácidos das opsinas também permitiu a elaboração de modelos computacionais para as cinco classes de fotopigmentos. Todos os modelos apresentaram bom resultado estrutural e permitiram a avaliação de aspectos físicos relacionados à rede de interações não ligadas envolvendo as substituições capazes de interferir no λ_{max} das proteínas.

5.1. Análises Filogenéticas

Os cinco genes de opsinas expressos na retina de *T. s. elegans* foram amplificados e sequenciados, a identidade de cada gene foi confirmada com a ferramenta *BLASTn* (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*), e por análises filogenéticas realizadas por Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência *Bayesiana* (IB). As análises filogenéticas foram feitas a partir de alinhamento contendo 930 pares de base (pb) dos genes amplificados, e 129 sequências pertencentes aos cinco grupos de opsinas de vertebrados, obtidas no banco de dados GenBank (Anexo III). O modelo de partição selecionado para MV e AB foi TIMe+R5 para todas as posições do códon.

A topologia consenso recuperada pela AB foi similar à melhor árvore de MV. As análises filogenéticas recuperaram a monofilia de cada um dos cinco genes de opsinas, com alto suporte de *bootstrap* e probabilidade *bayesiana* (**Figura 20**). A topologia da árvore resultante mostra dois grupos monofiléticos, um formado pelo gene *lws*, ancestral, e o segundo pelos demais genes, conforme esperando para opsinas de vertebrados (Yokoyama, 2008). As sequências das opsinas de *T. s. elegans*, foram agrupadas com os genes de opsinas de outras tartarugas. A **Figura 21** apresenta em detalhes, os resultados das análises para cada um dos cinco genes de opsinas.

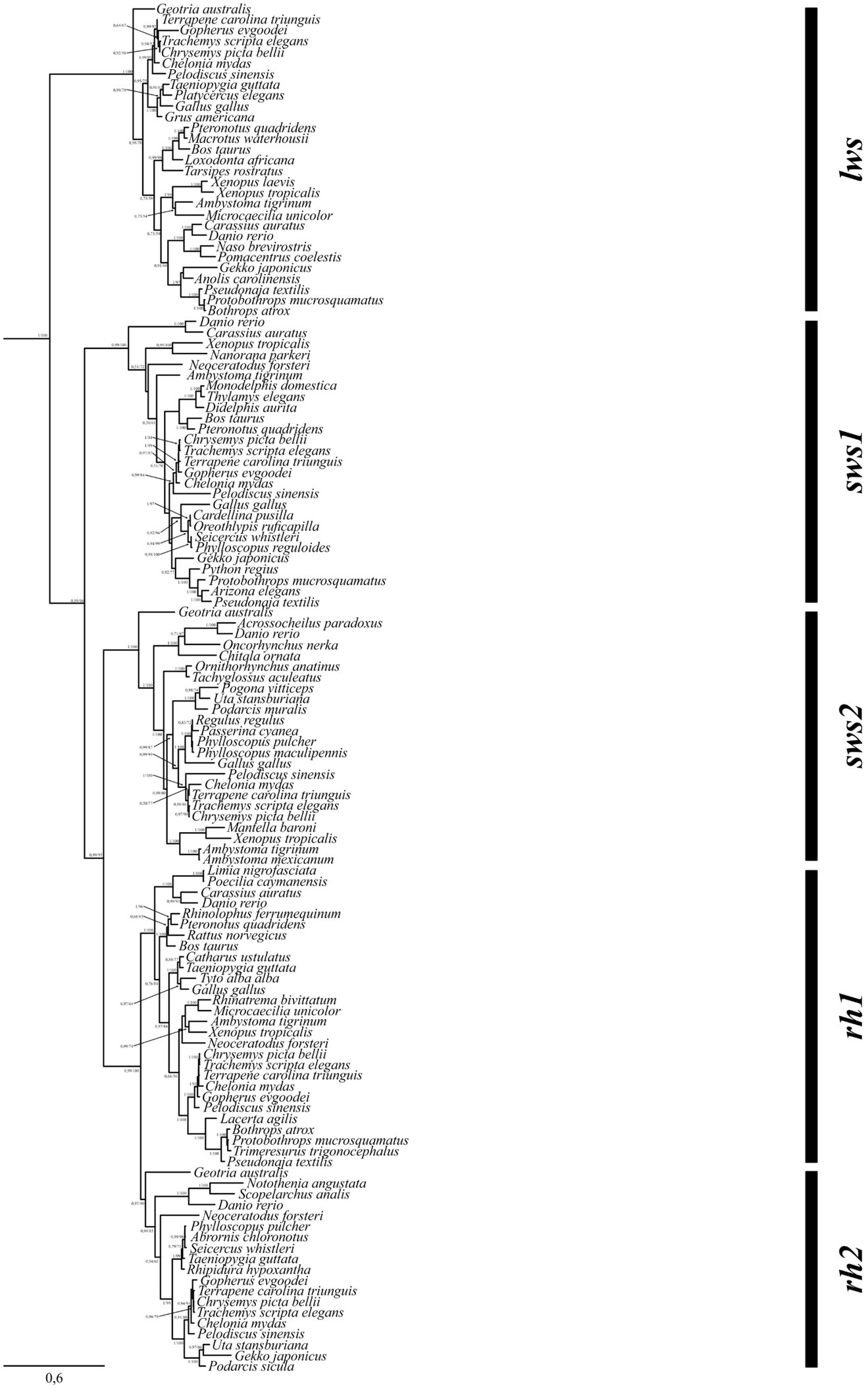


Figura 20 - Análise filigenética das sequências de nucleotídeos dos cinco grupos de opsina visuais de vertebrados, construída pelo método de Máxima Verossímilhança (MV). Sequências de melanopsina pertencentes a tartaruga *T. s. elegans*, ao peixe bagre *Ictalurus punctatus* e à ostra *Crassostrea gigas* (números de acesso no GenBank: HM197714.1, FJ839438.1, XM_011448368.2 respectivamente) foram utilizadas como grupo externo. (dado não apresentado). A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeo por sítio.

Para a reconstrução filogenética foram incluídas as sequências dos genes de opsinas de seis espécies de testudíneos pertencentes a quatro famílias: Emydidae (*Trachemys scripta elegans*, *Chrysemys picta bellii*, *Terrapene carolina triunguis*), Testudinidae (*Gopherus evgoodei*), Cheloniidae (*Chelonia mydas*) e Trionychidae (*Pelodiscus sinensis*). A única exceção foi para o gene *sws2*, em que não foi amostrado o representante da família Testudinidae, *G. evgoodei*. Para os cinco genes, o grupo das tartarugas formou clados monofiléticos, com alto suporte de bootstrap e probabilidade *bayesiana* (**Figura 21**). Para os genes *sws1* e *rh2*, a topologia interna das árvores resultantes foi condizente com a filogenia do grupo das tartarugas descrito na literatura (Guillon *et al*., 2012), em que as três espécies da família Emydidae formaram um clado monofilético, irmão de Testudinidae (*G. evgoodei*), e este grupo, por sua vez, formou um clado monofilético, irmão de Cheloniidae. Topologia semelhante foi obtida para o gene *sws2*, porém, sem a inclusão do Testudinidae, *G. evgoodei*. Para a árvore resultante do gene *rh1*, o clado de Emydidae foi posicionado como grupo irmão de Cheloniidae (*C. mydas*), com alto suporte (1/91), no lugar de Testudinidae, de forma inconsistente com a filogenia do grupo (Guillon *et al*., 2012). E, finalmente, para o gene *lws*, a família Emydidae não formou um grupo monofilético, de forma que *G. evgoodei* (Testudinidae), foi inserida dentro do grupo, porém com baixo suporte (0.6/67). Para os cinco genes, a espécie de Trionychidae, *P. sinensis* foi posicionada como grupo mais externo dentre os testudíneos, condizente com a filogenia do grupo (**Figura 21**).

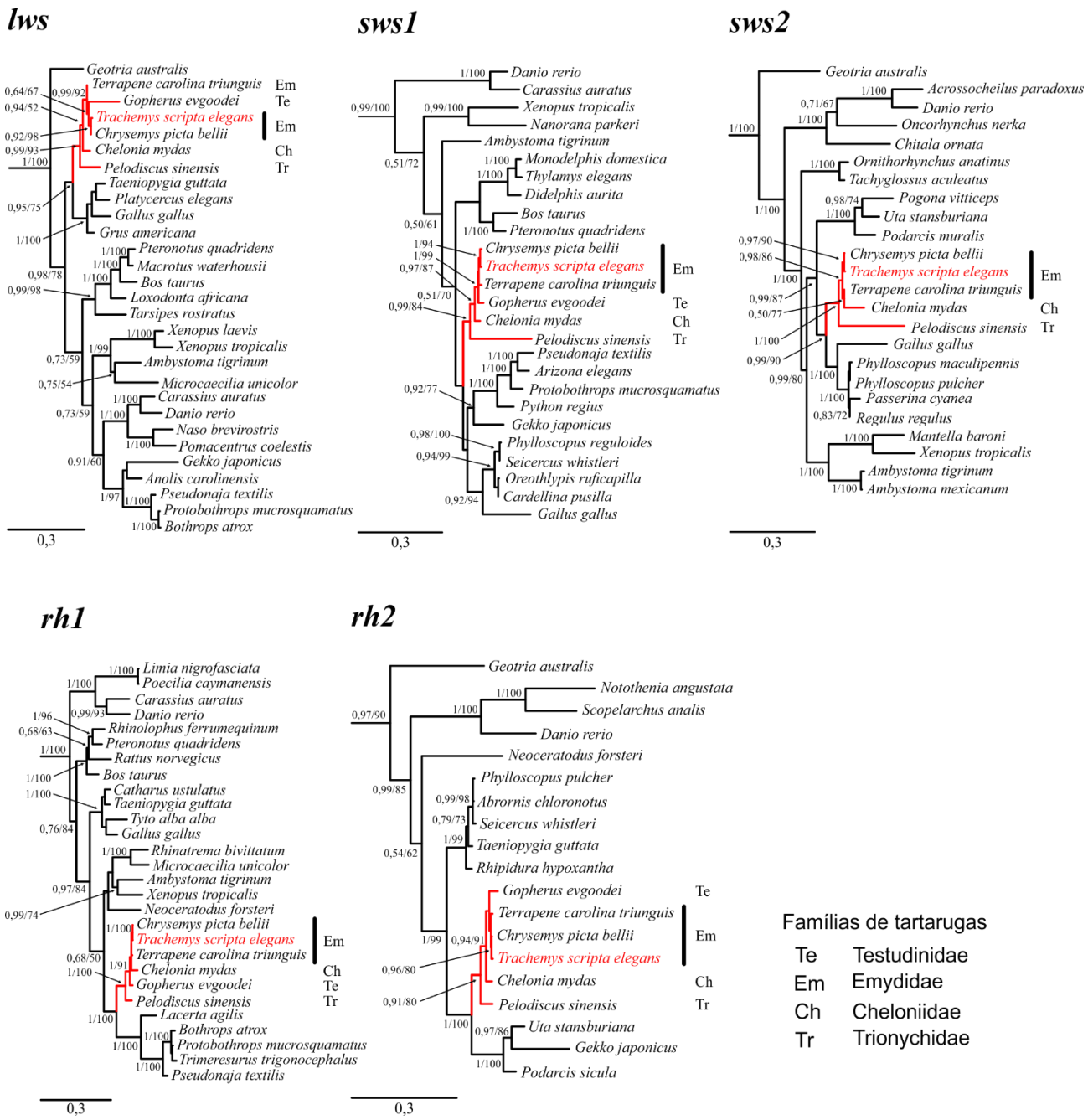


Figura 21 - Detalhe das árvores resultantes para cada gene de opsina expresso por *T. s. elegans* obtidas por MV, a partir de alinhamento das sequências de nucleotídeos dos genes de opsinas da tartaruga-de-orelha-vermelha e de outros vertebrados (Anexo III). A probabilidade bayesiana (PB) e o *bootstrap* da análise de MV estão representados para cada ramo resolvido, nesta ordem (PB/MV). O clado dos testudíneos está representado por linhas vermelhas, e a tartaruga *T. s. elegans* destacada em vermelho. As letras ao lado do clado dos testudíneos identificam as famílias aos quais as espécies apresentadas pertencem. Ch = Cheloniidae; Em = Emydidae; Te = Testudinidae; Tr = Trionychidae.

5.2. Identificação da Expressão da CYP27C1 na Retina de *T. s. elegans*

A expressão do gene *cyp27c1* na retina de *T. s. elegans* foi identificada por meio de sua amplificação por *PCR* e revelação em gel de agarose (**Figura 22**), e sequenciamento Sanger. Em espécies pertencentes a outros grupos de vertebrados utilizados como controle na reação de *PCR*, não foi constatada a amplificação deste gene (**Figura 22**), conforme esperado para espécies que utilizam o retinal como cromóforo. A partir destes resultados, foram desenvolvidas curvas de calibração do sistema rodopsina/porfiropsina a fim de converter o λ_{max} de fotopigmentos baseados na utilização do retinal para aqueles que utilizam o 3,4-dehidroretinal.

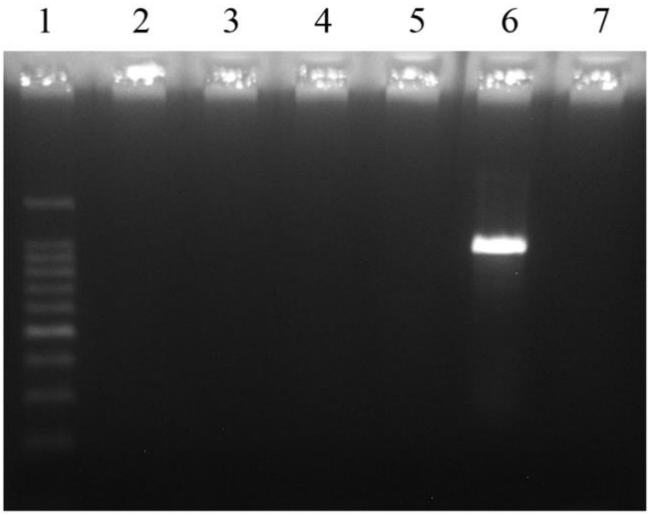


Figura 22 – Fotografia de gel de agarose indicando a amplificação do gene do citocromo *cyp27c1* expresso na retina da tartaruga *T. s. elegans*. Na figura estão numeradas amostras de outras espécies de vertebrados: **(1)** Marcador de peso molecular: 100 pb *ladder*; **(2)** Serpente: *Philodryas patagoniensis*; **(3)** Anfíbio anuro: *Adenomera sp.*; **(4)** Ave: *Mivalgo chimachima*; **(5)** Mamífero: *Canis familiaris*; **(6)** Tartaruga *T. s. elegans*; **(7)** Controle negativo, sem amostra de *DNA*.

5.2.1. Curvas de Calibração

A estimativa do λ_{max} das opsinas de *T. s. elegans* foi realizada mediante a elaboração de proposições matemáticas capazes de considerar o efeito da substituição do retinal pelo 3,4-dehidroretinal sobre o valor do λ_{max}. Tais proposições foram elaboradas a partir da construção de curvas de calibração. Ao todo, foram analisadas seis regressões matemáticas diferentes para os dados de absorção espectral apresentados na **Tabela 5** (ver Material e Métodos). As regressões apresentaram bons resultados, com altos Coeficientes de Determinação (R^2) (**Figura 23**). Os dados estatísticos referentes a cada uma das regressões estudadas, sumarizados na **Tabela 6**, demonstram que a melhor descrição da correlação existente entre os valores de absorção espectral foi estabelecida por uma **relação polinomial de segundo grau**.

Tabela 6 - Sumarização de dados estatísticos referentes a diferentes ajustes utilizados na correlação de dados de absorção espectral para pigmentos visuais que utilizam o retinal e o 3,4-dehidroretinal como grupo prostético. Para cada uma das regressões propostas pode-se observar a equação referente.

Tipo	Grau	SSE	R^2	RMSE	Equação
Polinomial	1	2,68E+03	0,97	10,17	f(x) = 1,207.x+(-76,69)
Polinomial	2	4,18E+02	0,99	4,09	f(x) = 0,002531.(x^2)+(-1,12).x+450,6
Exponencial	1	1,38E+03	0,98	7,28	f(x) = 150,5.exp(0,002493.x)
Exponencial	2	1,15E+03	0,98	6,94	f(x) = 1,007E-14.exp(0,0617.x)+159,4.exp(0,002371.x)
Potência	1	2,41E+03	0,97	9,63	f(x) = 0,3547.x^1,175
Potência	2	1,28E+03	0,98	7,15	f(x) = 2,134E-05.x^2,622+267,3

Nota: SSE, sum of squared estimate of errors; RMSF, *Root Mean Square Erro;* R^2, Coeficiente de determinação.

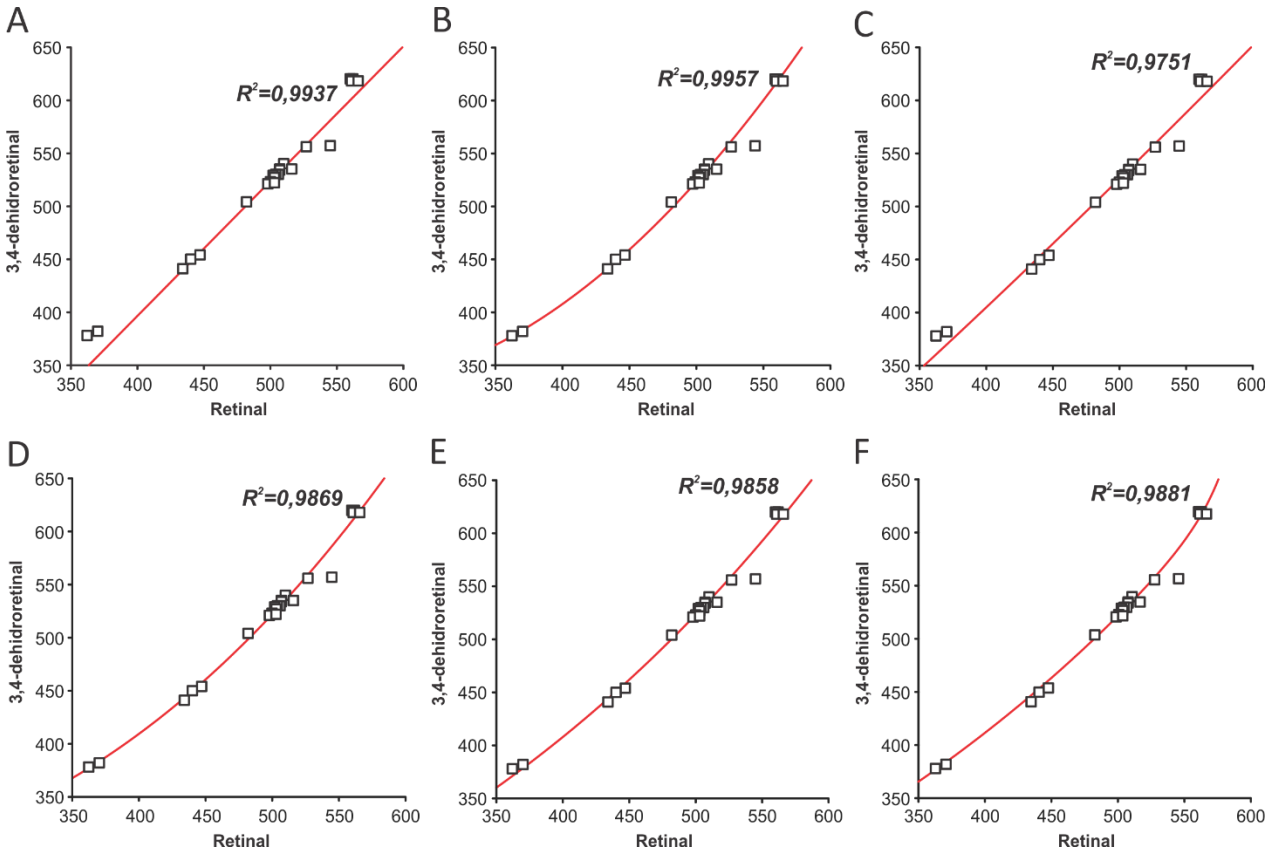


Figura 23 - Comparação de diferentes regressões matemáticas estabelecidas para os valores de absorção espectral de pigmentos visuais que utilizam o retinal e o 3,4-dehidroretinal como grupo prostético. **(A)** Correlação realizada com um ajuste polinomial de grau 1 (R^2 = 0,9937). **(B)** Correlação realizada com um ajuste polinomial de grau 2 (R^2 = 0,9957). **(C)** Correlação realizada com um ajuste exponencial de grau 1 (R^2 = 0,9751). **(D)** Correlação realizada com um ajuste exponencial de grau 2 (R^2 = 0,9869). **(E)** Correlação realizada com um ajuste exponencial de grau 1 (R^2 = 0,9858). **(F)** Correlação realizada com um ajuste exponencial de grau 2 (R^2 = 0,9881). A despeito de os valores de R^2 apresentarem boas regressões, pode-se perceber que o melhor ajuste é obtido pela relação polinomial de segundo grau.

Deste modo, optou-se por aplicar o ajuste quadrático (**Equação 7**) como parâmetro para a construção da curva de calibração do sistema rodopsina/porfiropsina.

A regressão proposta é válida quando a função é estabelecida dentro do intervalo entre 326,10 e +∞, tal que $CD(f) = [326{,}10, +\infty[$. O gráfico isolado da curva de calibração dos valores de absorção espectral referentes aos pigmentos baseados na vitamina A_1 (retinal) para os pigmentos baseados na vitamina A_2 (3,4-dehidroretinal) pode ser observado na **Figura 24**.

$$11\ cis\ A_2\ \lambda_{max} = 0{,}002531.((11\ cis\ A_1\ \lambda_{max})^2) - 1{,}12.(11\ cis\ A_1\ \lambda_{max}) + 450 \qquad \textbf{(7)}$$

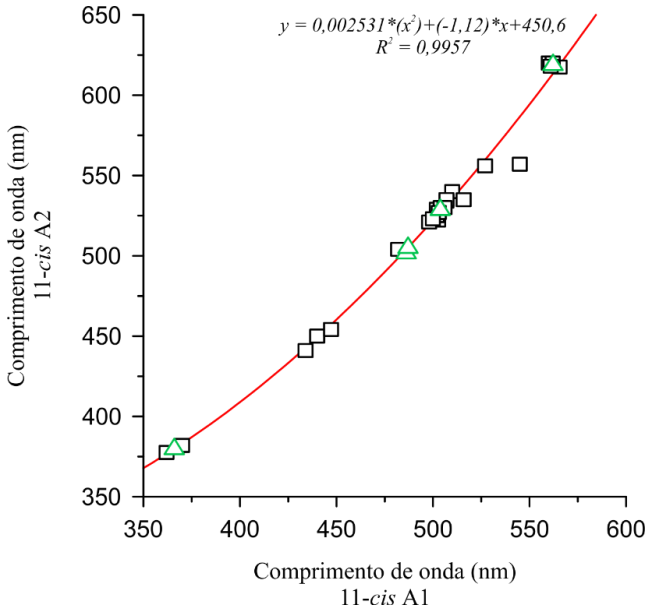


Figura 24 - Curva de calibração para conversão dos valores de absorção espectral de pigmentos visuais que utilizam o retinal (vitamina A_1) para os valores de absorção espectral dos que utilizam o 3,4-dehidroretinal (vitamina A_2). Na figura, os quadrados contornados em preto representam os valores de absorção espectral obtidos na literatura (Tabela 5; ver Material e Métodos). A média dos valores de absorção espectral pode ser observada a partir dos triângulos contornados em verde. A linha de tendência é mostrada em vermelho. A correlação entre os dados foi obtida a partir de um ajuste quadrático de equação y = 0,002531 * (x^2) + (-1,12) * x + 450,6. R^2 = 0,9957. Nanômetro (nm).

5.3. Absorção Espectral das Opsinas de *T. s. elegans*

A partir da análise e da comparação da sequência de aminoácidos dos pigmentos visuais de *T. s. elegans* com aminoácidos de referência da literatura, foi estimado o comprimento de onda máximo absorvido por cada uma das cinco opsinas visuais presentes nas retinas da tartaruga *T. s. elegans*. Os valores estimados pelas análises genéticas foram corrigidos levando em consideração a utilização do cromóforo 3,4-dehidroretinal, com o auxílio da curva de calibração do sistema rodopsina/porfiropsina. Para cada um dos grupos de opsinas, SWS1, SWS2, RH1, RH2 e LWS, o comprimento

de onda maximamente absorvido foi estimado em 374, 456, 518, 519 e 617 nm, respectivamente (**Figura 25**).

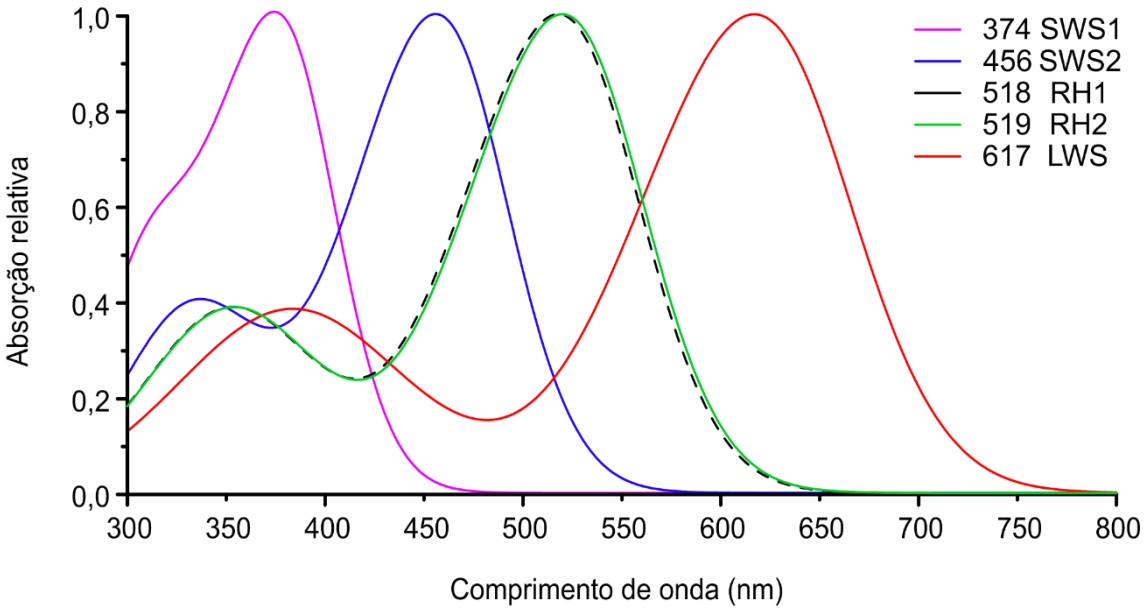


Figura 25 - Curvas de absorção espectral para os cinco grupos de opsinas de *T. s. elegans*. A linha vermelha indica a curva de absorção espectral do grupo LWS (λ_{max} = 617 nm). A linha verde indica a curva de absorção espectral do grupo RH2 (λ_{max} = 520 nm). A linha preta tracejada representa a curva de absorção espectral do grupo RH1 (λ_{max} = 518 nm). A linha azul indica a curva de absorção espectral do grupo SWS2 (λ_{max} = 456 nm). A linha lilás indica a curva de absorção espectral do grupo SWS1 (λ_{max} = 374 nm). Todos os valores estimados foram corrigidos de acordo com o ajuste quadrático. As curvas de absorção espectral foram estimadas com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (Govardovskii *et al*., 2000). Nanômetro (nm).

5.3.1. Grupo SWS1

Treze resíduos apresentam importância para a sensibilidade espectral da opsina SWS1 de vertebrados (**Tabela 7**). O sequenciamento da opsina SWS1 de *T. s. elegans* evidenciou a presença do aminoácido Fenilalanina no posição 86 (**Tabela 7**) o que confere ao fotopigmento da espécie a absorção espectral na faixa do UV com λ_{max} em aproximadamente 360 nm (Cowing *et al*., 2002). Além do F86, foram identificadas quatro substituições, T52V, T93M, V109A e M116L (**Tabela 7**). A substituição V109A é responsável por causar um deslocamento hipsocrômico de 2 nm (Yokoyama *et al*., 2016). O efeito ocasionado pelas demais substituições ainda não foi descrito pela literatura. Assim, considerou-se que o λ_{max} da opsina SWS1 da tartaruga *T. s. elegans* ocorra na faixa do UV, com λ_{max} em ~358 nm. Este valor foi corrigido para ~374,02 nm (**Tabela 7**; **Figura 26**).

Tabela 7 - Descrição e comparação dos aminoácidos encontrados nas posições críticas na sequência ancestral da opsina SWS1 dos vertebrados e da opsina SWS1 de *T. s. elegans*.

Opsina	Posição	Ref	AA Referência		*Trachemys scripta elegans*				
			AA	λmax (nm)	AA	Δλmax (nm)	Ref	A1 λmax (nm)	A2 λmax (nm)
SWS1	46	[1];[2];[3]	F	360	F	-	-	358	374,023
	49	[1];[2];[3]	F		F	-	-		
	52	[1];[2];[3]	T		V	?	-		
	86	[1];[2];[3]	F		F	-	-		
	90	[1];[2];[3]	S		S	-	-		
	91	[3]	V		V	-	-		
	93	[1];[2];[3]	T		M	?	-		
	97	[3];[4]	S		S	-	-		
	109	[3]	V		A	-2	[5]		
	113	[3];[4]	E		E	-	-		
	114	[1];[2];[3]	A		A	-	-		
	116	[3];[4]	M		L	?	-		
	118	[1];[2];[3]	S		S	-	-		

Nota: Estão destacadas em cinza as substituições cuja interferência não apresenta descrição na literatura, indicada, também, pelo ponto de interrogação (?). Vitamina A1 (Retinal). Vitamina A2 (3,4-dehidroretinal). A numeração dos resíduos ocorreu com base na numeração da sequência da rodopsina bovina. [1] Davies *et al*. (2007); [2] Yokoyama (2000); [3] Miyazaki *et al*. (2017); [4] Yokoyama *et al*. (2006); [5] Yokoyama *et al*. (2016). Δλmax = Deslocamento. AA = Aminoácidos. Ref. = Referência bibliográfica. nm = nanômetro.

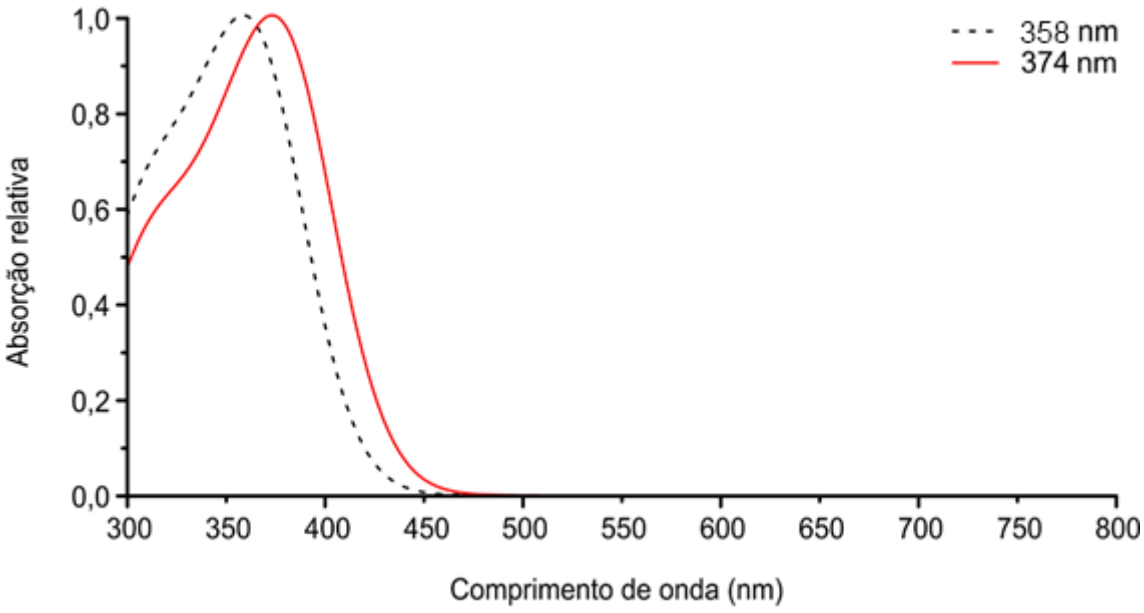


Figura 26 - Curva de absorção espectral obtida para o pigmento visual SWS1 da espécie *Trachemys scripta elegans* a partir de aminoácidos localizados em posições críticas para o deslocamento espectral. A presença do aminoácido Fenilalanina na posição 86 permite estimar o λ_{max} na faixa do UV com λ_{max} em 358 nm (linha preta tracejada). A aplicação da relação polinomial proposta pelo presente trabalho para a correção da banda de absorção espectral em função da utilização do 3,4-dehidroretinal como cromóforo, resultou em um λ_{max} em ~375 nm (linha vermelha contínua). As curvas de absorção espectral foram estimadas com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (Govardovskii *et al*., 2000). nm = nanômetro.

5.3.2. Grupo SWS2

Vinte e um aminoácidos (**Tabela 8**) são descritos pela literatura como responsáveis por influenciar na absorção espectral da opsina SWS2 de vertebrados. Substituições nestes aminoácidos podem gerar na opsina um λ_{max} entre 400 e 470 nm (Davies *et al*., 2007; Yokoyama, 2008; Yokoyama & Tada, 2003). A comparação destes aminoácidos com a sequência obtida a partir da opsina SWS2 da tartaruga *T. s. elegans* revelou a presença das substituições F46L, F52V, S91T, M99S, H100Q, T116A, F159L, A164G, A166V, T169A e T217S, sendo que apenas as substituições F46L e F52V apresentam interferência conhecida sobre o λ_{max} desta opsina, contribuindo com o deslocamento batocrômico de 6 e 1 nm, respectivamente (Yokoyama *et al*., 2007; Yokoyama & Tada, 2003). Portanto, o λ_{max} do fotopigmento SWS2 de *T. s. elegans* foi estimado em 447 nm. Este valor foi corrigido para ~455,68 nm a partir da curva de calibração do sistema rodopsina/porfiropsina (**Tabela 8**; **Figura 27**). Entretanto, é importante ressaltar que as substituições identificadas nos outros 9 resíduos também podem apresentar alguma contribuição desconhecida sobre o λ_{max} da opsina.

Tabela 8 - Descrição e comparação dos aminoácidos encontrados nas posições críticas da opsina SWS2 ancestral dos vertebrados e da opsina SWS2 de *T. s. elegans*.

Opsina	Posição	Ref	AA Referência		*Trachemys scripta elegans*				
			AA	λmax (nm)	AA	Δλmax (nm)	Ref	A1 λmax (nm)	A2 λmax (nm)
SWS2	46	[1];[2];[3]	F	440	L	6	[6]	447	455,677
	48	[4]	I		I	0	-		
	49	[1];[2];[3]	V		V	0	-		
	52	[1];[2];[3]	F		V	1	[7]		
	91	[2]	S		T	?	-		
	93	[1];[2];[3]	T		T	0	-		
	94	[2]	A		A	0	-		
	99	[4]	M		S	?	-		
	100	[4]	H		Q	?	-		
	116	[5]	T		A	?	-		
	122	[2]	M		M	0	-		
	151	[4]	T		T	0	-		
	159	[4]	F		L	?	-		
	164	[1];[2];[3]	A		G	?	-		
	166	[4]	A		V	?	-		
	169	[4]	T		A	?	-		
	207	[1];[2];[3]	L		L	0	-		
	217	[4]	T		S	?	-		
	269	[1];[2];[3]	A		A	0	-		
	292	[2]	S		S	0	-		
	304	[4]	V		V	0	-		

Nota: Estão destacadas em cinza as substituições cuja interferência não apresenta descrição na literatura, indicada, também, pelo ponto de interrogação (?). Vitamina A1 (Retinal). Vitamina A2 (3,4-dehidroretinal). Estão destacadas em cinza as substituições cuja interferência não apresenta descrição na literatura. A numeração dos resíduos ocorreu com base na numeração da sequência da rodopsina bovina. [1] Yokoyama (2008); [2] Davies *et al*. (2007); [3] Miyazaki *et al*. (2017); [4] Bloch *et al*. (2015); [5] Coyle *et al*. (2012); [6] Yokoyama *et al*. (2007); [7] Yokoyama & Tada (2003). Δλmax = Deslocamento. AA = Aminoácidos. Ref = Referência bibliográfica. nm = nanômetro.

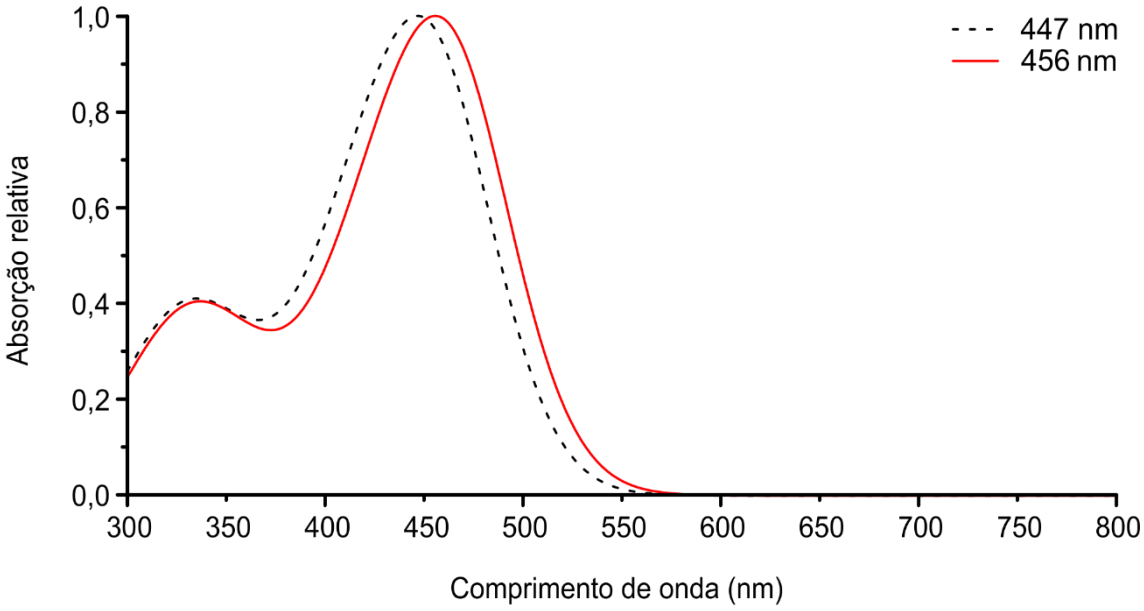


Figura 27 - Curva de absorção espectral obtida para o pigmento visual SWS2 de *Trachemys scripta elegans* a partir de aminoácidos localizados em posições críticas para o deslocamento espectral. Foram identificadas as substituições F46L, F52V, S91T, M99S, H100Q, T116A, F159L, A164G, A166V, T169A e T217S sendo que apenas dois eventos de substituições apresentaram influência conhecida sobre o λ_{max} da espécie. As substituições F46L e F52V contribuem com o deslocamento espectral batocrômico de 6 e 1nm, respectivamente (Yokoyama *et al*., 2007; Yokoyama & Tada, 2003). Assim, o λ_{max} da opsina SWS2 foi estimado, primeiramente, em 447 nm (linha preta tracejada). Entretanto, a aplicação da relação polinomial resultou em um λ_{max} em ~456 nm (linha vermelha contínua). As curvas de absorção espectral foram estimadas com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (2000). nm = nanômetro.

5.3.3. Grupo RH1

Para o fotopigmento RH1, a literatura cita onze resíduos considerados críticos para o ajuste λ_{max} (**Tabela 9**). A comparação dos aminoácidos presentes nestas posições em *T. s. elegans*, com aminoácidos de referência, mostrou a presença de duas substituições D83N e M183L, sendo cada uma delas responsável pelo deslocamento hipsocrômico correspondente a 2 nm (**Tabela 9**) (Zhao *et al*., 2009). Portanto, o λ_{max} estimado para a rodopsina RH1 de *T. s. elegans*, considerando a interferência ocasionada pelas substituições mencionadas, foi estimado em ~496 nm. A correção deste valor em função do cromóforo nativo, derivado da vitamina A2 gerou um λ_{max} estimado em ~517,75 nm (**Tabela 9**; **Figura 28**).

Tabela 9 - Descrição dos aminoácidos encontrados nas posições críticas da opsina RH1 ancestral dos vertebrados e da tartaruga *T. s. elegans*.

Opsina	Posição	Ref	AA Referência		*Trachemys scripta elegans*				
			AA	λmax (nm)	AA	Δλmax (nm)	Ref	A1 λmax (nm)	A2 λmax (nm)
RH1	83	[1];[2];[3]	D	500	N	-2	[4]	496	517,746
	96	[1];[2];[3]	Y		Y	0	-		
	102	[1];[2];[3]	Y		Y	0	-		
	122	[1];[2];[3]	E		E	0	-		
	183	[1];[2];[3]	M		L	-2	[4]		
	253	[1];[2];[3]	M		M	0	-		
	261	[1];[2];[3]	F		F	0	-		
	289	[1];[2];[3]	T		T	0	-		
	292	[1];[2];[3]	A		A	0	-		
	299	[1];[2];[3]	A		A	0	-		
	317	[1];[2];[3]	M		M	0	-		

Nota: Numeração com base na sequência da rodopsina bovina. [1] Yokoyama (2008); [2] Hunt *et al.* (2001); [3] Levenson *et al.* (2006); [4] Zhao *et al.* (2009). Δλmax = Deslocamento. AA = Aminoácidos. Ref. = Referência bibliográfica. nm = nanômetro.

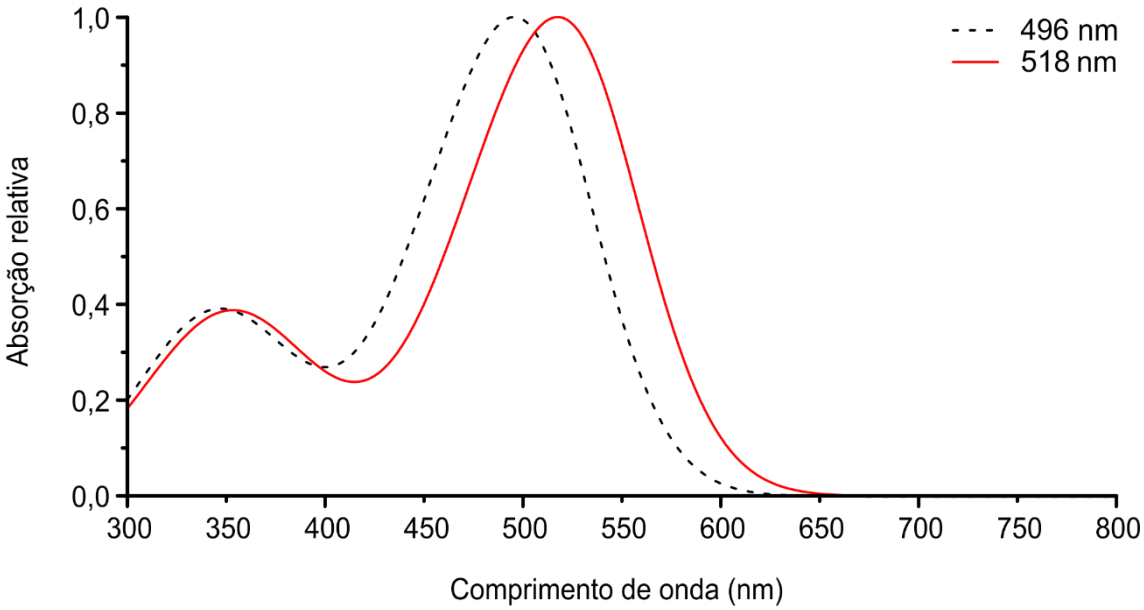


Figura 28 - Curva de absorção espectral obtida para o fotopigmento RH1 da espécie *T. s. elegans* a partir de aminoácidos localizados em posições críticas para o deslocamento espectral. Dentre os treze resíduos analisados foram identificadas as substituições D83N e M183L responsáveis por contribuir, cada uma, com o deslocamento hipsocrômico de 2 nm (Zhao *et al.*, 2009). Deste modo, o λ_{max} da opsina RH1 foi estimado, primeiramente, em 496 nm (linha preta tracejada). Entretanto, a aplicação da relação para a correção da banda de absorção espectral em função da utilização do 3,4-dehidroretinal como cromóforo, resultou em um λ_{max} de ~518 nm (linha vermelha contínua). As curvas de absorção espectral foram estimadas com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (2000). nm = nanômetro.

5.3.4. Grupo RH2

A análise da sequência ancestral do gene *rh2* dos vertebrados (Takenaka & Yokoyama, 2007) identificou a presença dos aminoácidos F49, L52, D83, M86, T97,

Q122 e A164, responsáveis por gerar um λ_{max} em 497 nm (Chan *et al*., 1992; Kawamura & Yokoyama, 1998; Takenaka & Yokoyama, 2007). A comparação desta sequência com os aminoácidos encontrados na tartaruga *T. s. elegans* não identificou a presença de nenhuma substituição (**Tabela 10**). Assim, o λ_{max} estimado para o fotopigmento RH2 da tartaruga *T. s. elegans* seria de ~497 nm. Considerando a presença do cromóforo nativo da espécie, a molécula 3,4-dehidroretinal, o valor de λ_{max} obtido foi corrigido para ~519,14 nm (**Tabela 10**; **Figura 29**).

Tabela 10 - Descrição dos aminoácidos encontrados nas posições críticas da opsina RH2 ancestral dos vertebrados e da tartaruga *T. s. elegans*.

Opsina	Posição	Ref	Sequência Ancestral		*Trachemys scripta elegans*				
			AA	λmax (nm)	AA	Δλmax (nm)	Ref	A1 λmax (nm)	A2 λmax (nm)
RH2	49	[1]	F	497	F	0	-	497	519,140
	52	[1]	L		L	0	-		
	83	[1]	D		D	0	-		
	86	[1]	M		M	0	-		
	97	[1]	T		T	0	-		
	122	[1]; [2]	Q		Q	0	-		
	164	[1]	A		A	0	-		

Nota: Numeração com base na sequência da rodopsina bovina. [1] Takenaka & Yokoyama (2007); [2] Chinen *et al*. (2005). Δλmax = Deslocamento. AA = Aminoácidos. Ref. = Referência bibliográfica. nm = nanômetro.

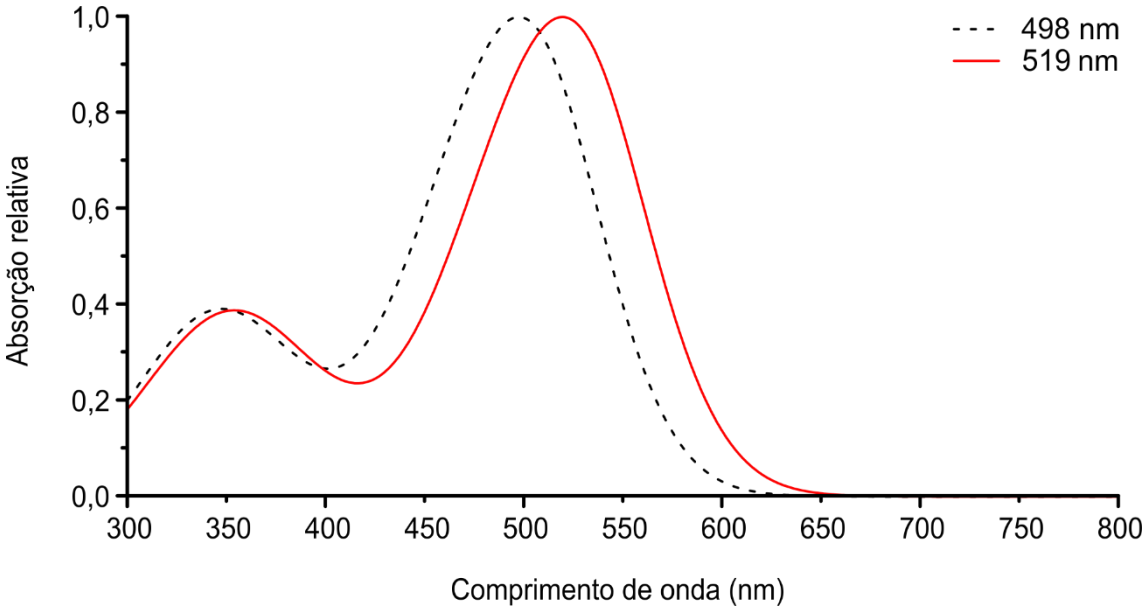


Figura 29 - Curva de absorção espectral obtida para o pigmento visual RH2 da tartaruga *T. s. elegans* a partir de aminoácidos localizados em posições críticas para o deslocamento espectral. Considerando o deslocamento hipsocrômico de 13 nm ocasionado pela substituição E122Q, o λ_{max} deste pigmento pode ser estimado em 498 nm (linha tracejada). O valor de λ_{max} da opsina RH2 corrigido pela curva de calibração resultou em um λ_{max} de ~520 nm (linha contínua). As curvas de absorção espectral foram estimadas com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (2000). nm = nanômetro.

5.3.5. Grupo LWS

A literatura descreve cinco posições críticas responsáveis por interferir no λ_{max} do pigmento visual LWS dos vertebrados (**Tabela 11**) (Yokoyama & Radlwimmer, 1999). A análise da sequência de aminoácidos do fotopigmento LWS da tartaruga *T. s. elegans* identificou os aminoácidos S164, H181, Y261, T269 e A262, que gera um λ_{max} em 560 nm. Este valor, corrigido pela curva de calibração gera um λ_{max} em ~617,12 nm (**Tabela 11**; **Figura 30**).

Tabela 11 - Descrição dos aminoácidos encontrados nas posições críticas da opsina LWS ancestral dos vertebrados e da tartaruga *T. s. elegans*.

Opsina	Posição	Ref	AA Referência		*Trachemys scripta elegans*				
			AA	λmax (nm)	AA	Δλmax (nm)	Ref	A1 λmax (nm)	A2 λmax (nm)
LWS	164	[1];[2]	S	560	S	0	-	560	617,122
	181	[1];[2]	H		H	0	-		
	261	[1];[2]	Y		Y	0	-		
	269	[1];[2]	T		T	0	-		
	292	[1];[2]	A		A	0	-		

Nota: Numeração com base na sequência da rodopsina bovina. [1] Yokoyama (2008); [2] Yokoyama & Radlwimmer (1999). Δλmax = Deslocamento. nm = nanômetro.

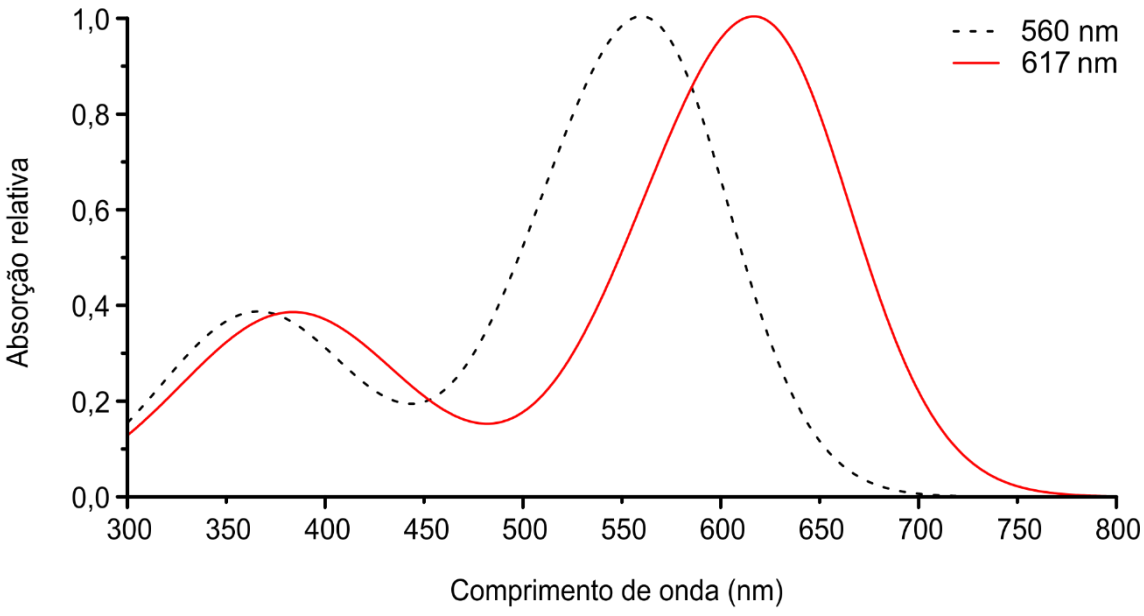


Figura 30 - Curva de absorção espectral obtida para o pigmento visual LWS da espécie *T. s. elegans* a partir de aminoácidos localizados em posições críticas para o deslocamento espectral. A curva apresenta seu λ_{max} em 560 nm, correspondendo ao perfil SHYTA observado nos resíduos 164, 181, 261, 269 e 292 (linha preta tracejada). A submissão deste valor ao parâmetro de correção proposto pelo presente trabalho nos permitiu corrigir o valor do λ_{max} da opsina LWS considerando a influência da molécula 3,4-dehidroretinal como cromóforo. A correção resultou em um λ_{max} em ~617 nm (linha vermelha contínua). As curvas de absorção espectral foram estimadas com base no *template* proposto por Govardowski (Govardovskii *et al*., 2000). nm = nanômetro.

5.4. Modelagem Computacional

5.4.1. Caracterização Estrutural dos Modelos de Opsinas de *T. s. elegans*

A partir da identificação da sequência de aminoácidos das opsinas visuais da tartaruga-de-orelha-vermelha, foram construídos modelos computacionais para todas as classes de fotopigmentos. Todos os modelos apresentaram boa avaliação estrutural, com restrição nas posições de poucos aminoácidos o que indica um alto grau de conservação da estrutura terciária das proteínas, e o estudo teórico do espectro de absorção espectral realizado para cada um destes fotopigmentos tem se mostrado promissor.

As opsinas SWS1, SWS2 e RH1 apresentaram boa avaliação com indicação de restrição na posição de poucos aminoácidos. Para a opsina SWS1, as análises indicaram restrição apenas na posição dos aminoácidos I219, S222, Y223, S224 e V300, como apresentado na **Figura 31 A**. A estrutura obtida para a opsina SWS2 também apresentou boa qualidade estrutural, com restrições na posição dos aminoácidos S240, R286, P291, F294 e S295, como demonstrado na **Figura 31 B**. Para o modelo da rodopsina, apenas os aminoácidos P142, M143, S144 e N145 apresentaram má conformação espacial (**Figura 31 C**). No caso das opsinas RH2 e LWS observou-se uma diminuição na qualidade estrutural. Para a opsina RH2, foram identificadas restrições na posição de 10 aminoácidos: K36, I39, V40, F45, F46, F294, S299 e L300 (**Figura 31 D**). Já a opsina LWS apresentou uma pequena diminuição na qualidade estrutural de seu modelo, ao apresentar diversos aminoácidos com *score* negativo (**Figura 31 E**).

A qualidade estereoquímica dos modelos também foi avaliada com o auxílio do diagrama de Ramachandran (servidor *PROCHECK*). De modo geral, todas as estruturas construídas apresentaram boas avaliações, com > 90% dos aminoácidos dispostos em regiões altamente favoráveis. Os resultados desta análise mostraram que a disposição dos ângulos diedros assumidos pelas ligações dos aminoácidos correspondem ao que seria esperado para uma estrutura proteica organizada em α-hélice. Os diagramas apresentados na **Figura 32 A – E**, demonstram esta disposição favorável ao indicar uma nítida tendência de os aminoácidos se agruparem nas regiões mais favoráveis do diagrama (regiões A, B e L – sinalizadas em vermelho) em todos os modelos computacionais desenvolvidos. Importante citar que os aminoácidos F143, na opsina SWS1, e K64, na opsina SWS2, que apresentaram impedimentos estéricos estando presentes em regiões desfavoráveis do diagrama de Ramachandran, não fazem parte do sítio ativo da proteína, estando presentes, em ambos os casos, nas regiões das alças.

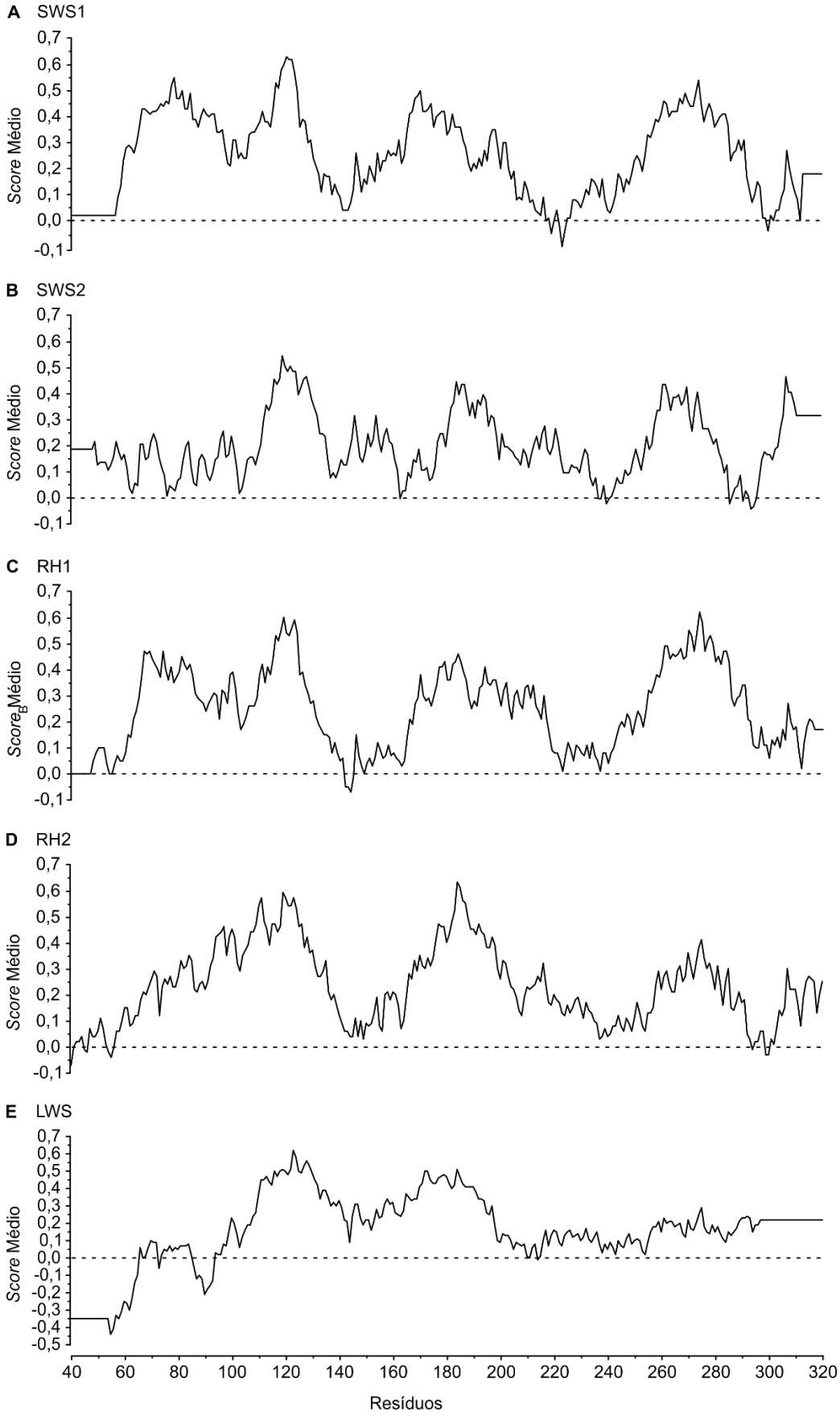


Figura 31 - Resultado da análise dos modelos computacionais das opsinas expressas pela tartaruga *T. s. elegans* realizada pelo servidor *Verify3D*. Os modelos SWS1, SWS2 e RH1 apresentaram boa qualidade estrutural, com restrições à posição de poucos aminoácidos. Os modelos RH2 e LWS, apresentaram qualidade estrutural mais baixa, com restrições em vários aminoácidos. Na figura, os aminoácidos com restrições podem ser observados abaixo da linha tracejada.

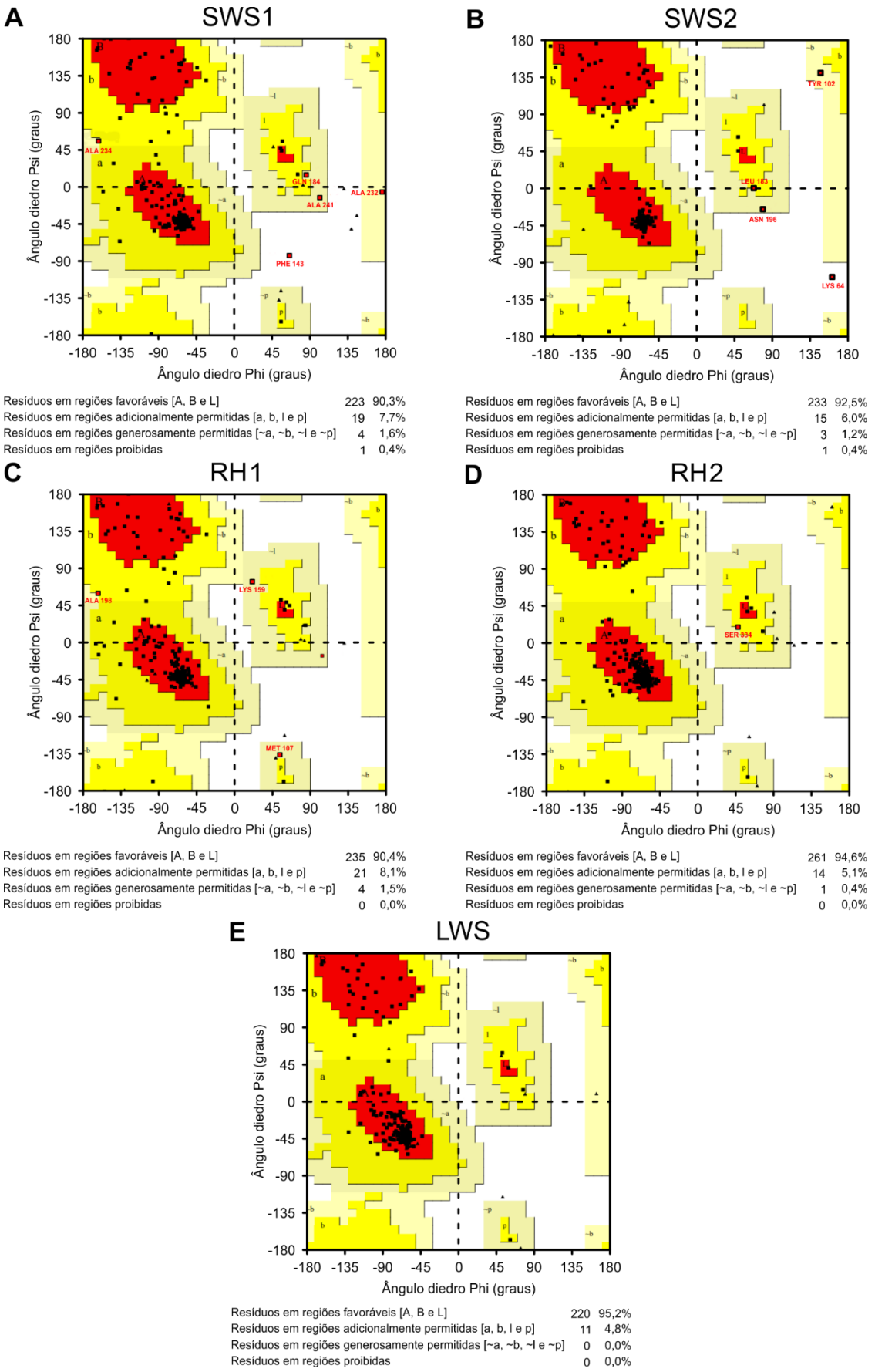


Figura 32 - Diagramas de Ramachandran obtidos para os modelos computacionais das opsinas expressas pela tartaruga *T. s. elegans*, com o auxílio do servidor PROCHECK. Os diagramas foram construídos baseando-se na posição de resíduos de 118 estruturas com resolução de, pelo menos, 2 Å. Os modelos apresentaram boa qualidade estrutural uma vez que todos apresentaram mais de 90% dos resíduos em regiões favoráveis do diagrama (regiões vermelhas). Os aminoácidos destacados em vermelho indicam aminoácidos de referência.

Os modelos computacionais desenvolvidos para cada opsinas de *T. s. elegans* foram, de modo geral, similares à estrutura da rodopsina bovina, apresentando sobreposição quase completa das estruturas terciárias. Além da construção da estrutura proteica, foram realizados estudos de docagem molecular, responsáveis por verificar a melhor posição para o posicionamento do 11-cis-3,4-dehidroretinal (nº acesso no PubChem: 5280867) na região de interação da proteína. As análises geraram, para cada uma das opsinas, diferentes conformações mais estáveis, sendo selecionada aquela com menor energia livre de interação. A posição do retinal na estrutura cristalina da rodopsina bovina foi utilizada como parâmetro de comparação.

Caracterização estrutural da opsina SWS1

O modelo computacional da opsina SWS1 apresentou boa avalição estrutural em ambos os servidores utilizados para análise, com 90,3% dos aminoácidos em regiões altamente favoráveis, segundo o diagrama de Ramachandran (**Figura 32 A**). Sua estrutura apresentou boa similaridade com a estrutura da rodopsina bovina, com sobreposição quase completa das estruturas terciárias (**Figura 33 A**). Os estudos de docagem molecular foram capazes de gerar 11 conformações mais estáveis para o cromóforo, sendo selecionada aquela de menor energia (-10,3 kcal/mol). A **Figura 33 B** demonstra a posição obtida para o 3,4-dehidroretinal em relação à posição do retinal na estrutura da rodopsina bovina.

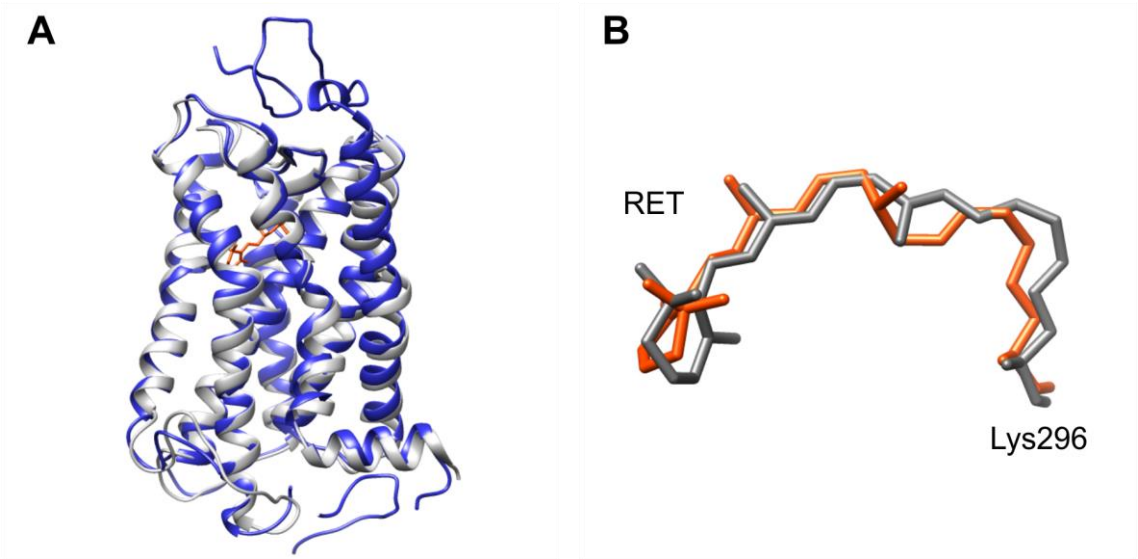


Figura 33 - **(A)** Estrutura computacional da opsina SWS1 da tartaruga *T. s. elegans*. O modelo construído a partir da técnica de *Threading* (cinza) apresentou grande similaridade com a estrutura cristalina da rodopsina bovina (azul), com ambas as estruturas se sobrepondo em diversas regiões. O cromóforo está representado em laranja **(B)** A posição da vitamina A2 + K296 (laranja), determinada por meio do processo de *docking*, foi coerente com a posição do retinal + K296 (cinza) na estrutura da rodopsina bovina. RET = Retinal.

No que se refere à rede de interações não ligadas estabelecidas entre o complexo A_2+K296 e a proteína, foram observadas quatro ligações hidrogênio envolvendo a lisina no sítio 296. Destas, duas são ligações hidrogênio convencionais estabelecidas com a fenilalanina do sítio 293 (2,3 Å) e com o resíduo alanina no sítio 292 (3,0 Å). As outras duas configuram-se como ligações de carbono-hidrogênio e se formam com o resíduo S186 (2,9 Å) e com o resíduo crítico E113 (2,3 Å). Também pode-se observar a formação de uma ponte salina entre o nitrogênio da Base de Schiff e o resíduo crítico E113 (**Figura 34 A**). Além destas, o cromóforo aparece participando de uma complexa rede de interação pi-sigma e do tipo alquil com diferentes aminoácidos. Interações de van der Waals também são observadas (**Figura 34 B**).

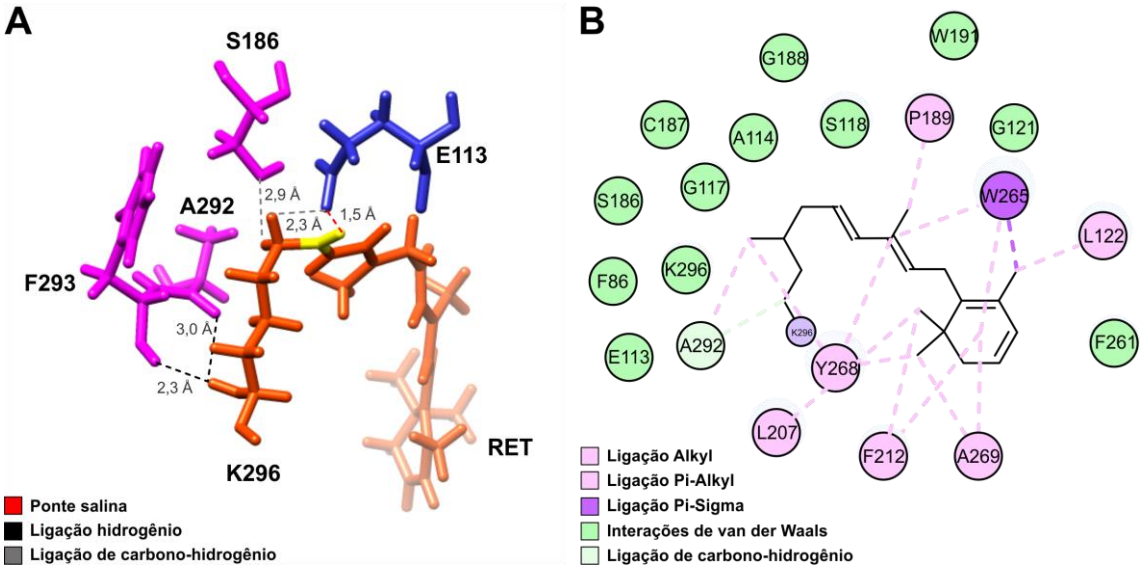


Figura 34 - **(A)** Molécula de 11-cis-4,3-dehidroretinal ligada ao resíduo lisina no sítio 296 da opsina SWS1 de *T. s.* elegans. Detalhe apresentando as ligações convencionais de hidrogênio (linha preta tracejada) estabelecidas entre a K196 e os resíduos F293 (2,3 Å) e A292 (3,0 Å). Observa-se também duas ligações de carbono-hidrogênio (linha cinza tracejada) formada entre a K296 e os resíduos S186 (2,9 Å) e o sítio crítico E113 (2,3 Å). Além destas, o nitrogênio da Base de Schiff (amarelo) interage com o resíduo glicina no sítio 113 (azul) por meio de uma ponte salina (1,5 Å) (linha vermelha tracejada). A estrutura do 3,4-dehidroretinal e da lisina 296 podem ser observados em laranja. **(B)** Rede de interação pi-sigma (linha azul tracejada) e do tipo alquil (linha laranja tracejada) entre o cromóforo e aminoácidos no entorno. RET = Retinal. A = Alanina; E = Glutamato; F = Fenilalanina; K = Lisina; L = Leucina; P = Prolina; S = Serina; T = Treonina; W = Triptofano.

Caracterização estrutural da opsina SWS2

O modelo da opsina SWS2 apresentou boa avaliação estereoquímica, com 92,5% dos aminoácidos dispostos em regiões altamente favoráveis, de acordo com o diagrama de Ramachandran (**Figura 32 B**). Este modelo apresentou um alto grau de similaridade com a estrutura cristalina da rodopsina bovina, com ambas as estruturas se sobrepondo em diversas regiões (**Figura 35 A**). A docagem molecular gerou 04

conformações mais estáveis, das quais foi selecionada aquela de menor energia (-8,3 kcal/ mol). A **Figura 35 B** demonstra a posição e conformação escolhida em relação a referência utilizada (rodopsina bovina).

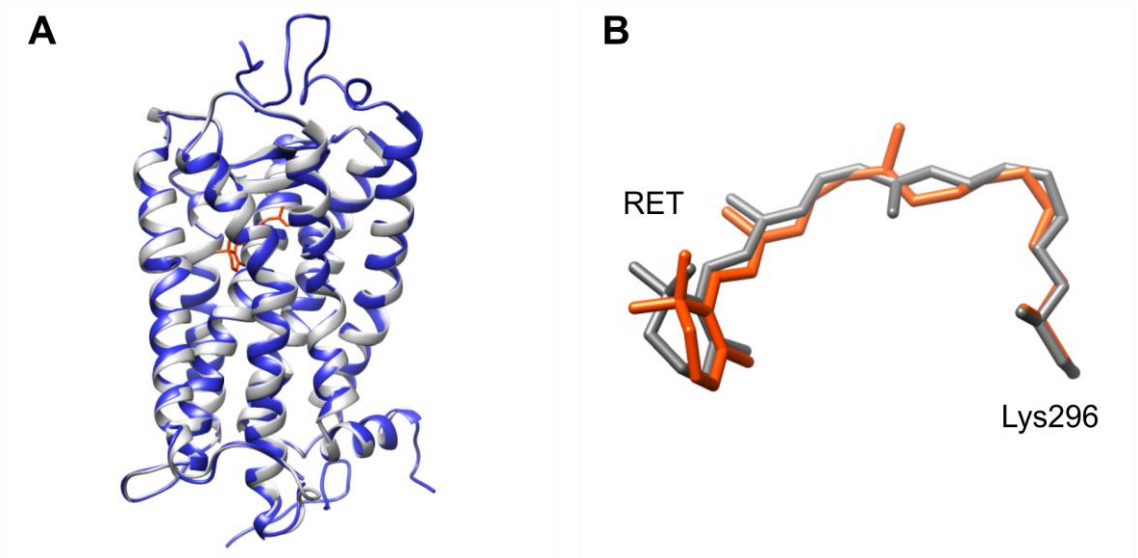


Figura 35 - (A) Estrutura computacional da opsina SWS2 da tartaruga *T. s. elegans*. O modelo construído a partir da técnica de *Threading* (cinza) apresentou grande similaridade com a estrutura cristalina da rodopsina bovina (azul), com ambas as estruturas se sobrepondo em diversas regiões. O cromóforo aparece, na figura, destacado em laranja **(B)** A posição da vitamina A2 + K296 (Lys, laranja), determinada por meio do processo de *docking*, foi coerente com a posição do retinal + K296 (cinza) na estrutura da rodopsina bovina. RET = Retinal.

A partir da avaliação da rede de interações não ligadas estabelecidas entre o complexo A_2+K296 e a proteína SWS2 foi identificada a existência de três ligações convencionais de hidrogênio estabelecidas entre o resíduo lisina no sítio 296 e aminoácidos do entorno. Duas destas ligações, de 1,9 e 1,8 Å, foram estabelecidas com o resíduo treonina no sítio 299. Uma terceira ligação, com 2,4 Å de comprimento, foi estabelecida com o resíduo valina no sítio 293. Além destas, observou-se a formação de uma ligação de carbono-hidrogênio formada com o resíduo glutamato no sítio 113 (**Figura 36 A**). Para a opsina SWS2, não foram observadas ligações hidrogênio estabelecidas entre o complexo A_2+K296 e qualquer um dos sítios críticos. O cromóforo aparece participando de uma complexa rede de interação do tipo alquil com diferentes aminoácidos (**Figura 36 B**).

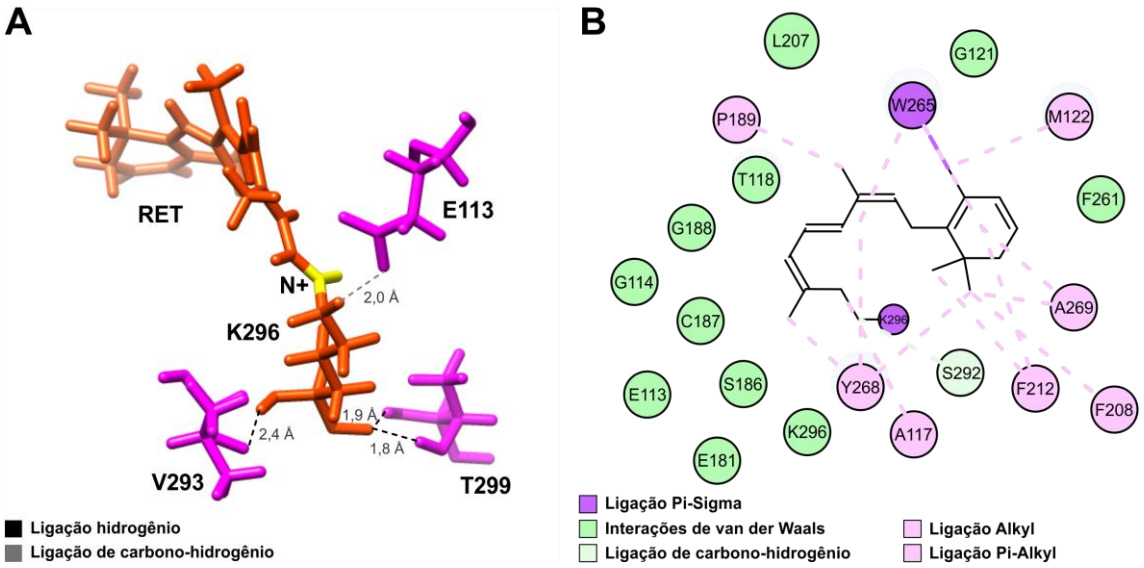


Figura 36 – **(A)** Molécula de 11-cis-3,4-dehidroretinal ligada ao resíduo lisina no sítio 296 da opsina SWS2 de *T. s.* elegans. Detalhe apresentando as ligações convencionais de hidrogênio (linha tracejada preta) estabelecidas entre o resíduo K296 e os aminoácidos T299 (1,9 e 1,8 Å) e V293 (2,4 Å). Também pode-se observar uma ligação de carbono-hidrogênio (linha cinza tracejada) formada entre os resíduos K296 e E113 (2,0 Å). A estrutura do 3,4-dehidroretinal e do resíduo lisina 296 podem ser observados em laranja. O nitrogênio da Base de Schiff está destacado em amarelo. **(B)** Rede de interação do tipo alquil (linha laranja tracejada) estabelecida entre o cromóforo e aminoácidos no entorno. RET = Retinal. A = Alanina; E = Glutamato; F = Fenilalanina; K = Lisina; M = Metionina; P = Prolina; T = Treonina; V = Valina; W = Triptofano; Y = Tirosina.

Caracterização estrutural da rodopsina RH1

A estrutura tridimensional da rodopsina RH1 foi elaborada a partir da estrutura da rodopsina bovina, utilizada como molde. Os métodos de validação da estrutura constataram boa qualidade estrutural, com 90,4% dos aminoácidos presentes em regiões altamente favoráveis, segundo o diagrama de Ramachandran (**Figura 32 C**). A estrutura do modelo elaborado e do molde apresentaram ~85% de sobreposição das suas estruturas terciárias (**Figura 37 A**). Os estudos de *docking* molecular foram capazes de determinar 5 posições mais estáveis para o cromóforo, sendo selecionada a conformação de menor energia (-9,9 kcal/ mol). A **Figura 37 B** demonstra a posição e conformação escolhida em relação à posição do retinal na estrutura cristalina da rodopsina bovina.

A avaliação da rede de interações não ligadas estabelecidas entre o complexo A_2+K296 e o restante da proteína indicou a existência de três ligações convencionais de hidrogênio estabelecidas com o resíduo crítico A299 (2,7 Å) e outras duas com os resíduos A295 (2,1 Å) e F293 (2,4 Å). Uma quarta ligação convencional de hidrogênio foi observada entre o nitrogênio da base de Schiff e o resíduo E113 (2,5 Å) (**Figura 38 A**). Nota-se também a presença de outras três ligações de carbono-hidrogênio envolvendo o resíduo K296: uma primeira formada com o aminoácido E113 (2,5 Å),

outra formada com o resíduo S186 (2,7 Å) e uma última estabelecida com o resíduo A292 (2,9 Å), sendo este último um sítio espectral, além de uma interação π-alquil estabelecida com o resíduo F91 (4,3 Å) (**Figura 38 A**). O cromóforo aparece participando de uma complexa rede de interação do tipo alquil com diferentes aminoácidos (**Figura 38 B**).

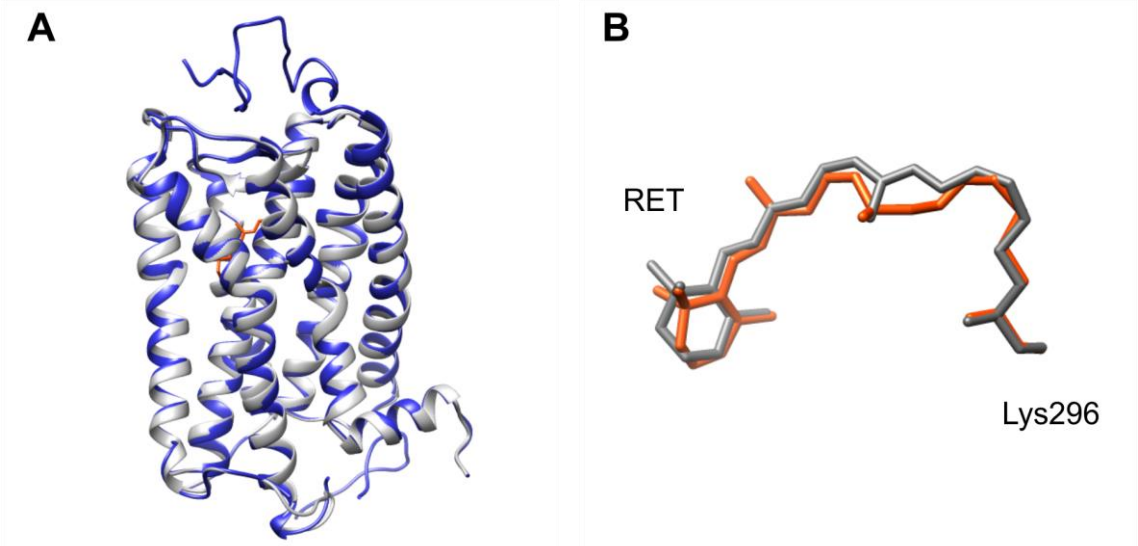


Figura 37 - **(A)** Estrutura computacional da rodopsina da tartaruga *T. s. elegans*. O modelo construído a partir da Modelagem Comparativa (cinza) apresentou ~85% de identidade de sequência com a estrutura da rodopsina bovina utilizada como molde (azul), com ambas as estruturas se sobrepondo em diversas regiões. O cromóforo aparece destacado em laranja **(B)** A posição da vitamina A2 + K296 (Lys, laranja), determinada por meio do processo de *docking*, foi coerente com a posição do retinal + K296 (cinza) na estrutura da rodopsina bovina. RET = Retinal.

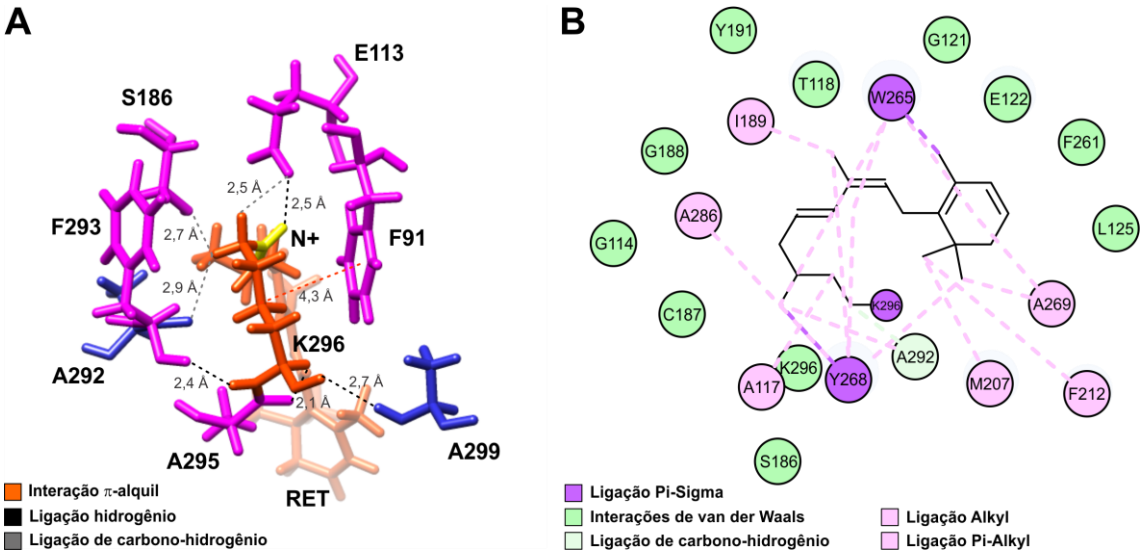


Figura 38 - **(A)** Molécula de 11-cis-3,4-dehidroretinal ligada ao resíduo K296 da rodopsina de *T. s.* elegans. Detalhe apresentando as ligações convencionais de hidrogênio (linha tracejada preta) estabelecidas entre o resíduo K296 e os aminoácidos A299 (2,7 Å), A295 (2,1 Å) e F293 (2,4 Å). O nitrogênio da base de Schiff interage com o resíduo E113 (2,5 Å). Também pode-se observar três ligações

de carbono-hidrogênio (linha cinza tracejada) formada entre K296 e os resíduos E113 (2,5 Å), S186 (2,7 Å) e A292 (2,9 Å). Além destas, observa-se uma ligação π-alquil (4,3 Å) entre K296 e F91 (linha laranja tracejada). A estrutura do 3,4-dehidroretinal e do resíduo K296 podem ser observados em laranja. O nitrogênio da Base de Schiff está destacado em amarelo. **(B)** Rede de interação pi-sigma (linha azul tracejada) e do tipo alquil (linha laranja tracejada) estabelecidas entre o cromóforo e aminoácidos no entorno. RET = Retinal. A = Alanina; E = Glutamato; F = Fenilalanina; I = Isoleucina; K = Lisina; S = Serina; Y = Tirosina.

Caracterização estrutural da opsina RH2

O modelo computacional da opsina RH2 apresentou boa avaliação estrutural em ambos os servidores utilizados para análise, com 94,6 % dos aminoácidos dispostos em regiões altamente favoráveis, segundo o diagrama de Ramachandran (**Figura 32 D**). Sua estrutura foi similar à estrutura da rodopsina bovina, com sobreposição quase completa das estruturas terciárias (**Figura 39 A**). Os estudos de docagem molecular foram capazes de gerar 10 conformações mais estáveis para o cromóforo, sendo selecionada aquela de menor energia (-7,1 kcal/ mol). A **Figura 39 B** demonstra a posição obtida para o 3,4-dehidroretinal em relação à posição do retinal na estrutura da rodopsina bovina.

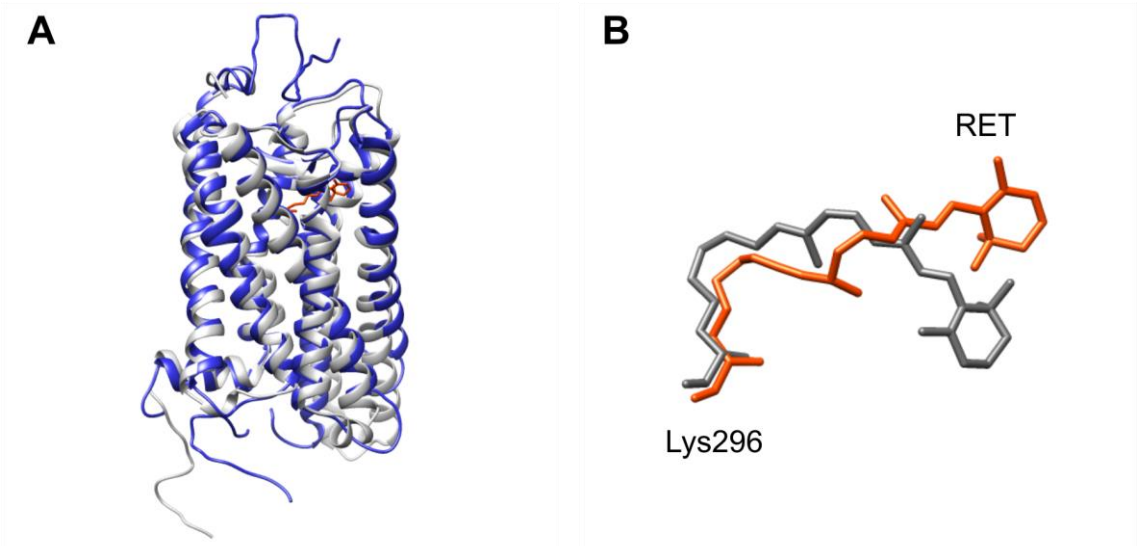


Figura 39 - **(A)** Estrutura computacional da opsina RH2 da tartaruga *T. s. elegans*. O modelo construído a partir do método de modelagem por *Threading* (cinza) foi similar a estrutura da rodopsina bovina (azul), com ambas as estruturas se sobrepondo em diversas regiões. O cromóforo aparece destacado em laranja **(B)** O processo de *docking* molecular posicionou a estrutura do cromóforo apresentando um considerável desvio em relação à posição do retinal no cristal da rodopsina bovina. A posição do complexo A2 + K296 (Lys, laranja), determinada por meio do processo de *docking*, foi relativamente coerente com a posição do complexo retinal + K296 (cinza) na estrutura da rodopsina bovina. RET = Retinal.

A avaliação da rede de interações não ligadas estabelecidas entre o complexo A_2+K296 e a opsina RH2 indicou a existência de quatro ligações convencionais de hidrogênio formadas entre o resíduo K296 e os resíduos S295 (2,5 Å), A292 (2,7 Å) e

S299 (1,9 e 2,0 Å). Também pode-se observar uma ligação de carbono-hidrogênio estabelecida com o resíduo S186 (2,7 Å) e uma interação π-alquil formada com a F91. Além destas, o nitrogênio da base de Schiff aparece interagindo com o resíduo E181 por meio de uma ponte salina (4,0 Å) (**Figura 40 A**). O cromóforo participa de uma complexa rede de interação do tipo alquil com diferentes aminoácidos (**Figura 40 B**).

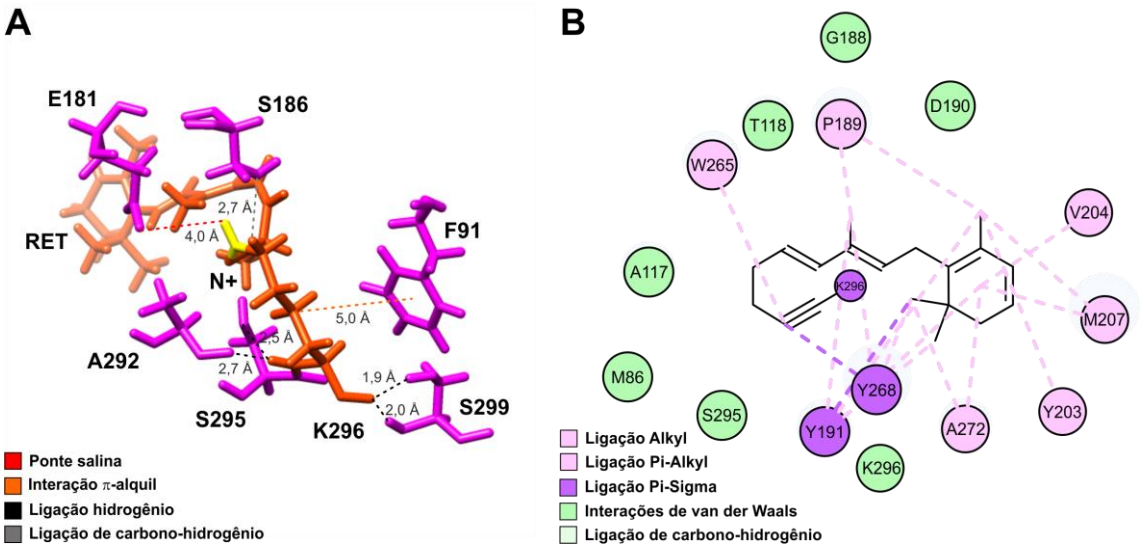


Figura 40 - Molécula de 11-cis-3,4-dehidroretinal ligada ao resíduo lisina no sítio 296 da opsina RH2 de *T. s. elegans*. Detalhe das ligações hidrogênio estabelecidas entre o resíduo K296 e dois aminoácidos no entorno. Destas duas, uma primeira foi formada com o resíduo A292 (2,4 Å), ao passo que a outra aparece formada com o resíduo S299. Os aminoácidos A292 e S299 são indicados em magenta. A estrutura do 3,4-dehidroretinal e do resíduo lisina 296 são observados em laranja. RET = Retinal. A = Alanina; D = Aspartato; E = Glutamato; F = Fenilalanina; K = Lisina; M = Metionina; P = Prolina; S = Serina; W = Triptofano; Y = Tirosina.

Caracterização estrutural da opsina LWS

A estrutura da opsina LWS apresentou boa avaliação segundo o servidor *PROCHECK*, com 95% dos aminoácidos dispostos em regiões altamente favoráveis, segundo o diagrama de Ramachandran (**Figura 32 E**). Sua estrutura foi similar à estrutura cristalina da rodopsina bovina, com sobreposição quase completa das estruturas terciárias (**Figura 41 A**). Os estudos de docagem molecular geraram 20 conformações mais estáveis para o cromóforo, sendo selecionada aquela de menor energia (-8,5 kcal/ mol). A **Figura 41 B** demonstra a posição obtida para o 3,4-dehidroretinal em relação à posição do retinal na estrutura da rodopsina bovina.

A avaliação da rede de interações não ligadas estabelecidas entre o complexo A_2+K296 e a proteína indicou a presença de três ligações convencionais de hidrogênio estabelecidas com aminoácidos do entorno. Das ligações identificadas, duas foram estabelecidas entre o resíduo K296 e T299. Estas ligações apresentaram comprimento

de 2,2 e 2,0 Å. Além destas, o K296 também estabeleceu uma ligação de 2,7 Å, com o resíduo A292 (**Figura 42 A**), um conhecido sítio de deslocamento espectral. O cromóforo participa de uma complexa rede de interação do tipo alquil com diferentes aminoácidos (**Figura 42 B**).

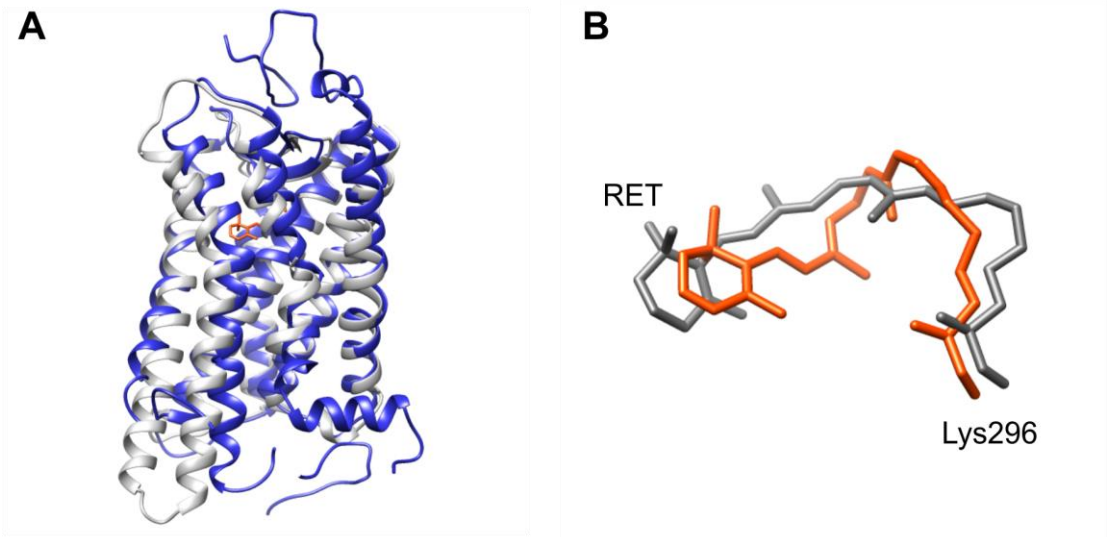


Figura 41 - **(A)** Estrutura computacional da opsina LWS da tartaruga *T. s. elegans*. O modelo construído a partir do método de modelagem por *Threading* (cinza) foi similar a estrutura da rodopsina bovina (azul), com ambas as estruturas se sobrepondo em diversas regiões. O cromóforo aparece destacado em laranja **(B)** O processo de *docking* molecular foi bastante eficiente no posicionamento da estrutura do cromóforo no sítio ativo da proteína. A posição da vitamina A2 + K296 (Lys, laranja), determinada por meio do processo de *docking*, foi coerente com a posição do retinal + K296 (cinza) na estrutura da rodopsina bovina. RET = Retinal.

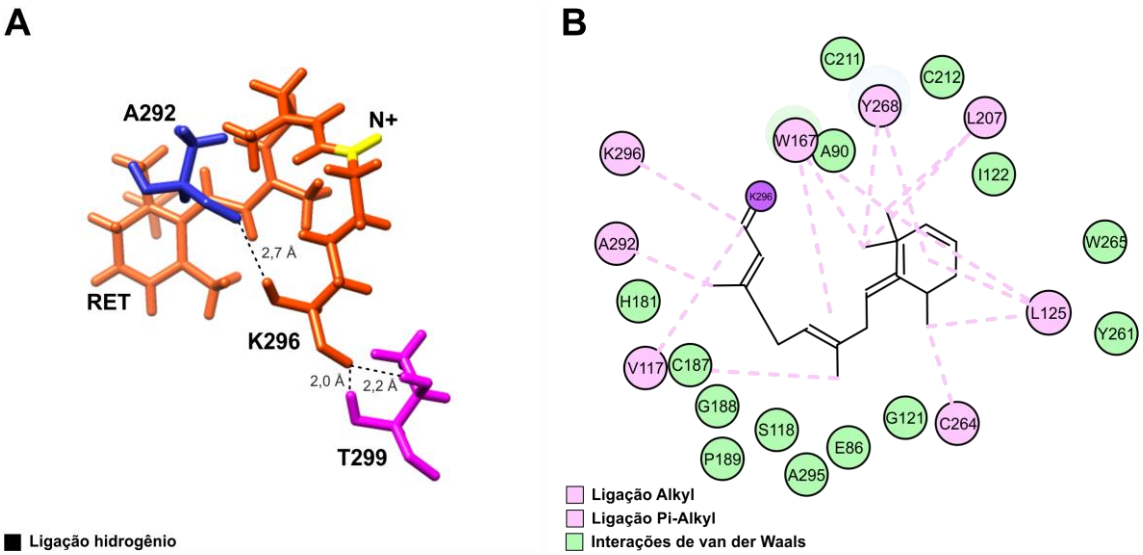


Figura 42 - Molécula de 11-cis-3,4-dehidroretinal ligada ao resíduo K296 da opsina LWS de *T. s. elegans*. Detalhe apresentando as ligações hidrogênio estabelecidas entre K296 e aminoácidos no entorno. Podem ser observadas três ligações sendo duas delas formadas com o resíduo T299 (magenta) e uma última formada com A292 (azul). Em laranja, o 3,4-dehidroretinal e do resíduo K296. RET = Retinal. A = Alanina; C = Cisteina; G = Glicina; H = Histidina; I = Isoleucina; K = Lisina; P = Prolina; T = Treonina; V = Valina; W = Triptofano; Y = Tirosina.

5.4.2. Análise do Espectro de Absorção

A análise do espectro de absorção dos complexos moleculares avaliados resultou na estimativa de valores teóricos de λ_{max} para cada fotopigmento estudado. Os valores estimados *in silico* para as opsinas SWS1, SWS2, RH1, RH2 e LWS expressas por *T. s. elegans* foram 400 nm, 437 nm, 517 nm, 500 nm e 627 nm, respectivamente. As curvas de absorção obtidas para os modelos computacionais desenvolvidos podem ser observadas na **Figura 43**. Subsequentemente, serão apresentados os resultados independentes das análises de cada pigmento visual.

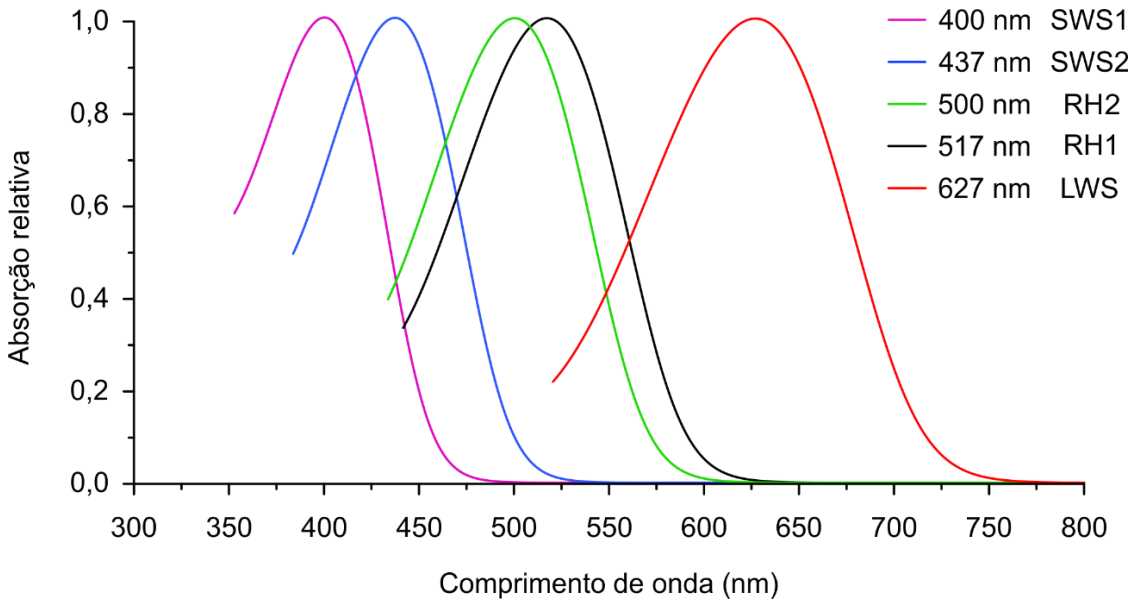


Figura 43 - Curvas de absorção espectral dos modelos computacionais construídos para os cinco grupos de opsinas presentes em *T. s. elegans*. A linha vermelha indica a curva de absorção espectral do grupo LWS (λ_{max} = 627 nm). A linha verde indica a curva de absorção espectral do grupo RH2 (λ_{max} = 500 nm). A linha preta representa a curva de absorção espectral do grupo RH1 (λ_{max} = 517 nm). A linha azul indica a curva de absorção espectral do grupo SWS2 (λ_{max} = 437 nm). A linha lilás indica a curva de absorção espectral do grupo SWS1 (λ_{max} = 400 nm). O λ_{max} de cada modelo foi estimado com o auxílio do *software* ORCA utilizando como base a Teoria do Funcional de Densidade Tempo-Dependente (*Time Dependent Density Functional Theory* - TD-DFT) com funcional de correlação-troca B3LYP e conjunto de base 6-31G para o estudo do estado excitado. nm = nanômetros.

Espectro de absorção do complexo 3,4-dehidroretinal-SWS1

Para o modelo computacional da opsina SWS1, o complexo 3,4-dehidroretinal-SWS1 contou com os aminoácidos dispostos em até 4 Å do cromóforo. A estrutura molecular submetida à análise contou com 16 aminoácidos. A especificação detalhada dos aminoácidos considerados pode ser verificada na **Tabela 12**. A análise do espectro de absorção UV/Visível do complexo estimou o λ_{max} do modelo em 400 nm (**Figura 44**).

Tabela 12 -Aminoácidos presentes no complexo 3,4-dehidroretinal-SWS1 utilizado para a análise do espectro de absorção espectral do modelo computacional da opsina SWS1 de *T. s. elegans*.

Opsina	Posição	Aminoácido	λmax (nm)
SWS1	86*	F	400
	90*	S	
	113*	E	
	117	G	
	118*	S	
	121	G	
	122	L	
	181	E	
	187	C	
	189	P	
	264	C	
	265	W	
	268	Y	
	292	A	
	295	S	
	296	K	

Nota: Numeração dos aminoácidos apresentados com base na rodopsina bovina. Os asteriscos indicam que o resíduo em questão é crítico para a absorção espectral da opsina. λ_{max} = Comprimento de onda máximo. nm = nanômetros. A = Alanina; C = Cisteina; E = Glutamato; F = Fenilalanina; G = Glicina; K = Lisina; L = Leucina; P = Prolina; S = Serina; W = Triptofano; Y = Tirosina.

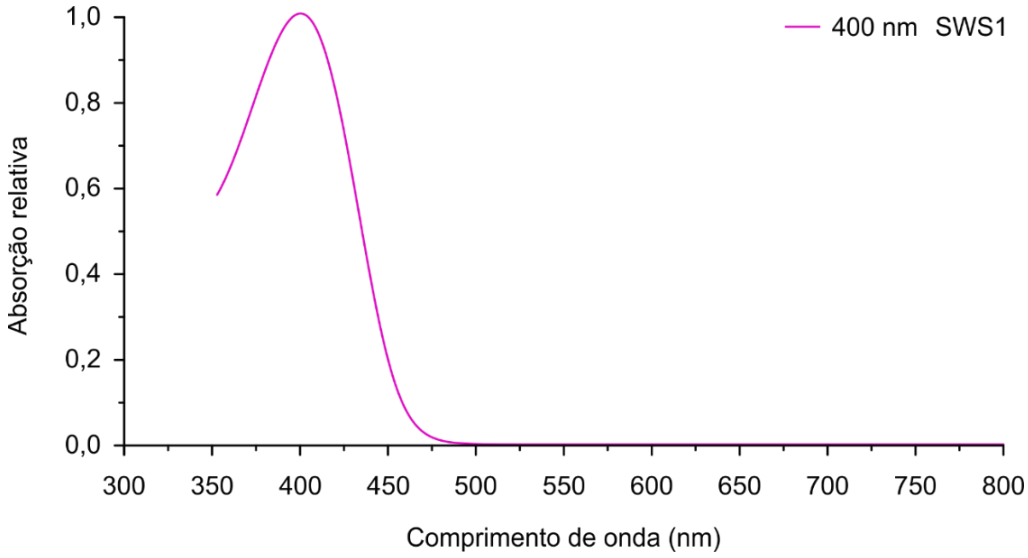


Figura 44 - Curva de absorção espectral obtida para o modelo computacional construído para o pigmento SWS1 de *T. s. elegans* a partir da sequência de aminoácidos do fotopigmento. A avaliação do espectro de absorção foi realizada a partir da interação entre o 11-cis-3,4-dehidroretinal com os aminoácidos imediatamente próximos à molécula (~4 A). O modelo apresentou λ_{max} em 400 nm. Curva de absorção espectral estimada com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (2000). nm = nanômetros.

Espectro de absorção do complexo 3,4-dehidroretinal-SWS2

O espectro de absorção foi estimado a partir da seleção dos aminoácidos imediatamente próximos (~4 Å) do dehidroretinal. O complexo 3,4-dehidroretinal-SWS2 foi composto por 14 aminoácidos indicados na **Tabela 13**. A análise do espectro de absorção UV/Visível desta estrutura estimou o λ_{max} do modelo em 436,96 nm como apresentado pela **Figura 45**.

Tabela 13 - Aminoácidos presentes no complexo 3,4-dehidroretinal-SWS2 utilizado para a análise do espectro de absorção espectral do modelo computacional da opsina SWS2 de *T. s. elegans*.

Opsina	Posição	Aminoácido	λmax (nm)
SWS2	86	V	437
	117	A	
	118	T	
	121	G	
	122*	M	
	125	L	
	181	E	
	189	P	
	191	W	
	264	C	
	265	W	
	292*	S	
	295	S	
	296	K	

Nota: Numeração dos aminoácidos apresentados com base na rodopsina bovina. Os asteriscos indicam que o resíduo em questão é crítico para a absorção espectral da opsina. λ_{max} = Comprimento de onda máximo. nm = nanômetros. A = Alanina; C = Cisteina; E = Glutamato; G = Glicina; K = Lisina; L = Leucina; M = Metionina; P = Prolina; S = Serina; T = Tirosina; V = Valina; W = Triptofano.

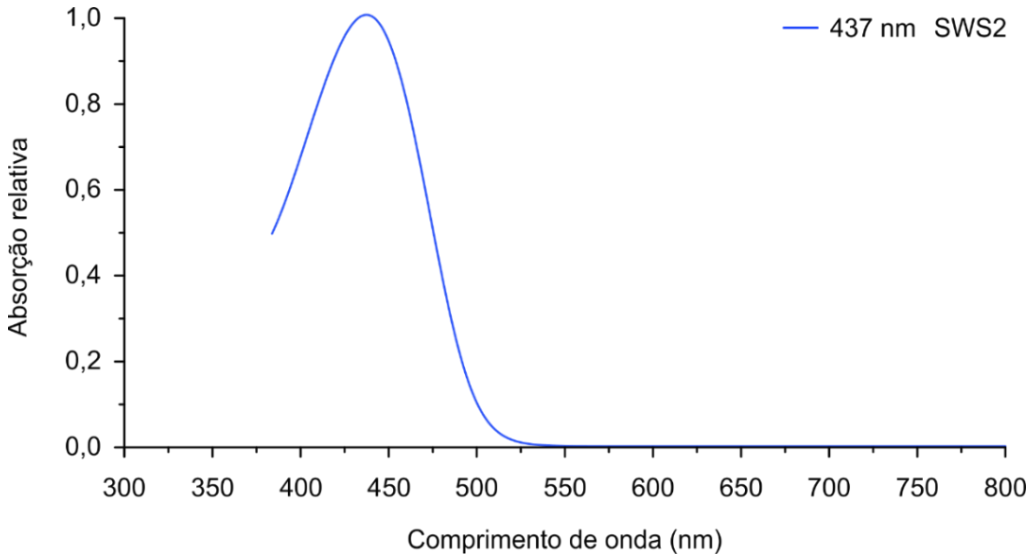


Figura 45 - Curva de absorção espectral obtida para o modelo computacional construído para o pigmento SWS2 de *T. s. elegans* a partir da sequência de aminoácidos do fotopigmento. A avaliação do espectro de absorção foi realizada a partir da interação entre o 11-cis-3,4-dehidroretinal com os aminoácidos imediatamente próximos à molécula (~4 A). O modelo apresentou λ_{max} em 437 nm. Curva de absorção espectral estimada com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (2000). nm = nanômetros.

Espectro de absorção do complexo 3,4-dehidroretinal-RH1

O complexo 3,4-dehidroretinal-rodopsina foi composto por 16 aminoácidos, conforme especificado na **Tabela 14**. A análise do espectro de absorção UV/Visível do complexo obtido indicou absorção de luz em duas regiões distintas do espectro. A absorção espectral máxima da estrutura ocorreu em 516,7 nm (**Figura 46**). Além deste

valor, as análises indicaram a presença de um outro pico, menor em relação ao primeiro, com absorção máxima ocorrendo em ~680 nm.

Tabela 14 - Aminoácidos presentes no complexo 3,4-dehidroretinal-RH1 utilizado para a análise do espectro de absorção espectral do modelo computacional da opsina RH1 de *T. s. elegans*.

Opsina	Posição	Aminoácido	λmax (nm)
RH1	114	G	517
	117	A	
	118	T	
	121	G	
	122	E	
	186	S	
	187	C	
	188	G	
	189	I	
	212	F	
	261	F	
	265	W	
	268	Y	
	269	A	
	292	A	
	296	K	

Nota: Numeração dos aminoácidos apresentados com base na rodopsina bovina. Os asteriscos indicam que o resíduo em questão é crítico para a absorção espectral da opsina. λ_{max} = Comprimento de onda máximo. nm = nanômetros. A = Alanina; C = Cisteina; E = Glutamato; F = Fenilalanina; G = Glicina; I = Isoleucina; K = Lisina; S = Serina; T = Tirosina; V = Valina; W = Triptofano; Y = Tirosina.

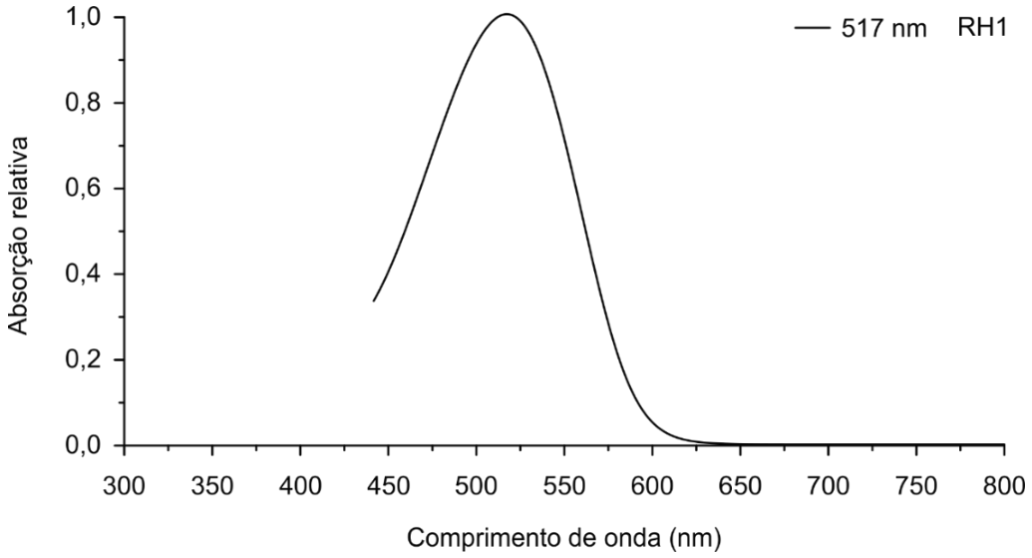


Figura 46 - Curva de absorção espectral obtida para o modelo computacional construído para o pigmento RH1 de *T. s. elegans* a partir da sequência de aminoácidos do fotopigmento. A avaliação do espectro de absorção foi realizada a partir da interação entre o 11-cis-3,4-dehidroretinal com os aminoácidos imediatamente próximos à molécula (~4 A). O modelo apresentou λ_{max} em 517 nm. Curva de absorção espectral estimada com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (2000). nm = nanômetros.

Espectro de absorção do complexo 3,4-dehidroretinal-RH2

O espectro de absorção foi estimado a partir da seleção dos aminoácidos imediatamente próximos (~4 Å) do dehidroretinal. O complexo 3,4-dehidroretinal-RH2 foi composto por 12 aminoácidos, indicados na **Tabela 15**. A análise do espectro de absorção UV/Visível desta estrutura estimou o λ_{max} do modelo em 500 nm como apresentado pela **Figura 47**.

Tabela 15 - Aminoácidos presentes no complexo 3,4-dehidroretinal-RH2 utilizado para a análise do espectro de absorção espectral do modelo computacional da opsina RH2 de *T. s. elegans*.

Opsina	Posição	Aminoácido	λmax (nm)
RH2	91	F	500
	94	T	
	117	A	
	181	E	
	186	S	
	187	C	
	188	G	
	189	P	
	268	Y	
	292	A	
	293	F	
	296	K	

Nota: Numeração dos aminoácidos apresentados com base na rodopsina bovina. λ_{max} = Comprimento de onda máximo. nm = nanômetros. A = Alanina; C = Cisteina; E = Glutamato; F = Fenilalanina; G = Glicina; K = Lisina; P = Prolina; S = Serina; T = Tirosina; Y = Tirosina.

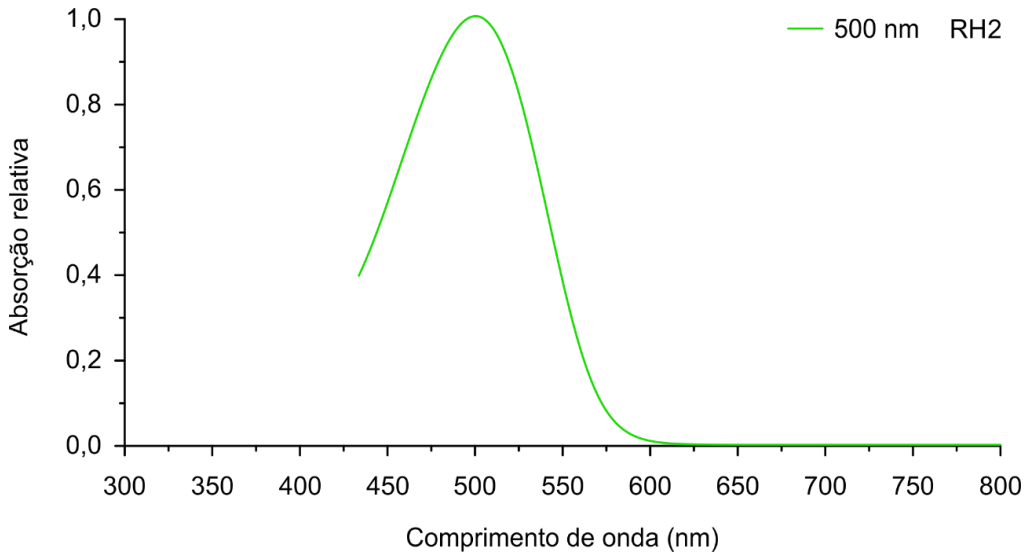


Figura 47 - Curva de absorção espectral obtida para o modelo computacional construído para o pigmento RH2 de *T. s. elegans* a partir da sequência de aminoácidos do fotopigmento. A avaliação do espectro de absorção foi realizada a partir da interação entre o 11-cis-3,4-dehidroretinal com os aminoácidos imediatamente próximos à molécula (~4 A). O modelo apresentou λ_{max} em 500 nm. Curva de absorção espectral estimada com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (2000). nm = nanômetros.

Espectro de absorção do complexo 3,4-dehidroretinal-LWS

O espectro de absorção foi estimado a partir da seleção dos aminoácidos imediatamente próximos (~4 Å) do dehidroretinal. O complexo 3,4-dehidroretinal-LWS foi composto por 13 aminoácidos, indicados na **Tabela 16**. A análise do espectro de absorção UV/Visível desta estrutura estimou o λ_{max} do modelo em 627,18 nm como apresentado pela **Figura 48**.

Tabela 16 - Aminoácidos presentes no complexo 3,4-dehidroretinal-RH2 utilizado para a análise do espectro de absorção espectral do modelo computacional da opsina RH2 de *T. s. elegans*.

Opsina	Posição	Aminoácido	λmax (nm)
LWS	86	E	627
	90	A	
	117	V	
	186	S	
	187	C	
	188	G	
	189	P	
	268	Y	
	271	F	
	291	P	
	292*	A	
	295	A	
	296	K	

Nota: Numeração dos aminoácidos apresentados com base na rodopsina bovina. Os asteriscos indicam que o resíduo em questão é crítico para a absorção espectral da opsina. λ_{max} = Comprimento de onda máximo. nm = nanômetros. A = Alanina; C = Cisteina; E = Glutamato; F = Fenilalanina; G = Glicina; K = Lisina; P = Prolina; S = Serina; V = Valina; Y = Tirosina.

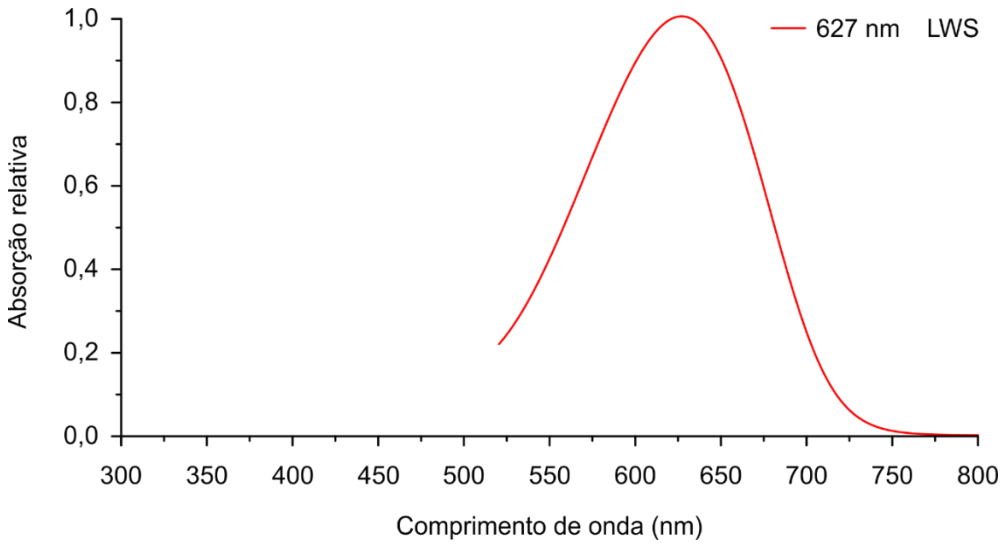


Figura 48 - Curva de absorção espectral obtida para o modelo computacional construído para o pigmento LWS de *T. s. elegans* a partir da sequência de aminoácidos do fotopigmento. A avaliação do espectro de absorção foi realizada a partir da interação entre o 11-cis-3,4-dehidroretinal com os aminoácidos imediatamente próximos à molécula (~4 A). O modelo apresentou λ_{max} em 627 nm. Curva de absorção espectral estimada com base no *template* proposto por Govardowski e colaboradores (2000). nm = nanômetros.

6. DISCUSSÃO

Os cinco genes de opsinas expressos na retina da tartaruga-de-orelha-vermelha, *T. s. elegans*, foram amplificados e sequenciados com sucesso. Análises comparativas realizadas com o auxílio da ferramenta *BLASTn* ao lado de análises moleculares nos permitiram identificar sua identidade. Os clados obtidos para os cinco genes de opsinas de Testudíneos também foram coerentes com a filogenia descrita para o grupo das tartarugas (Guillon *et al*., 2012), com a formação de clados monofiléticos, com alto suporte de *bootstrap* e probabilidade *bayesiana*. A literatura também descreve a presença do 11-cis-3,4-dehidroretinal como grupo prostético dos pigmentos visuais da espécie (Liebman & Granda, 1971; Loew & Govardovskii, 2001), o que foi confirmado a partir da identificação da expressão do gene *cyp27c1* na retina de *T. s. elegans*, demonstrada por meio da amplificação e sequenciamento do gene.

A inferência dos valores de absorção espectral de cada opsina foi realizada de acordo com aminoácidos em posições específicas, este valor de λ_{max} foi subsequentemente corrigido considerando o uso do cromóforo 3,4-dehidroretinal. Os valores obtidos foram, em todos os casos, próximos aos valores medidos experimentalmente (Liebman & Granda, 1971; Loew & Govardovskii, 2001; Ventura *et al*., 2001; Ventura *et al*., 1999; Zana *et al*., 2001). A identificação das sequências de aminoácidos que formam as opsinas também permitiu a elaboração de modelos computacionais para as cinco classes de fotopigmentos. Todos os modelos apresentaram boa avaliação estereoquímica e permitiram a avaliação de aspectos físicos relacionados à rede de interações não ligadas envolvendo as substituições capazes de interferir no λ_{max} das proteínas. Além da análise de aspectos estruturais focados em possíveis alterações no padrão de interações químicas, dadas as substituições em aminoácidos críticos identificadas na espécie, foi estimado o espectro de absorção de cada estrutura. Entretanto, considerando o poder computacional exigido para a análise da estrutura completa das opsinas, foram elaborados complexos menores compostos pelo cromóforo, resíduo K296 e pelos aminoácidos à 4 Å de distância do cromóforo. O resultado destas análises apresentou divergências consideráveis em relação aos valores medidos experimentalmente (Liebman & Granda, 1971; Loew & Govardovskii, 2001; Ventura *et al*., 2001; Ventura *et al*., 1999; Zana *et al*., 2001) indicando que outros aminoácidos devam ser considerados em análises mais poderosas.

6.1. Estimativa da Absorção Espectral dos Pigmentos Visuais de *T. s. elegans*

A expressão do gene *cyp27c1* na retina de *T. s. elegans*, demonstrada pelo presente trabalho, corrobora a literatura que indica a utilização do 3,4-dehidroretinal como grupo prostético das opsinas visuais da espécie. Embora diferentes fatores ambientais, incluindo mudanças na temperatura ou estação do ano possam afetar o equilíbrio dos dois cromóforos (Bridges, 1972; S. E. Temple *et al*., 2006), observa-se uma forte correlação entre a presença majoritária de luz ambiental com composição espectral deslocada para o vermelho e o uso do cromóforo 11-cis-3,4-dehidroretinal (Bridges, 1972; Reuter *et al*., 1971; Wald, 1957). A tartaruga-de-orelha-vermelha habita regiões de águas calmas, como lagos ou riachos de curso lento, com vegetação aquática abundante (Parmenter & Avery, 1990). Estes ambientes, ricos em luz com comprimento de onda longo (Clarke, 1939; Johnsen, 2014; Ruttner *et al*., 1953), induzem o desenvolvimento de mecanismo para aumentar a sensibilidade à luz nesta faixa espectral, como por exemplo a substituição do cromóforo 11-cis-retinal pelo isômero 11-cis-3,4-dehidroretinal, cuja síntese é mediada pelo citocromo CYP27C1 (Enright *et al*., 2015; Musilova *et al*., 2019).

O λ_{max} de cada uma das cinco opsinas visuais expressos na retina da tartaruga *T. s. elegans* foram estimados a partir dos aminoácidos presentes nas posições críticas para o deslocamento espectral de cada opsina. Os valores estimados inicialmente para cada opsina (SWS1 = 358 nm, SWS2 = 447 nm, RH1 = 496 nm, RH2 = 498 nm, e LWS = 560 nm), foram mais baixos que os valores descritos na literatura, medidos diretamente com as técnicas de MSP (Liebman & Granda, 1971; Loew & Govardovskii, 2001) e RI (Ventura *et al*., 2001; Zana *et al*., 2001). A discrepância nos valores é resultante da interferência espectral ocasionada pelo uso do cromóforo 11-cis-3,4-dehidroretinal.

Neste sentido, Parry & Bowmaker (2000) propõem uma correlação exponencial como meio de correção para estes valores. A utilização da curva de calibração proposta pelos autores aos resultados obtidos, entretanto, apresenta algumas discrepâncias com relação aos resultados esperados. No caso da opsina LWS, o valor do λ_{max} estimado varia de 560 nm, considerando o cromóforo derivado da vitamina A_1, para ~602 nm, considerando a correção para uso do cromóforo derivado da vitamina A_2. O valor resultante está abaixo da banda de absorção espectral determinado experimentalmente por MSP que varia de 617-620 nm (Liebman & Granda, 1971; Loew & Govardovskii, 2001). Tal disparidade também é observada para as correções aplicadas às demais famílias de opsinas (**Tabela 17**). Desta forma, ainda que a curva de calibração proposta

por Parry & Bowmaker (2000) apresente um alto coeficiente de determinação, a aplicação desta correlação no tratamento dos valores de absorção espectral da tartaruga *T. s. elegans* não foi adequada. Neste sentido, fez-se necessária a aplicação de outras regressões matemáticas capazes de descrever as relações apresentadas entre os dados de forma mais adequada. A utilização de uma correlação quadrática parece cumprir este papel de maneira satisfatória (**Figura 49**; ver Material e Métodos, **Tabela 5**).

Tabela 17 – Comparação dos valores de absorção espectral estimados a partir da sequência de aminoácidos com os valores corrigidos considerando a curva de calibração proposta por Parry e Bowmaker (2000) e a proposta pelo presente trabalho

Opsina	λmax (A1) (nm)	λmax (A2)* (nm)	λmax (A2)** (nm)	λmax (MSP/RI) (nm)
LWS	560	602	617	617 [1]; 620 [2]
RH1	496	513	518	518 [1]; 520 [2]
RH2	498	515	520	518 [1]; 520 [2]
SWS1	358	363	374	372 [1]; 372 [3];[4]
SWS2	447	454	456	458 [1]; 450 [2]

Nota: Os valores de A1 e A2 indicam, respectivamente, o λ_{max} estimado a partir das análises genéticas considerando a presença do cromóforo A1 e do cromóforo A2. Referências = [1] Loew and Govardovskii (2001); [2] Liebman and Granda (1971); [3] Zana *et al*. (2001); [4] Ventura *et al*. (2001). O "*" indica os valores calculados com base na equação da curva de calibração proposta por Parry e Bowmaker (2000). O "**" indica os valores calculados com base na curva de calibração do Sistema rodopsina/porfiropsina proposta pelo presente trabalho. nm = nanômetros. MSP = microespectrofotometria. RI = Registro Intracelular.

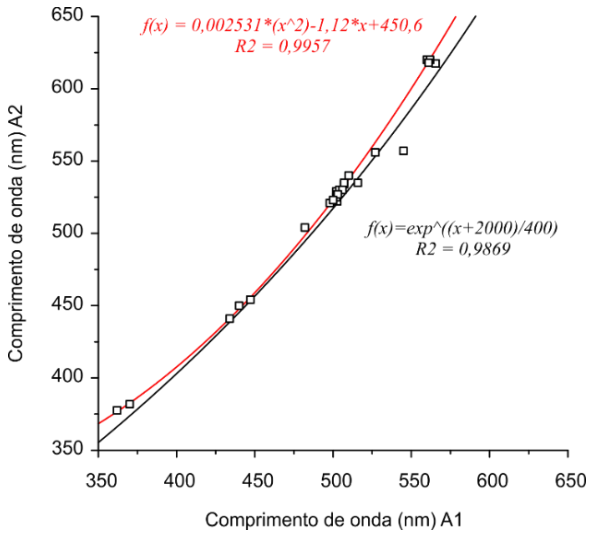


Figura 49 - Comparação da correlação dos valores de absorção espectral para opsinas que utilizam as vitaminas A1 e/ou A2 como grupo prostético elaborada com base na correlação exponencial proposta por Parry & Bowmaker (2000) (linha preta) com a curva de calibração obtida a partir do ajuste quadrático proposto pelo presente trabalho (linha vermelha). A relação quadrática proposta pelo presente trabalho apresenta um poder descritivo maior. A equação referente a cada uma das curvas e os valores de R^2 encontram-se descritos na figura. nm = nanômetros.

Considerando o ajuste quadrático proposto, os valores de λ_{max} inferidos pelas análises genéticas foram corrigidos de modo a apresentarem uma concordância maior com os valores descritos na literatura. A submissão dos valores originais à nova curva de calibração do sistema rodopsina/porfiropsina estima o λ_{max} dos pigmentos visuais

SWS1, SWS2, RH1, RH2 e LWS em 374, 456, 518, 520 e 617 nm, respectivamente (**Tabela 18**). A relação entre os valores de λ_{max} estimados a partir da curva de calibração proposta e os valores de λ_{max} medidos em estudos anteriores é descrita por uma correlação linear ($R^2 > 0,99$) e pode ser verificada na **Figura 50**.

Tabela 18 - Valores de absorção espectral das cinco opsinas visuais de *T. s. elegans*.

Opsina	Síto	AA (Ancestral)	AA (T. s. elegans)	Teórico – Genética (nm)		Experimental (nm)		
				λ_{max} (A1)	λ_{max} (A2)*	MSP [1]	MSP [2]	IR [3; 4]
LWS	164	S	S	560	617,12	617	620	635
	181	H	H					
	261	Y	Y					
	269	T	T					
	292	A	A					
RH1	83	D	N	496	517,75	518	520	-
	96	Y	Y					
	102	Y	Y					
	122	E	E					
	183	M	L					
	253	M	M					
	261	F	F					
	289	T	T					
	292	A	A					
	299	A	A					
	317	M	M					
RH2	49	F	F	497	519,14	518	520	555
	52	L	L					
	83	D	D					
	86	M	M					
	97	T	T					
	122	Q	Q					
	164	A	A					
SWS1	46	F	F	358	374,02	372	-	372
	49	F	F					
	52	T	V					
	86	F	F					
	90	S	S					
	91	V	V					
	93	T	M					
	97	S	S					
	109	V	A					
	113	E	E					
	114	A	A					
	116	M	L					
	118	S	S					
SWS2	46	F	L	447	455,68	458	450	470
	48	I	I					
	49	I	V					
	52	V	V					
	91	S	T					
	93	T	T					
	94	A	A					
	99	M	S					
	100	H	Q					
	116	T	A					
	122	M	M					
	151	T	T					
	159	F	L					
	164	A	G					
	166	A	V					
	169	T	A					
	207	L	L					
	217	T	S					
	269	A	A					
	292	S	S					
	304	V	V					

Nota: Os valores de A1 e A2 indicam, respectivamente, o λ_{max} estimado a partir das análises genéticas considerando a presença do cromóforo A1 e do cromóforo A2. AA = aminoácidos. Referências = [1]

Loew and Govardovskii (2001); [2] Liebman and Granda (1971); [3] Zana *et al*. (2001); [4] Ventura *et al*. (2001). O "*" indica os valores calculados com base na curva de calibração do Sistema rodopsina/porfiropsina proposta pelo presente trabalho. nm = nanômetros. MSP = microespectrofotometria. RI = Registro Intracelular.

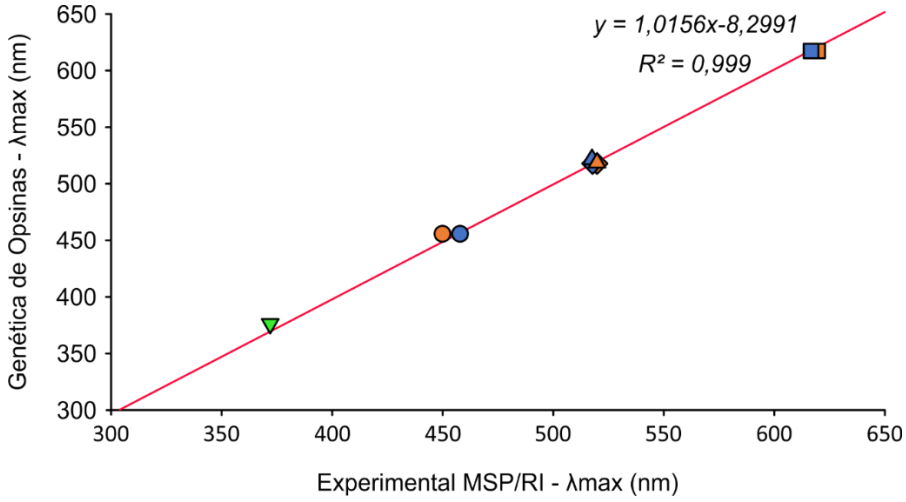


Figura 50 - A relação entre os valores de absorção espectral (λ_{max}) medidos experimentalmente (MSP e RI) e os valores estimados pela análise genética realizada neste trabalho para as opsinas LWS (quadrado), RH1 (triângulo para cima), RH2 (losango), SWS2 (círculo) e SWS1 (triângulo para baixo), apresentou uma correlação linear de equação y = a + b*x. Foi encontrado um alto coeficiente de correlação entre os valores estimados pela genética e os dados de microespectrofotometria de Loew & Govardovskii (2001) (azul) e de Liebman & Granda (1971) (laranja), bem como registro intracelular de Ventura *et al*. (2001) (verde). nm = nanômetros.

6.1.1. Absorção espectral da opsina SWS1

Quatro substituições foram identificadas a partir da comparação da sequência de aminoácidos que compõe a opsina SWS1 de *T. s. elegans* com aminoácidos de referência. As substituições T52V, T93M e M116L, embora já tenham sido observadas e apresentem descrição na literatura, possuem efeito desconhecido no λ_{max} da opsina. Apenas a substituição V109A possui efeito conhecido, sendo responsável por causar um deslocamento hipsocrômico de 2 nm (Yokoyama *et al*., 2016). Deste modo, considerando a presença do resíduo F86, a interferência da substituição V109A e a utilização do cromóforo 3,4-dehidroretinal, o λ_{max} da opsina SWS1 de *T. s. elegans* foi estimado em ~374 nm (**Tabela 18**).

Descrições morfológicas meticulosas das diferentes populações de fotorreceptores realizadas desde 1982 já supunham a existência de uma subpopulação de cones capazes de responder à iluminação UV (Kolb & Jones, 1982, 1987; Goede & Kolb, 1994), mas a confirmação desta capacidade seria experimentalmente atestada apenas em 2001 (Loew & Govardovskii, 2001; Ventura *et al*., 2001; Zana *et al*., 2001). A resposta destas células à luz ultravioleta está associada a mecanismos gênicos que

modulam o λ_{max} do pigmento visual a partir de aminoácidos presentes em 13 resíduos (Yokoyama, 2008; Yokoyama *et al*., 2007). Ainda que todos estes resíduos apresentem importância, é consenso que o resíduo na posição 86 exerce influência ímpar sobre a banda de absorção espectral de pigmentos UV para o VS, em diversas espécies de vertebrados, com exceção das aves, sendo que o aminoácido F86 é responsável por determinar o λ_{max} no ultravioleta (~360 nm) (Cowing *et al*., 2002; W. I. L. Davies *et al*., 2009; Fasick *et al*., 2002). De fato, a presença do resíduo F86 na sequência de aminoácidos da opsina SWS1 de *T. s. elegans* confere a sensibilidade ao UV. Medições realizadas por MSP e RI indicaram o λ_{max} da opsina em 372 nm (Loew & Govardovskii, 2001; Ventura *et al*., 2001; Zana *et al*., 2001), valor bastante próximo aos 374 nm obtido a partir das análises genéticas (**Figura 51**). Nas estimativas realizadas a partir dos dados moleculares, foi possível considerar a interferência de apenas uma das quatro substituições de aminoácidos identificadas. Uma vez que a interferência ocasionada pelas outras três substituições encontradas não foi descrita na literatura.

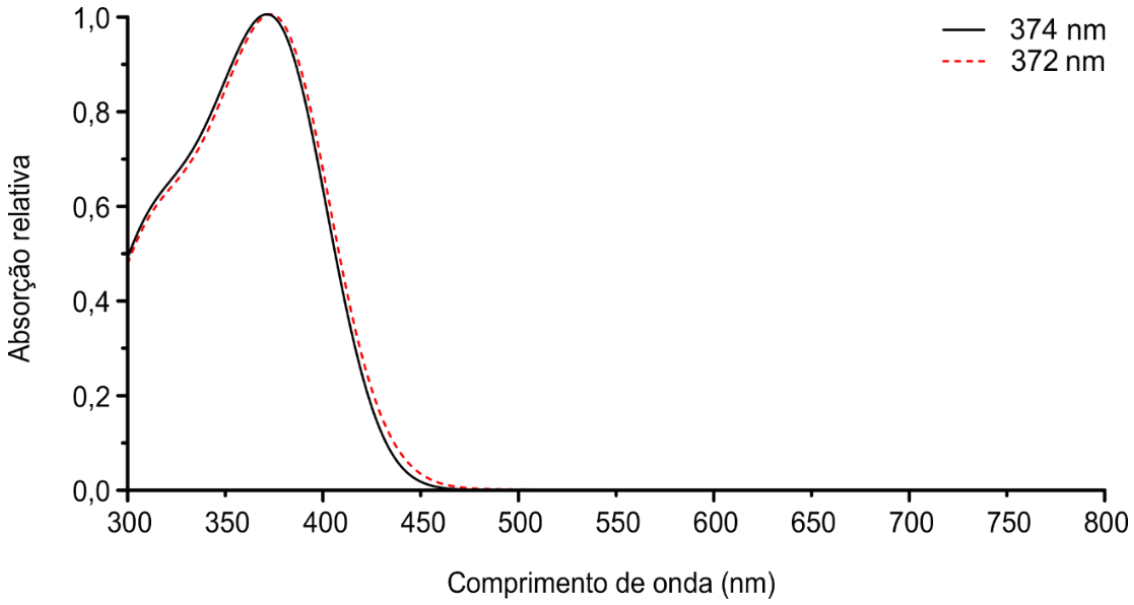


Figura 51 - Curvas de absorção espectral para a opsina SWS1 corrigida a partir da aplicação da curva de calibração proposta no presente trabalho (linha preta contínua). O valor obtido é coerente com os valores descritos na literatura para a mesma opsina (linha vermelha pontilhada). nm = nanômetros.

No que se refere aos resultados das análises filogenéticas realizadas para o gene *sws1*, as tartarugas formam um clado monofilético coerente com a filogenia apresentada pelo grupo das tartarugas (Guillon *et al*., 2012; Motani, 2009). A filogenia das tartarugas apresenta um alto grau de conservação do resíduo 86 na opsina SWS1, demonstrado pela presença do aminoácido Fenilalanina em todas as tartarugas

amostradas, o que nos permite inferir para todas elas a absorção na faixa do UV (**Figura 52**). Das espécies apresentadas, apenas *C. p. bellii* e *T. s. elegans* utilizam a vitamina A_2 como cromóforo ao longo da vida. A tartaruga marinha *C. mydas* apresenta seus pigmentos visuais baseados na utilização da vitamina A_1 (Liebman & Granda, 1971). Supõe-se, baseado no habitat onde vivem, que as espécies *T. c. triunguis*, *G. evgoodei* (terrestres) e *P. sinensis* (habita regiões de águas salobras) possuam seus pigmentos visuais baseados na utilização da vitamina A1.

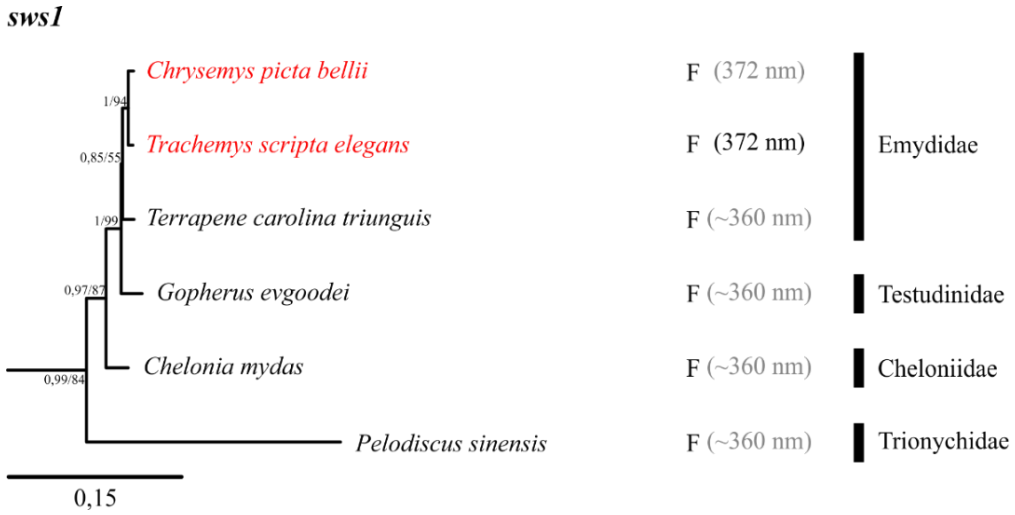


Figura 52 - Análise filogenética das sequências de nucleotídeos do pigmento visual SWS1 de tartarugas construída por meio do método de Máxima Verossimilhança. Os valores observados em cada nó correspondem aos suportes de *bootstrap* e probabilidade *bayesiana*. Ramos com valores de *bootstrap* abaixo de 50% não foram indicados. As tartarugas que supõem-se utilizar o 3,4-dehidroretinal então destacadas em vermelho. Estão demarcados em preto os valores de absorção espectral medidos com o auxílio de técnicas de Microespectrofotometria e/ou Registro Intracelular. Em cinza, podem ser verificados os valores estimados em função da presença do aminoácido fenilalanina na posição 86 da opsina SWS1. nm = nanômetros. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeo por posição.

6.1.2. Absorção espectral da opsina SWS2

Para a opsina SWS2, as análises da sequência de aminoácidos mostraram onze substituições potencialmente importantes para a determinação do λ_{max} do fotopigmento. Dentre as substituições identificadas, a mais significativa foi a substituição F46L, responsável por causar um deslocamento batocrômico de 6 nm (Yokoyama *et al*, 2007), ao passo que a substituição F52V contribui apenas com o deslocamento batocrômico de 1 nm (Yokoyama & Tada, 2003). Uma vez que a interferência ocasionada pelas demais substituições encontradas ainda é desconhecida, a somatória do deslocamento de 7 nm provocado apenas em função das substituições F46L e F52V com o deslocamento batocrômico causado pela utilização do 3,4-dehidroretinal implica em um λ_{max} de ~456

nm. O valor estimado foi próximo aos valores medidos descritos na literatura, com apenas cerca de 6 nm de diferença dos 450 nm apresentados por Liebman e Granda (1971), e ~3 nm com relação aos resultados de Loew e Govardovskii (2001), de 458 nm (**Figura 53**).

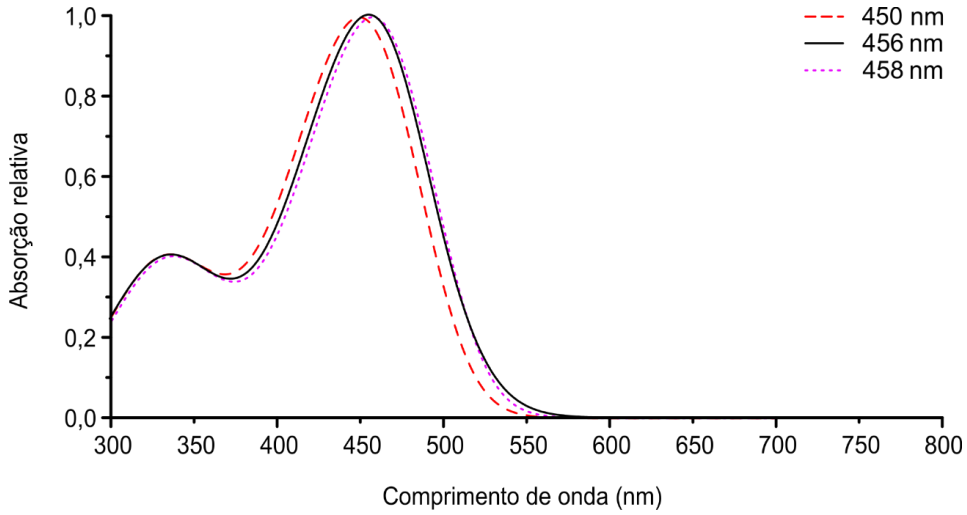


Figura 53 - Comparação das curvas de absorção espectral apresentadas pela literatura para a opsina SWS2 com aquela obtida por meio das análises genéticas conduzidas pelo presente trabalho (linha preta contínua). As análises mostraram uma diferença de ~6 nm em relação aos dados de Liebman e Granda (1971) (linha vermelha tracejada) e ~3 nm de diferença em relação aos dados apresentados por Loew e Govardovskii (2001) (linha roxa pontilhada). nm = nanômetros.

As análises filogenéticas realizadas para o gene *sws2* recuperaram parcialmente a filogenia dos vertebrados (Guillon *et al*., 2012; Motani, 2009). Das espécies apresentadas, apenas *C. p. bellii* e *T. s. elegans* utilizam a vitamina A_2 como cromóforo ao longo da vida. Todas as demais espécies utilizam a vitamina A_1. Embora todas as espécies apresentem sequências de aminoácidos muito semelhantes, diferenças consideráveis são observadas entre os valores de absorção espectral. Em especial, as tartarugas *C. p. bellii*, *T. s. elegans* (458 nm) e *T. c. triunguis* (440 nm) evidenciam a influência da utilização do 3,4-dehidroretinal sobre a absorção espectral da opsina, uma vez que compartilham da mesma sequência de aminoácidos. Para a tartaruga marinha *C. mydas*, que também utiliza o retinal, os 2 nm de diferença observados podem encontrar respaldo em substituições desconhecidas. A despeito de serem observadas duas substituições em posições críticas da espécie *P. sinensis* (S91T e H100Q), sua interferência na absorção espectral da opsina SWS2 não apresenta descrição na literatura, de modo que seu λ_{max} foi estimado em 440 nm (**Figura 54**).

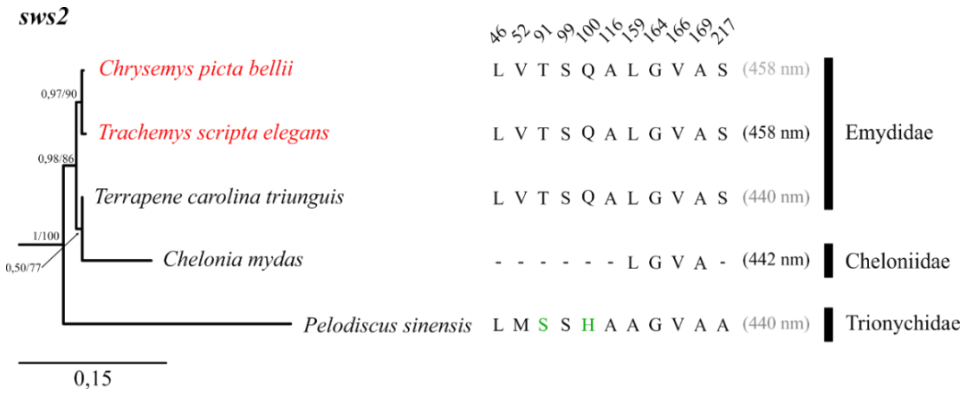


Figura 54 - Reconstrução filogenética das sequências de nucleotídeos do pigmento visual SWS2 de tartarugas construída por meio do método de Máxima Verossimilhança. Os valores observados em cada nó correspondem aos suportes de *bootstrap* e probabilidade *bayesiana*. As tartarugas que supõem-se utilizar o 3,4-dehidroretinal então destacadas em vermelho. A figura apresenta os aminoácidos críticos de deslocamento espectral da opsina SWS2, onde foram identificadas substituições na sequência de aminoácidos da tartaruga-de-orelha-vermelha com relação à opsina ancestral. Destacado em verde os aminoácidos presentes na sequência ancestral da opsina SWS2 dos vertebrados. Os valores entre parênteses representam o λ_{max} da opsina SWS2, medidos por Microespectrofotometria ou Registro Intracelular em preto, e em cinza, estimados a partir da sequência de aminoácidos observada. nm = nanômetros. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeo por posição.

6.1.3. Absorção espectral da rodopsina RH1

Resíduos presentes em onze resíduos são apontados pela literatura como críticos para a absorção espectral da opsina RH1 dos vertebrados (Hunt *et al*., 2001; Levenson *et al*., 2006; Yokoyama, 2008). Estes resíduos conferem à opsina o λ_{max} em ~500 nm, como observado em diferentes vertebrados (Bowmaker *et al*., 1980; Collins & Morton, 1950; Katti *et al*., 2018; Okano *et al*., 1992; Schwanzara, 1967; Yokoyama, 2000). A partir do sequenciamento do gene *rh1* de *T. s. elegans* foram identificadas as substituições D83N e M183L, cada uma capaz de contribuir com o deslocamento hipsocrômico de 2 nm (Levenson *et al*., 2006; Zhao *et al*., 2009). Considerando a combinação destas substituições, e considerando a presença do cromóforo 3,4-dehidroretinal, o λ_{max} do fotopigmento RH1 foi estimado em ~517,75 nm. Experimentalmente, o λ_{max} da opsina RH1 de *T. s. elegans* foi medido por Liebman e Granda (1971) e por Loew e Govardovskii (2001) a partir da técnica de MSP, com λ_{max} de 518 e 520 nm, respectivamente. Neste caso, a estimativa apresentada pelo presente trabalho é coerente com a literatura (**Figura 55**).

No que se refere à filogenia construída para o gene *rh1*, observa-se a existência de um padrão monofilético, com alto suporte de *bootstrap* e probabilidade *bayesiana* (100/1). Em todos os casos, a sequência de aminoácidos presentes nas posições críticas foi semelhante, com exceção da espécie *P. sinensis*, que apresentou apenas a

substituição D83N. De acordo com a literatura, as substituições D83N e M183L contribuem com o deslocamento hipsocrômico de 2 nm (Levenson *et al*., 2006; Zhao *et al*., 2009), de modo que o λ_{max} das espécies terrestres *T. c. triunguis* e *G. evgoodei* foi estimado em 496 nm, ao passo que o λ_{max} de *P. sinensis* foi estimado em 498 nm. A absorção espectral da opsina RH1 na espécie marinha *C. mydas* foi medida em 502 nm (Liebman & Granda, 1971). Entretanto, vale ressaltar que a análise da sequência de aminoácidos da espécie também apresenta apenas as substituições D83N e M183L, indicando que outras variáveis possam estar influenciando o λ_{max} da espécie (**Figura 56**).

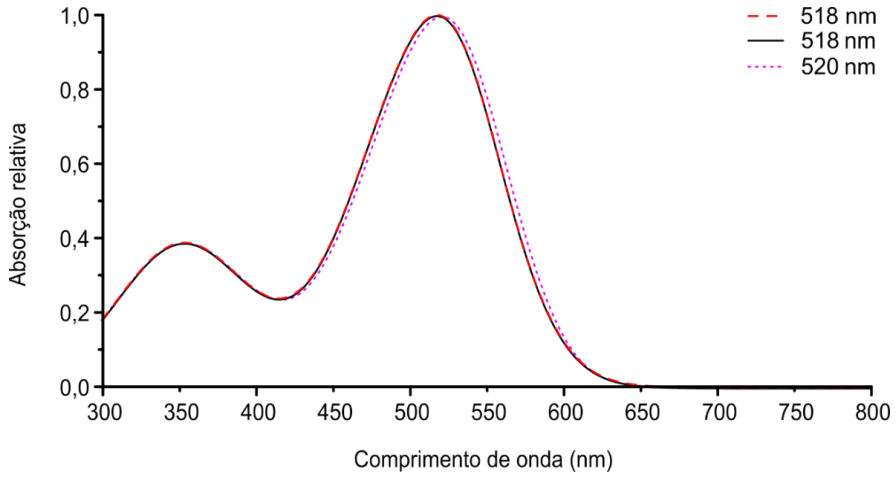


Figura 55 - Comparação das curvas de absorção espectral apresentadas pela literatura para a rodopsina RH1 com o valor obtido por meio das análises genéticas conduzidas pelo presente trabalho (linha preta contínua). As análises mostraram uma diferença de ~2 nm em relação aos dados de Liebman e Granda (1971) (linha roxa pontilhada) e menos de 1 nm de diferença em relação aos dados apresentados por Loew e Govardovskii (2001) (linha vermelha tracejada). A linha vermelha está sobreposta à linha preta. nm = nanômetros.

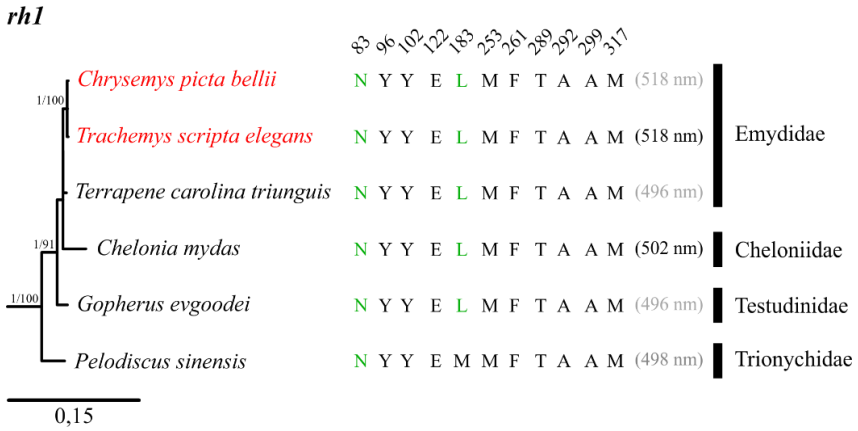


Figura 56 - Reconstrução filogenética das sequências de nucleotídeos do pigmento visual RH1 de tartarugas construída por meio do método de Máxima Verossimilhança. Os valores observados em cada nó correspondem aos suportes de *bootstrap* e probabilidade *bayesiana*. As tartarugas que supõem-se utilizar o 3,4-dehidroretinal então destacadas em vermelho. A figura apresenta os aminoácidos presentes em todos os resíduos críticos para a absorção espectral da rodopsina dos vertebrados. Destacados em verde os aminoácidos onde são observadas mutações, com relação à rodopsina ancestral. Entre

parênteses, valores das bandas de sensibilidade espectral do fotopigmento RH1, em preto valores medidos por MSP e/ou RI, em cinza, valores estimados em função da sequência de aminoácidos críticos. nm = nanômetros. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeo por posição.

6.1.4. Absorção espectral da opsina RH2

Takenaka e Yokoyama (2007) apontam 7 resíduos críticos para o deslocamento espectral da opsina. A comparação da sequência de aminoácidos que compõe o fotopigmento RH2 com a sequência ancestral desta opsina de vertebrados proposta por Takenaka e Yokoyama (2007), não indicou a presença de nenhuma substituição. A literatura sugere que o λ_{max} do fotopigmento RH2 ancestral varia entre ~490-511 nm. A espécies *Anolis carolinensis* apresenta o perfil de aminoácidos FLDMTQS. Esta sequência de aminoácidos confere à espécie um λ_{max} em 495 nm, medidos com espectrofotômetro (Kawamura & Yokoyama, 1998). Uma vez que a substituição S164A é capaz de contribuir com o deslocamento batocrômico de 2 nm (Chan *et al*., 1992), considerou-se que o λ_{max} conferido ao fotopigmento RH2 pelo perfil FLDMTQA, identificado em *T. s. elegans*, foi de 497 nm. A correção deste valor decorrente da utilização do 3,4-dehidroretinal como grupo prostético, alterou o λ_{max} da opsina RH2 de *T. s. elegans* para 519,14 nm. Este valor é coerente com os dados apresentados na literatura, de 520 nm (Liebman & Granda, 1971) e 518 nm (Loew & Govardovskii, 2001) (**Figura 57**).

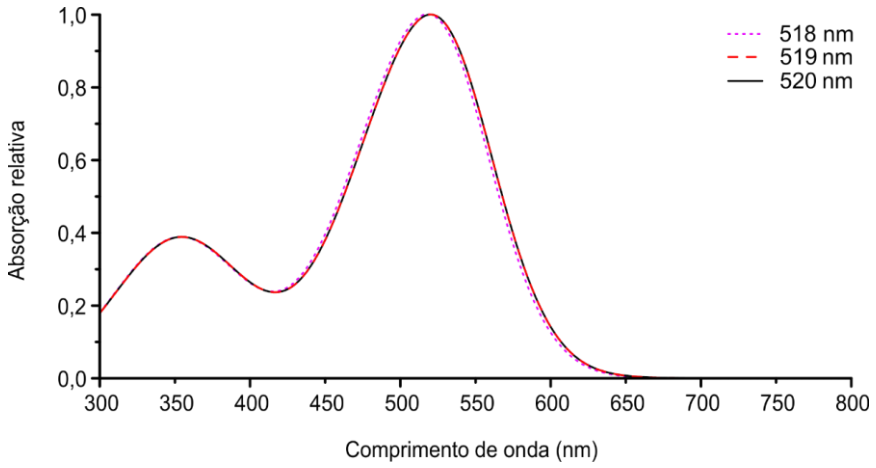


Figura 57 - Comparação das curvas de absorção espectral apresentadas pela literatura para a opsina RH2 com o valor obtido por meio das análises genéticas conduzidas pelo presente trabalho (linha preta contínua). As análises mostraram uma diferença de ~2 nm em relação aos dados de Loew e Govardovskii (2001) (linha roxa pontilhada), sendo compatível com os dados apresentados por Liebman e Granda (1971) (linha vermelha tracejada). A linha vermelha está sobreposta à linha preta. nm = nanômetros.

No que se refere à filogenia construída para o gene *rh2*, observa-se a existência de um padrão monofilético, com alto suporte de *bootstrap* e probabilidade *bayesiana*

(80/0,91). Os valores de absorção espectral estimados em 497 nm para as espécies *G. evgoodei*, *T. c. triunguis* e *P. sinensis* levou em consideração a existência do perfil FLDMTQA de aminoácidos (**Figura 58**). Novamente, a tartaruga marinha apresentou seu λ_{max} em 502 nm (Liebman & Granda, 1971), entretanto no caso da opsina RH2, pode-se observar a existência da substituição A164S, ausente nas demais espécies. Assim, poder-se-ia supor que a substituição A164S seria capaz de deslocar o λ_{max} da opsina para 502 nm. As espécies semiaquáticas *C. p. bellii* e *T. s. elegans* apresentaram valores de absorção espectral estimados em 518 nm.

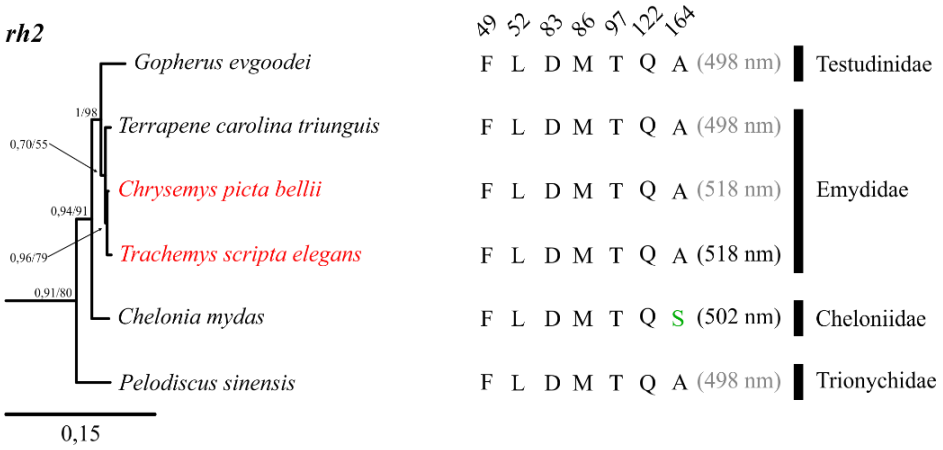


Figura 58 - Reconstrução filogenética das sequências de nucleotídeos do pigmento visual RH2 de tartarugas, obtida por Máxima Verossimilhança. Os valores observados em cada nó correspondem aos suportes de *bootstrap* e probabilidade *bayesiana*. As tartarugas que supõem-se utilizar o 3,4-dehidroretinal então destacadas em vermelho. A figura apresenta os aminoácidos presentes em todos os resíduos críticos para a absorção espectral da opsina RH2 dos vertebrados. Estão destacados em verde os aminoácidos onde são observadas mutações, com relação a opsina RH2 ancestral. Entre parênteses, os valores de λ_{max}, em preto os valores medidos por Microespectrofotometria e/ou Registro Intracelular, e em cinza, aqueles estimados em função da sequência de aminoácidos críticos. nm = nanômetros. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeo por posição.

6.1.5. Absorção espectral da opsina LWS

O λ_{max} dos pigmentos LWS caracteriza-se em função de substituições dos aminoácidos presentes em cinco resíduos distintos. A "regra dos cinco sítios" determina os resíduos 164, 181, 261, 269 e 292 como críticos para a absorção espectral da opsina e permite explicar o λ_{max} dos pigmentos verde/vermelho de grande parte dos vertebrados, podendo também ser aplicada para os pigmentos verde/vermelho ancestrais (Yokoyama, 2000). A presença dos resíduos S, H, Y, T e A, respectivamente localizados nas posições determinadas por esta regra, permite estimar o λ_{max} do fotopigmento LWS dos vertebrados que utilizam o retinal como cromóforo em 560 nm (Yokoyama & Radlwimmer, 1999). Entretanto, o efeito da presença deste perfil de aminoácidos de vertebrados que utilizam o 3,4-dehidroretinal como grupo prostético, como o peixe de

água doce *Carassius auratus* e da tartaruga *T. s. elegans* é pouco explorado pela literatura.

Estudos com MSP em retinas de *T. s. elegans*, mediram o λ_{max} dos cones L em 620 nm (Liebman & Granda, 1971). Anos mais tarde, Loew & Govardovskii (2001) descrevem um λ_{max} semelhante, em 617 nm, com uso da mesma técnica. Em *C. auratus*, estudos eletrofisiológicos apontaram a presença de cones com absorção máxima medida em ~623 nm (Palacios *et al*., 1998). A sequência de aminoácidos da opsina LWS de *T. s. elegans* identificou a presença do perfil SHYTA, o que leva a supor que estes aminoácidos quando associados ao cromóforo 3,4-dehidroretinal sejam capazes de conferir ao pigmento visual o λ_{max} de ~620 nm. De fato, a reconstrução dos pigmentos visuais de *C. auratus* realizada por Parry & Bowmaker (2000) demonstrou que a substituição do cromóforo nativo da espécie (3,4-dehidroretinal) por um isômero sintético equivalente ao 11-cis-retinal apresenta influência ímpar para o deslocamento espectral da opsina LWS da espécie, com seu λ_{max} variando de ~617,5 nm, medidos por MSP, para ~565,6 nm. O valor obtido após a substituição do 3,4-dehidroretinal pelo retinal (~566 nm) é coerente com o valor obtido com base na sequência de aminoácidos encontrada na espécie (**Figura 59**).

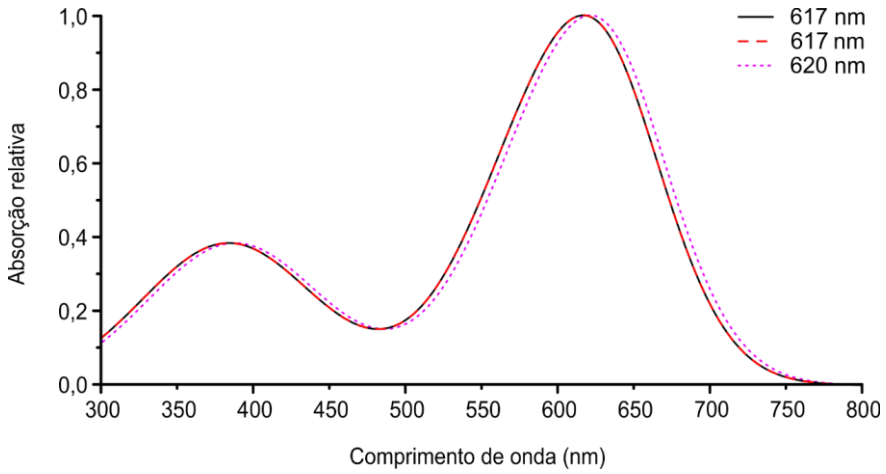


Figura 59 - Comparação das curvas de absorção espectral apresentadas pela literatura para a opsina LWS com o valor obtido por meio das análises genéticas conduzidas pelo presente trabalho (linha preta contínua). As análises mostraram uma diferença de ~2 nm em relação aos dados de Liebman e Granda (1971) (linha roxa pontilhada), sendo compatível com os dados apresentados por Loew e Govardovskii (2001) (linha vermelha tracejada). A linha vermelha está sobreposta à linha preta. nm = nanômetros.

A filogenia construída para o gene *lws* não recuperou a relação filogenética entre os grupos de vertebrados. Todas as tartarugas observadas apresentaram o perfil de aminoácidos SHYTA, o que confere o λ_{max} em 560 nm às espécies que utilizam a vitamina A_1 como cromóforo (*T. c. carolina*, *C. mydas* e *P. sinensis*). Aos vertebrados

que utilizam a vitamina A_2 (*T. s. elegans* e *C. p. bellii*), este perfil de aminoácidos confere o λ_{max} em 617 nm. A espécie de tartaruga terrestre *G. evgoodei*¸ entretanto, apresentou a substituição S164P capaz de contribuir com o deslocamento hipsocrômico de 25 nm, deslocando o λ_{max} para 535 nm (**Figura 60**) (Yokoyama & Radlwimmer, 1999).

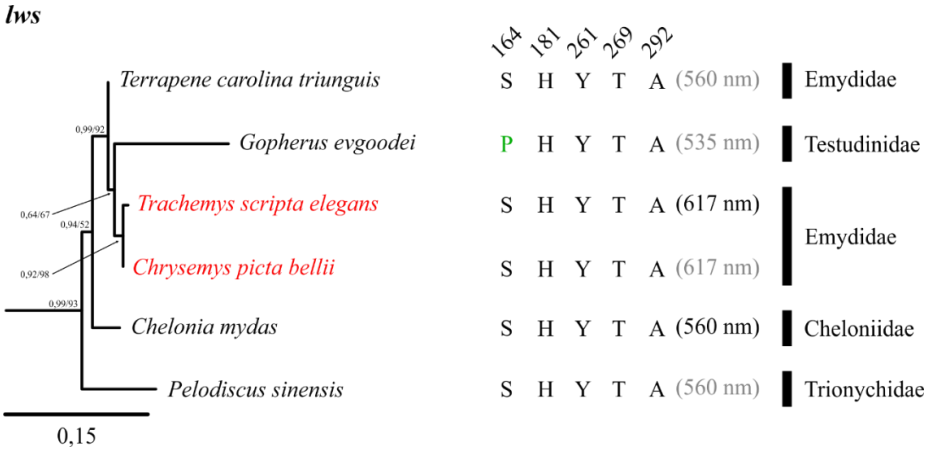


Figura 60 - Análise filogenética das sequências de nucleotídeos do pigmento visual LWS de tartarugas construída por meio do método de Máxima Verossimilhança. Os valores observados em cada nó correspondem aos suportes de *bootstrap* e probabilidade *bayesiana*. Ramos com valores de *bootstrap* abaixo de 50% não foram indicados. As tartarugas que supõem-se utilizar o 3,4-dehidroretinal então destacadas em vermelho. Estão demarcados em preto os valores de absorção espectral medidos com o auxílio de técnicas de Microespectrofotometria e/ou Registro Intracelular. Em cinza, podem ser verificados os valores estimados em função da sequência de aminoácidos críticos para a absorção espectral da opsina LWS. A figura apresenta os aminoácidos presentes em todos os resíduos críticos para a absorção espectral da rodopsina dos vertebrados. Estão destacados em verde os aminoácidos onde são observadas mutações. nm = nanômetros. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeo por posição.

6.2. Estimativa Computacional do Espectro de Absorção UV/visível

O desenvolvimento dos modelos computacionais levou em consideração a elaboração da estrutura tridimensional das moléculas estudadas, além do *docking* molecular elaborado para a determinação da melhor conformação da molécula de 11-cis-3,4-dehidroretinal na estrutura da opsina, sendo seu λ_{max} estimado a partir dos aminoácidos localizados a aproximadamente 4 angströms de distância do dehidroretinal. A análise espectrográfica do complexo de aminoácidos + cromóforo obtida para os modelos computacionais das opsinas SWS1, SWS2, RH1, RH2 e LWS, estimou o λ_{max} de absorção espectral destes pigmentos visuais em 400, 437, 517, 500 e 627 nm, respectivamente. Dentre todos os modelos resultantes, o λ_{max} obtido para a rodopsina foi o que mais se assemelhou com os dados da literatura, apresentando ~1 nm de diferença dos dados aprestados por Loew e Govardovskii (2001). O modelo da opsina SWS1 apresentou maior divergência com relação aos valores medidos, com mais de 30 nm de

diferença em relação aos dados de eletrofisiologia e MSP (Ventura *et al*., 2001; Zana *et al*., 2001 Loew & Govardovskii, 2001). As opsinas RH2 e SWS2 apresentaram λ_{max} estimado em 500 nm e 437 nm, respectivamente, divergindo da literatura em ~18 e ~21 nm (**Figura 61**) (Loew & Govardovskii, 2001). Para a opsina LWS, foi observado ~10 nm de diferença em relação aos 617 nm medidos por MSP (Loew & Govardovskii, 2001).

Dada a complexidade dos cálculos exigidos para a avaliação do modelo, o poder computacional envolvido tende a aumentar drasticamente conforme o tamanho da proteína estudada. Considerando que as opsinas visuais são proteínas que possuem em média 350 aminoácidos, o custo computacional para se submeter à análise toda a estrutura da opsina seria demasiadamente elevado, inviabilizando a obtenção de resultados. Assim, optou-se por utilizar apenas os aminoácidos mais próximos, em até 4 angströms, de distância do cromóforo. Esta metodologia, entretanto, fez com que a maioria dos aminoácidos presentes em posições notoriamente críticas para a absorção espectral dos pigmentos visuais fossem desconsiderados. No caso da opsina LWS, por exemplo, apenas o resíduo alanina, na posição 292, foi considerado dentre os cinco resíduos críticos descritos. Além disso, dada esta mesma limitação de poder computacional, optou-se por utilizar a Teoria do Funcional da Densidade Tempo-Dependente (TD-DFT), método Semiempírico que utiliza cálculos quânticos associados a observações empíricas na tentativa de fornecer a melhor descrição de sistemas atômicos (vide Apêndice I). Embora o método exija menor poder computacional para a resolução dos cálculos, apresenta resultados menos exatos. A obtenção de resultados mais fidedignos aos valores apresentados pela literatura exigiria, portanto, além da consideração da estrutura completa da proteína, a utilização de método de avaliação *Ab initio*.

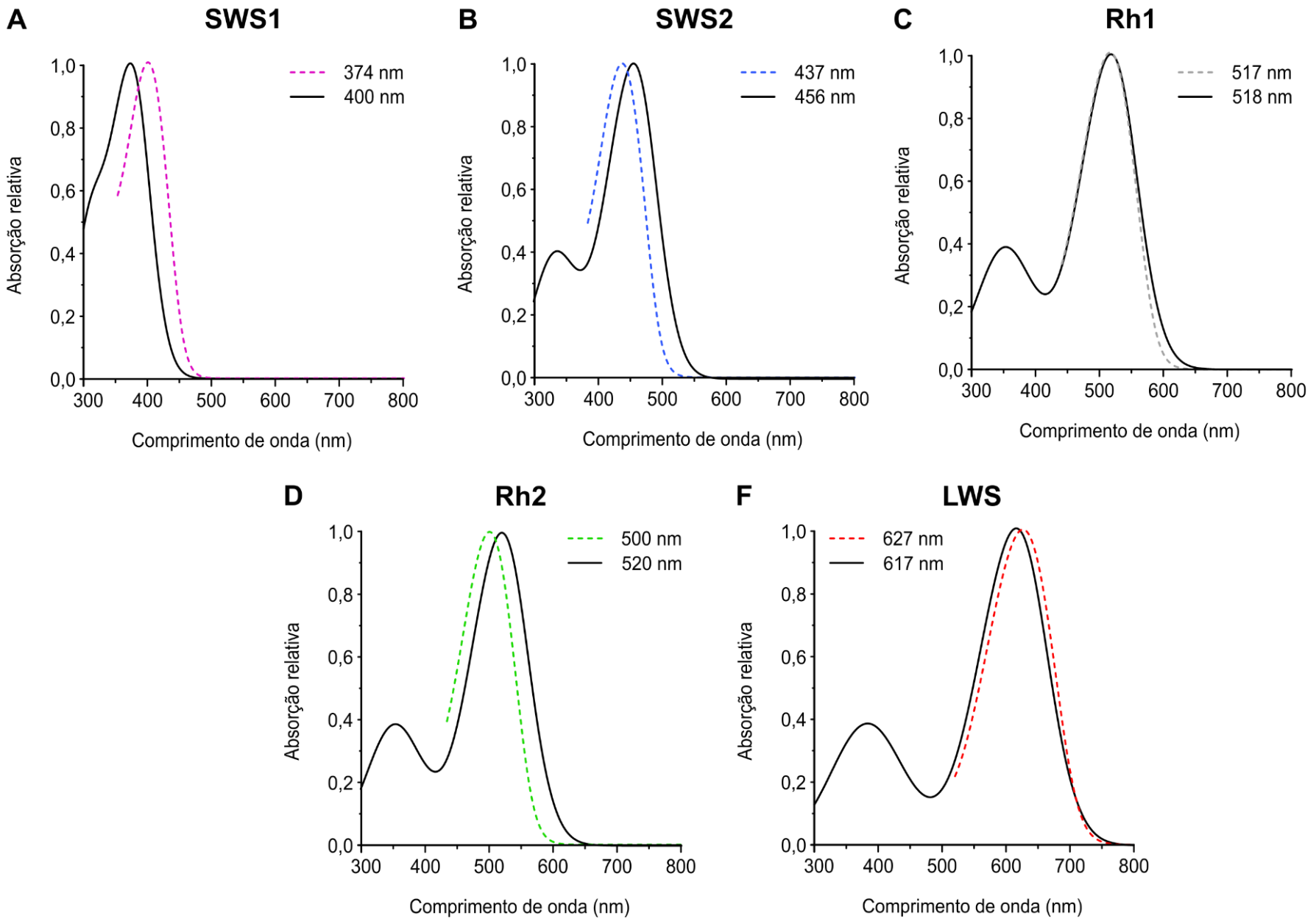


Figura 61 - Comparação das curvas de absorção espectral obtidas para os modelos computacionais dos pigmentos visuais de *T. s. elegans* com os resultados das análises genéticas realizadas pelo presente trabalho. Em todos os casos, exceto para a rodopsina (C), observaram-se divergências nos valores de λmax que variaram entre ~10 e 30 nm (nanômetro).

Considerando que a estimativa do espectro de absorção de proteínas tão complexas quanto as opsinas visuais a partir de métodos semiempíricos ou *Ab-initio* seja uma tarefa bastante custosa computacionalmente, alguns autores sugerem a possibilidade de que esta estimativa seja realizada a partir de características puramente estruturais. Patel e colaboradores (2018) utilizaram abordagens de mecânica molecular, consideravelmente menos custosa, para prever o λ_{max} de opsinas RH2 de peixes. Dois parâmetros principais foram considerados: (i) a raiz quadrada da flutuação média (*RMSF*) dos átomos do cromóforo, responsável por indicar o grau de liberdade do cromóforo na região de interação da proteína, e (ii) o ângulo de torção do anel β-ionona do cromóforo. A relação entre estes dois parâmetros estruturais associados ao cromóforo permitiu aos autores a criação de regressões lineares capazes de estimar o λ_{max} de opsinas do grupo RH2 na faixa entre 452-528 nm (Patel *et al*., 2018). Embora os autores tenham avaliado apenas a interação do cromóforo no contexto das opsinas RH2, esta abordagem abre precedentes para a utilização de técnicas de mecânica molecular para a estimativa *in silico* da absorção espectral dos demais pigmentos visuais dos vertebrados.

7. CONCLUSÕES

- A partir das análises genéticas realizadas neste estudo é possível concluir que os cinco genes de opsinas de vertebrados são expressos na retina da tartaruga-de-orelha-vermelha (*Trachemys scripta elegans*) (Testudine, Emydidae): *rh1*, *sws1*, *sws2*, *rh2* e *lws*. Os resultados das análises filogenéticas permitem concluir que os genes expressos são ortólogos aos genes de opsinas de vertebrados.
- A sensibilidade espectral de cada uma das opsinas visuais de *T. s. elegans* (SWS1, SWS2, RH1, RH2 e LWS) foi estimada com base nos aminoácidos encontrados em posições específicas consideradas como críticas na determinação da banda de absorbância espectral (λ_{max}) das opsinas. Os valores estimados foram próximos aos medidos em trabalhos anteriores, demonstrando que os resíduos críticos descritos na literatura para opsinas de outros vertebrados são válidos também para as cinco classes de pigmentos visuais de tartarugas.
- O deslocamento espectral causado pela presença do cromóforo 3,4-dehidroretinal nos pigmentos visuais de *T. s. elegans* foi estimado a partir da utilização da curva de calibração proposta pelo presente trabalho. Os valores obtidos apontam para a validação desta fórmula na conversão dos valores de absorção espectral de pigmentos visuais baseados na utilização do retinal para aqueles que utilizam o 3,4-dehidroretinal.
- O fotopigmento RH1 obteve λ_{max} estimado em ~518 nm. A estimativa realizada para este pigmento foi compatível com o λ_{max} determinado experimentalmente por MSP, apresentando entre 1 e 2 nm de diferença dos dados da literatura (Loew & Govardovskii, 2001; Liebman & Granda, 1971). Deste modo, pode-se verificar que as substituições D83N e M183L de fato contribuem com o deslocamento hipsocrômico de 2 nm na rodopsina de *T. s. elegans*, tal qual pode-se observar na rodopsina de mamíferos. A utilização do 11-cis-3,4-dehidroretinal leva a um deslocamento de ~21 nm.
- O λ_{max} do fotopigmento SWS1 de *T. s. elegans*, foi estimado na faixa do UV, em ~374 nm, a partir da presença dos aminoácidos F86, V52, M93, A109 e L116. O valor estimado foi compatível com o λ_{max} determinado por RI e MSP, diferindo em apenas ~2 nm dos valores medidos experimentalmente (Loew & Govardovskii, 2001; Zana *et al*, 2001; Ventura *et al*, 2001). Considerando que apenas a substituição V109A apresentou interferência conhecida sobre o

deslocamento espectral, conclui-se que o resíduo F86 apresenta, também em tartarugas, grande importância para a absorção da opsina na faixa do UV. A diferença de 2 nm observada entre os valores estimados por este trabalho e os medidos experimentalmente pode se referir a interferência, ainda desconhecida, causada pelas substituições T52V, T93M e M116L.

- Para o fotopigmento SWS2 foram analisados os aminoácidos presentes em 21 posições críticas, e o λ_{max} foi estimado em ~456 nm, diferindo em cerca de -5 e 2 nm dos valores mensurados por MSP (Loew & Govardovskii, 2001; Liebman & Granda, 1971). Tais diferenças podem ser decorrentes da interferência das demais substituições ou ainda, se referir a artefatos das diferentes técnicas de medições, uma vez que mesmo a literatura apresenta divergência em relação aos valores de absorção espectral desta opsina.
- O pigmento visual RH2 teve seu λ_{max} estimado em ~519 nm, diferindo em apenas 1 nm do valor medido experimentalmente por Loew & Govardovskii (2001) e por Liebman & Granda (1971), concluindo que o perfil de aminoácidos FLDMTQA confere à opsina RH2 de tartarugas a absorção máxima em 518 nm. A diferença de apenas 1 nm observada entre os valores provavelmente caracteriza-se como artefato decorrente da correção realizada pela curva de calibração aplicada.
- O λ_{max} da opsina LWS foi estimado em ~617 nm, o que corresponde ao valor medido por MSP (Loew & Govardovskii, 2001), validando desta forma a "regra dos cinco sítios" (Yokoyama & Radlwimmer, 1999) para a espécie analisada, bem como a correção aplicada considerando o cromóforo 3,4-dehidroretinal.
- Os modelos computacionais foram desenvolvidos a partir das técnicas de Modelagem Comparativa e Modelagem por *Threading*, indicando que ambas as metodologias são válidas para a modelagem das estruturas das opsinas visuais de vertebrados.
- As análises do espectro de absorção UV/visível de todos os modelos avaliados a partir da Teoria do Funcional da Densidade Tempo-Dependente (*Time Dependent Density Functional Theory* - TD-DFT) com funcional de correlação-troca B3LYP e conjunto de base 6-31G para o estudo do estado excitado, mostraram discrepâncias em relação aos valores apresentados pela literatura. Tais divergências podem ser resultantes de artefatos metodológicos envolvendo

o uso das técnicas de Modelagem Comparativa e Modelagem por *Threading* na elaboração da estrutura terciária dos modelos.

- O modelo desenvolvido para a rodopsina RH1 foi obtido a partir do método de Modelagem Comparativa e utilizou como "molde" a estrutura cristalográfica da rodopsina bovina. O modelo apresentou boa qualidade estrutural com grande parte dos aminoácidos dispostos em regiões altamente permissivas, como demonstrou o diagrama de Ramachandran. A análise do espectro de absorção UV/visível do complexo dehidroretinal-rodopsina, construído a partir da associação entre o 3,4-dehidroretinal e os 13 aminoácidos localizados em média a 4 angströms de distância, gerou um λ_{max} em ~517 nm, próximo ao valor de absorção espectral esperado, mostrando a validade do método de Modelagem Comparativa na obtenção da estrutura da rodopsina.
- Os modelos das opsinas SWS1, SWS2, RH2 e LWS foram construídos a partir do método de Modelagem por *Threading* e apresentaram boa qualidade estrutural, como demonstraram os diagramas de Ramachandran. A análise do espectro teórico de absorção espectral, entretanto, revelou valores relativamente distantes dos medidos experimentalmente em estudos anteriores. Para a opsina SWS1 foi estimado o λ_{max} em ~400 nm, para a opsina SWS2, em ~437 nm, para a opsina RH2, o valor estimado foi de ~500 nm, e para a opsina LWS, a estimativa foi de ~627 nm. Os resultados indicam, portanto, que outros aminoácidos, mais distantes do cromóforo, devam ser considerados em análises computacionais mais robustas.
- Os resultados obtidos neste estudo apontam para a complexidade estrutural das opsinas visuais, e como diferentes interações epistáticas podem influenciar a sensibilidade espectral de cada uma delas. Ainda que a análise teórica do λ_{max} das opsinas visuais destes vertebrados seja extremamente eficiente, o desconhecimento da interferência ocasionada por certas substituições de aminoácidos pode representar empecilhos para a estimativa precisa. Neste aspecto, o desenvolvimento de modelos *in silico* de opsinas visuais agrega um grande valor para a compreensão de suas estruturas, uma vez que nos permite calcular com certo grau de precisão a influência de determinadas mutações em seu fenótipo.

8. REFERÊNCIAS

Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindah, E. (2015). Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, *1–2*, 19–25. https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001

Abrahamson, E. W., Baumann, C., Bridges, C. D. B., Crescitelli, F., Dartnall, H. J. A., Eakin, R. M., Falk, G., Fatt, P., Goldsmith, T. H., Hara, R., Hara, T., Japar, S. M., Liebman, P. A., Lythgoe, J. N., Morton, R. A., Muntz, W. R. A., Rushton, W. A. H., Shaw, T. I., Wiesenfeld, J. R., & Yoshizawa, T. (1972). *Handbook of Sensory Physiology: Photochemistry of Vision: Vol. VII* (H. J. A. Dartnall (ed.); 1ª Edição). Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-642-65066-6

Adcock, S. A., & McCammon, J. A. (2006). Molecular dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chemical Reviews*, *106*(5), 1589–1615. https://doi.org/10.1021/cr040426m

Ali, M. A., & Klyne, M. A. (1985). *Vision in Vertebrates*. Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-9129-6

Allen, D. M., MacFarland, W. N., Munz, F. W., & Poston, H. A. (1973). Changes in the visual pigments of trout. *Canadian Journal of Zoology*, *51*(9), 901–914. https://doi.org/10.1139/z73-137

Allison, W. T., Haimberger, T. J., Hawryshyn, C. W., & Temple, S. E. (2004). Visual pigment composition in zebrafish: Evidence for a rhodopsin-porphyropsin interchange system. *Visual Neuroscience*, *21*(6), 945–952. https://doi.org/10.1017/S0952523804216145

Andrews, P. R., Craik, D. J., & Martin, J. L. (1984). Functional Group Contributions to Drug-Receptor Interactions. *Journal of Medicinal Chemistry*, *27*(12), 1648–1657. https://doi.org/10.1021/jm00378a021

Arnold, K., & Neumeyer, C. (1987). Wavelength discrimination in the turtle Pseudemys scripta elegans. *Vision Research*, *27*(9), 1501–1511.

Arroio, A., Honório, K. M., & Silva, A. B. F. da. (2010). Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. *Química Nova*, *33*(3), 694–699. https://doi.org/10.1590/s0100-40422010000300037

Bailes, H. J., Davies, W. L., Trezise, A. E., & Collin, S. P. (2007). Visual pigments in a living fossil, the Australian lungfish Neoceratodus forsteri. *BMC Evolutionary*

Biology, *7*(1), 200.

Barnes, S., & Kelly, M. E. M. (2002). Calcium channels at the photoreceptor synapse. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *514*, 465–476. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0121-3_28

Barreiro, E. J., Rodrigues, C. R., Albuquerque, M. G., Sant'Anna, C. M. R. de, & Alencastro, R. B. de. (1997). Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. *Química Nova*, *20*(3), 300–310. https://doi.org/10.1590/s0100-40421997000300011

Baylor, D. A., & Fettiplace, R. (1975). Light path and photon capture in turtle photoreceptors. *The Journal of Physiology*, *248*(2), 433–464. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1975.sp010983

Beatty, D. D. (1966). A study of the succession of visual pigments in Pacific salmon (Oncorhynchus). *Canadian Journal of Zoology*, *44*(3), 429–455. https://doi.org/10.1139/z66-045

Beatty, D. D. (1969). Visual pigment changes in juvenile kokanee salmon in response to thyroid hormones. *Vision Research*, *9*(8), 855–864. https://doi.org/10.1016/0042-6989(69)90093-5

Bellingham, J., Whitmore, D., Philp, A. R., Wells, D. J., & Foster, R. G. (2002). Zebrafish melanopsin: Isolation, tissue localisation and phylogenetic position. *Molecular Brain Research*, *107*(2), 128–136. https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00454-0

Berson, D. M. (2002). Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science*, *295*(5557), 1070–1073.

Bloch, N. I., Morrow, J. M., Chang, B. S. W., & Price, T. D. (2015). SWS2 visual pigment evolution as a test of historically contingent patterns of plumage color evolution in warblers. *Evolution*, *69*(2), 341–356. https://doi.org/10.1111/evo.12572

Booij, J. C., Baas, D. C., Beisekeeva, J., Gorgels, T. G. M. F., & Bergen, A. A. B. (2010). The dynamic nature of Bruch's membrane. *Progress in Retinal and Eye Research*, *29*(1), 1–18. https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2009.08.003

Bowie, J. U., Lüthy, R., & Eisenberg, D. (1991). A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional stucture. *Science*, *253*(5016), 164–170. https://doi.org/10.1126/science.1853201

Bowmaker, J. K., Dartnall, H. J., & Mollon, J. D. (1980). Microspectrophotometric

demonstration of four classes of photoreceptor in an old world primate, Macaca fascicularis. *The Journal of Physiology*, *298*(1), 131–143. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1980.sp013071

Bowmaker, J. K. J. K. (1995). The visual pigments of fish. *Progress in Retinal and Eye Research*, *15*(1), 1–31. https://doi.org/10.1016/1350-9462(95)00001-1

Bowmaker, J K, & Dartnall, H. J. (1980). Visual pigments of rods and cones in a human retina. *The Journal of Physiology*, *298*, 501–511.

Bowmaker, James K. (1991). The Evolution of Vertebrate Visual Pigments and Photoreceptors. In *Vision and Visual Disfunctions Vol. 2: Evolution of the Eye and Visual System*. Macmilla Press.

Bowmaker, James K. (2008). Evolution of vertebrate visual pigments. *Vision Research*, *48*(20), 2022–2041. https://doi.org/10.1016/j.visres.2008.03.025

Bridges, C. D. B. (1972). The Rhodopsin-Porphyropsin Visual System. In H. J. A. Dartnall (Ed.), *Photochemistry of Vision. Handbook of Sensory Physiology*. Springer Berlin Heidelberg.

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.

Cagle, F. R., & Chaney, A. H. (1950). Turtle Populations in Louisiana. *American Midland Naturalist*, *43*, 383–388.

Caprette, C. L. (2005). *Conquering the cold shudder: the origins and evolution of snakes eyes*. The Ohio State University.

Carleton, K. L., Escobar-Camacho, D., Stieb, S. M., Cortesi, F., & Justin Marshall, N. (2020). Seeing the rainbow: Mechanisms underlying spectral sensitivity in teleost fishes. *Journal of Experimental Biology*, *223*(8). https://doi.org/10.1242/jeb.193334

Castiglione, G. M., Schott, R. K., Hauser, F. E., & Chang, B. S. W. (2018). Convergent selection pressures drive the evolution of rhodopsin kinetics at high altitudes via nonparallel mechanisms. *Evolution*, *72*(1), 170–186. https://doi.org/10.1111/evo.13396

Chan, T., Lee, M., & Sakmar, T. P. (1992). Introduction of hydroxyl-bearing amino acids causes bathochromic spectral shifts in rhodopsin. Amino acid substitutions responsible for red-green color pigment spectral tuning. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(14), 9478–9480.

Cheng, C. L., & Novales Flamarique, I. (2004). New mechanism for modulating colour

vision. *Nature*, *428*(6980), 279–279. https://doi.org/10.1038/428279a

Chinen, A., Matsumoto, Y., & Kawamura, S. (2005a). Reconstitution of ancestral green visual pigments of zebrafish and molecular mechanism of their spectral differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, *22*(4), 1001–1010. https://doi.org/10.1093/molbev/msi086

Chinen, A., Matsumoto, Y., & Kawamura, S. (2005b). Spectral differentiation of blue opsins between phylogenetically close but ecologically distant goldfish and zebrafish. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(10), 9460–9466. https://doi.org/10.1074/jbc.M413001200

Clarke, G. L. (1939). The utilization of solar energy by aquatic organisms. In *Problems in Lake Biology* (pp. 27–38). Amer. Ass. Advanc. Sci. Publ.

Collin, S. P., Knight, M. A., Davies, W. L., Potter, I. C., Hunt, D. M., & Trezise, A. E. O. (2003). Ancient colour vision: Multiple opsin genes in the ancestral vertebrates. *Current Biology*, *13*(22), 864–865. https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.044

Collins, F. D., & Morton, R. A. (1950). Studies on Rhodopsin. *Biochemical Journal*, *47*(1), 3–10.

Cowing, J. A., Poopalasundaram, S., Wilkie, S. E., Robinson, P. R., Bowmaker, J. K., & Hunt, D. M. (2002). The molecular mechanism for the spectral shifts between vertebrate ultraviolet- and violet-sensitive cone visual pigments. *The Biochemical Journal*, *367*(Pt 1), 129–135.

Coyle, B. J., Hart, N. S., Carleton, K. L., & Borgia, G. (2012). Limited variation in visual sensitivity among bowerbird species suggests that there is no link between spectral tuning and variation in display colouration. *Journal of Experimental Biology*, *215*(7), 1090–1105. https://doi.org/10.1242/jeb.062224

Davies, W. I. 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.

Davies, W. L., Cowing, J. A., Carvalho, L. S., Potter, I. C., Trezise, A. E. O., Hunt, D. M., & Collin, S. P. (2007). Functional characterization, tuning, and regulation of visual pigment gene expression in an anadromous lamprey. *The FASEB Journal*, *21*(11), 2713–2724. https://doi.org/10.1096/fj.06-8057com

Davies, Wayne I.L., Collin, S. P., & Hunt, D. M. (2012). Molecular ecology and adaptation of visual photopigments in craniates. *Molecular Ecology*, *21*(13), 3121–3158. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05617.x

Davies, Wayne I.L., Zheng, L., Hughes, S., Katherine Tamai, T., Turton, M., Halford, S., Foster, R. G., Whitmore, D., & Hankins, M. W. (2011). Functional diversity of melanopsins and their global expression in the teleost retina. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *68*(24), 4115–4132. https://doi.org/10.1007/s00018-011-0785-4

Douglas, R. H., Partridge, J. C., & Marshall, N. J. (1998). The eyes of deep-sea fish I: Lens pigmentation, tapeta and visual pigments. *Progress in Retinal and Eye Research*, *17*(4), 597–636. https://doi.org/10.1016/S1350-9462(98)00002-0

Dreuw, A., & Head-Gordon, M. (2005). Single-reference ab initio methods for the calculation of excited states of large molecules. *Chemical Reviews*, *105*(11), 4009–4037. https://doi.org/10.1021/cr0505627

Ebrey, T. G., & Takahashy, Y. (2002). Photobiology of Retinal Proteins. In T. P. Coohill & D. P. Valenzeno (Eds.), *Photobiology for the 21st century* (pp. 101–133). Valdenmar Pub. Co.

Ebrey, T., & Koutalos, Y. (2001). Vertebrate Photoreceptors. *Progress in Retinal and Eye Research*, *20*(1), 49–94. https://doi.org/10.1016/S1350-9462(00)00014-8

Enright, J. M., Toomey, M. B., Sato, S. Y., Temple, S. E., Allen, J. R., Fujiwara, R., Kramlinger, V. M., Nagy, L. D., Johnson, K. M., Xiao, Y., How, M. J., Johnson, S. L., Roberts, N. W., Kefalov, V. J., Peter Guengerich, F., & Corbo, J. C. (2015). Cyp27c1 red-shifts the spectral sensitivity of photoreceptors by converting Vitamin A1 into A2. *Current Biology*, *25*(23), 3048–3057. https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.018

Ernst, C. H. (1972). Temperature-activity Relationship in the Painted Turtle, Chrysemys picta. *Copeia*, *1972*, 217–222.

Ernst, C. H. (1990). Systematics, Taxonomy, Variation, and Geografic Distribution of the Slider Turtle. In *Life, History and Ecology of the Slider Turtle* (pp. 57–67). Smithsonian Institution Press.

Ernst, C. H., & Barbour, R. W. (1989). *Turtles of the World* (1º). Smithsonian Institution Press.

Ewald, A., & Kühne, W. (1878). Untersuchungen tiber den Sehpurpur. *PhysioI. Inst. Heidelberg*, *1*, 248–290.

Fasick, J. I., Applebury, M. L., & Oprian, D. D. (2002). Spectral tuning in the mammalian short-wavelength sensitive cone pigments. *Biochemistry*, *41*(21), 6860–6865. https://doi.org/10.1021/bi0200413

Fasick, J. I., Lee, N., & Oprian, D. D. (1999). Spectral tuning in the human blue cone pigment. *Biochemistry*, *38*(36), 11593–11596. https://doi.org/10.1021/bi991600h

Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, *39*(4), 783–791. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x

Fox, N. K., Brenner, S. E., & Chandonia, J. M. (2015). The value of protein structure classification information-Surveying the scientific literature. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, *83*(11), 2025–2038. https://doi.org/10.1002/prot.24915

Ginalski, K. (2006). Comparative modeling for protein structure prediction. *Current Opinion in Structural Biology*, *16*(2), 172–177. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.02.003

Goede, P., & Kolb, H. (1994). Identification of the synaptic pedicles belonging to the different spectral types of photoreceptor in the turtle retina. *Vision Research*, *34*(21), 2801–2811. https://doi.org/10.1016/0042-6989(94)90049-3

Goldsmith, T. H., Collins, J. S., & Licht, S. (1984). The cone oil droplets of avian retinas. *Vision Research*, *24*(11), 1661–1671.

Govardovskii, V. I., Fyhrquist, N., Reuter, T., Kuzmin, D. G., & Donner, K. (2000). In search of the visual pigment template. *Visual Neuroscience*, *17*(4), 509–528. https://doi.org/10.1017/S0952523800174036

Granda, A. M., & Dvorak, C. A. (1977). Vision in Turtles. In F. Crescitelli (Ed.), *The Visual System in Vertebrates. Handbook of Sensory Physiology*. Springer Berlin Heidelberg.

Granda, A. M., & Haden, K. W. (1970). Retinal oil globule counts and distributions in two species of turtles:Pseudemys scripta elegans (Wied) andChelonia mydas mydas (Linnaeus). *Vision Research*, *10*(1), 79–84.

Grötzner, S. R. (2005). *Densidade e Topografia dos Fotorreceptores da Retina da Tartaruga Trachemys scripta elegans como Imunocitoquímica de Opsinas*. Universidade de São Paulo.

Grötzner, S. R., de 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*. https://doi.org/10.1002/cne.24830

Grötzner, S. R., Farias Rocha, F. A., Corredor, V. H., Liber, A. M. P., Hamassaki, D. E.,

Bonci, D. M. O., & Ventura, D. F. (2020). 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

Guillon, J. M., Guéry, L., Hulin, V., & Girondot, M. (2012). A large phylogeny of turtles (Testudines) using molecular data. *Contributions to Zoology*, *81*(3), 147–158. https://doi.org/10.1163/18759866-08103002

Gundertofte, K., Liljefors, T., Norrby, P. O., & Pettersson, I. (1996). A comparison of conformational energies calculated by several molecular mechanics methods. *Journal of Computational Chemistry*, *17*(4), 429–449. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199603)17:4<429::AID-JCC5>3.0.CO;2-W

Gutierrez, E. de A., Schott, R. K., Preston, M. W., Loureiro, L. O., Lim, B. K., & Chang, B. S. W. (2018). The role of ecological factors in shaping bat cone opsin evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *285*(1876). https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2835

Hall, T. A. (1999). *BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/ 98/ NT. Nucl. Acids. Symp. Ser.* (pp. 95–98).

Hauser, F. E., & Chang, B. S. (2017). Insights into visual pigment adaptation and diversity from model ecological and evolutionary systems. *Current Opinion in Genetics and Development*, *47*, 110–120. https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.09.005

Hauzman, E., Kalava, V., Oliveira Bonci, D. M., & Ventura, D. F. (2019). Characterization of the melanopsin gene (Opn4x) of diurnal and nocturnal snakes. *BMC Evolutionary Biology*, *19*(1), 174. https://doi.org/10.1186/s12862-019-1500-6

Hawryshyn, C. W., & Hárosi, F. I. (1994). Spectral Characteristics of Visual Pigments in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss). *Vision Research*, *34*(11), 1385–1392.

Hubbard, R., & Wald, G. (1952). Cis-trans isomers of vitamin A and retinene in the rhodopsin system. *The Journal of General Physiology*, *36*(2), 269–315. https://doi.org/10.1085/jgp.36.2.269

Hunt, D M, Dulai, K. S., Partridge, J. C., Cottrill, P., & Bowmaker, J. K. (2001). The molecular basis for spectral tuning of rod visual pigments in deep-sea fish. *The Journal of Experimental Biology*, *204*(Pt 19), 3333–3344.

Hunt, David M., Carvalho, L. S., Cowing, J. A., Parry, J. W. L., Wilkie, S. E., Davies,

W. L., & Bowmaker, J. K. (2007). Spectral Tuning of Shortwave-sensitive Visual Pigments in Vertebrates†. *Photochemistry and Photobiology*, *83*(2), 303–310. https://doi.org/10.1562/2006-06-27-ir-952

Hunt, David M., Dulai, K. S., Partridge, J. C., Cottrill, P., & Bowmaker, J. K. (2001). The molecular basis for spectral tuning of rod visual pigments in deep-sea fish. *Journal of Experimental Biology*, *204*(19), 3333–3344.

Jacobs, G H. (1993). The distribution and nature of colour vision among the mammals. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *68*(3), 413–471.

Jacobs, G H, & Rowe, M. P. (2004). Evolution of vertebrate colour vision. *Clinical & Experimental Optometry : Journal of the Australian Optometrical Association*, *87*(4–5), 206–216.

Jacobs, Gerald H. (2018). Photopigments and the dimensionality of animal color vision. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *86*(October), 108–130. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.12.006

Jakalian, A., Jack, D. B., & Bayly, C. I. (2002). Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *Journal of Computational Chemistry*, *23*(16), 1623–1641. https://doi.org/10.1002/jcc.10128

Jerlow, N. G. (1976). *Marine Optics*. Elsevier ScientificPublishing Company.

Johnsen, S. (2014). Hide and Seek in the Open Sea: Pelagic Camouflage and Visual Countermeasures. *Annual Review of Marine Science*, *6*(1), 369–392. https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135018

Jokela-Määttä, M., Smura, T., Aaltonen, A., Ala-Laurila, P., & Donner, K. (2007). Visual pigments of Baltic Sea fishes of marine and limnic origin. *Visual Neuroscience*, *24*(3), 389–398. https://doi.org/10.1017/S0952523807070459

Karplus, M., & McCammon, J. A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology*, *9*(9), 646–652. https://doi.org/10.1038/nsb0902-646

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*, 1–11. https://doi.org/10.1017/s0952523818000056

Kawamura, S., & Yokoyama, S. (1998). Functional characterization of visual and nonvisual pigments of American chameleon (Anolis carolinensis). *Vision Research*, *38*(1), 37–44. https://doi.org/10.1016/S0042-6989(97)00160-0

Kito, Y., Suzuki, T., Azuma, M., & Sekoguti, Y. (1968). Absorption spectrum of rhodopsin denatured with acid. In *Nature* (Vol. 218, Issue 5145, pp. 955–957). Nature Publishing Group.

Knegtel, R. M. A., Kuntz, I. D., & Oshiro, C. M. (1997). Molecular docking to ensembles of protein structures. *Journal of Molecular Biology*, *266*(2), 424–440. https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0776

Kolb, H. (1982). The Morphology of the Bipolar Cells, Amacrine Cells and Ganglion Cells in the Retina of the Turtle Pseudemys scripta elegans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *298*, 355–393.

Kolb, H., & Jones, J. (1982). Light and electron microscopy of the photoreceptors in the retina of the red-eared slider, Pseudemys scripta elegans. *Journal of Comparative Neurology*, *209*(4), 331–338. https://doi.org/10.1002/cne.902090402

Kolb, H., & Jones, J. (1987). The distinction by light and electron microscopy of two types of cone containing colorless oil droplets in the retina of the turtle. *Vision Research*, *27*(9), 1445–1458. https://doi.org/10.1016/0042-6989(87)90154-4

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096

Langmack, K., & Saibil, H. (1991). Signal transduction in photoreceptors. *Biochemical Society Transactions*, *19*(4), 858–860.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, *23*(21), 2947–2948. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404

Levenson, D. H., Ponganis, P. J., Crognale, M. A., Deegan, J. F., Dizon, A., & Jacobs, G. H. (2006). Visual pigments of marine carnivores: Pinnipeds, polar bear, and sea otter. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *192*(8), 833–843. https://doi.org/10.1007/s00359-006-0121-x

Lewars, E. (2011). *Compuational chemistry: Introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics*. Kluwer Academic Publishers.

Lieb, E. H., & Simon, B. (2005). The hartree-fock theory for coulomb systems. *The Stability of Matter: From Atoms to Stars: Fourth Edition*, *194*, 303–312. https://doi.org/10.1007/3-540-27056-6_21

Liebman, P. A., & Entine, G. (1968). Visual pigments of frog and tadpole (Rana pipiens). *Vision Research*, *8*(7), 761–775. https://doi.org/10.1016/0042-6989(68)90128-4

Liebman, P. A., & Granda, A. M. (1971a). Microspectrophotometric measurements of visual pigments in two species of turtle, Pseudemys scripta and Chelonia mydas. *Vision Research*, *11*(2), 105–114. https://doi.org/10.1016/0042-6989(71)90227-6

Liebman, P. A., & Granda, A. M. (1971b). Microspectrophotometric measurements of visual pigments in two species of turtle, Pseudemys scripta and Chelonia mydas. *Vision Research*, *11*(2), 105–114. https://doi.org/10.1016/0042-6989(71)90227-6

Lipetz, L. E., & MacNichol, E. F. J. (1982). Photoreceptors of freshwater turtles: Cells types and visual pigments. *The Biological Bulletin*, *163*.

Loew, E. R., & Govardovskii, V. I. (2001). Photoreceptors and visual pigments in the red-eared turtle, Trachemys scripta elegans. *Visual Neuroscience*, *18*(5), 753–757. https://doi.org/10.1017/S0952523801185081

Loew, Ellis R., & Dartnall, H. J. A. (1975). Vitamin A1/ A2 - Based Visual Pigment Mixtures in Cone of the Rudd. *Vision Research*, *16*, 891–896.

Lucas, R. J., Freedman, M., & Foster, R. G. (1999). Regulation of the mammalian pineal. *Science*, *284*(D), 1–4.

Lüthy, R., Bowie, J. U., & Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, *356*(6364), 83–85. https://doi.org/10.1038/356083a0

Lythgoe, J. N. (1972). The adaptation of visual pigments to their photic environment. In H. J. Dartnall (Ed.), *Handbook of Sensory physiology* (VII/1, pp. 566–603). Springer-Verlag Berlin.

Machado, E. (2011). *NATURDATA*.

McCammon, J. A., Gelin, B. R., & Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature*, *267*, 585–590.

McLachlan, A. D., & Ball, M. A. (1964). Time-Dependent Hartree-Fock Theory for Molecules. *Reviews of Modern Physics*, *36*(3), 844–855.

McPherson, A., & Gavira, J. A. (2014). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F:Structural Biology Communications*, *70*(1), 2–20. https://doi.org/10.1107/S2053230X13033141

Miyazaki, T., Kondrashev, S. L., Kasagi, S., Mizusawa, K., & Takahashi, A. (2017). Sequence and localization of an ultraviolet (sws1) opsin in the retina of the

Japanese sardine Sardinops melanostictus (Teleostei: Clupeiformes). *Journal of Fish Biology*, *90*(3), 954–967. https://doi.org/10.1111/jfb.13210

Moll, E. O., & Legler, J. M. (1971). The Life History of a Neotropical Slider Turtle, Pseudemys scripta, in Panama. *Bulletin of the Los Angeles Coontry Museum of Natural History Science*, *11*, 1–102.

Moritz, G. L., Lim, N. T. L., Neitz, M., Peichl, L., & Dominy, N. J. (2013). Expression and Evolution of Short Wavelength Sensitive Opsins in Colugos: A Nocturnal Lineage That Informs Debate on Primate Origins. *Evolutionary Biology*, *40*(4), 542–553. https://doi.org/10.1007/s11692-013-9230-y

Morris, G. M., Ruth, H., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, *30*(16), 2785–2791. https://doi.org/10.1002/jcc.21256

Motani, R. (2009). The Evolution of Marine Reptiles. *Evolution: Education and Outreach*, *2*(2), 224–235. https://doi.org/10.1007/s12052-009-0139-y

Musilova, Z., Cortesi, F., Matschiner, M., Davies, W. I. L., Patel, J. S., Stieb, S. M., De Busserolles, F., Malmstrøm, M., Tørresen, O. K., Brown, C. J., Mountford, J. K., Hanel, R., Stenkamp, D. L., Jakobsen, K. S., Carleton, K. L., Jentoft, S., Marshall, J., & Salzburger, W. (2019). Vision using multiple distinct rod opsins in deep-sea fishes. *Science*, *364*(6440), 588–592. https://doi.org/10.1126/science.aav4632

Nathans, J., & Hogness, D. S. (1983). Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell*, *34*(3), 807–814.

Nathans, J., & Hogness, D. S. (1984). Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(15), 4851–4855.

Nathans, J., Thomas, D., & Hogness, D. S. (1986). Molecular genetics of human color vision: the genes encoding blue, green, and red pigments. *Science (New York, N.Y.)*, *232*(4747), 193–202.

Neese, F. (2012). The ORCA program system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, *2*(1), 73–78. https://doi.org/10.1002/wcms.81

Neese, F. (2018). Software update: the ORCA program system, version 4.0. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, *8*(1), e1327. https://doi.org/10.1002/wcms.1327

Neumeyer, C., & Jäger, J. (1985). Spectral sensitivity of the freshwater turtle

Pseudemys scripta elegans: evidence for the filter-effect of colored oil droplets. *Vision Research*, *25*(6), 833–838.

Northmore, D. P. M., & Granda, A. M. (1991). Refractive State, Contrast Sensitivity, And Resolution In The Freshwater Turtle, Pseudemys Scripta Elegans, Determined By Tectal Visual-Evoked Potentials. *Visual Neuroscience*, *7*(6), 619–625. https://doi.org/10.1017/S0952523800010403

Okano, T., Kojima, D., Fukada, Y., Shichida, Y., & Yoshizawa, T. (1992). Primary structures of chicken cone visual pigments: Vertebrate rhodopsins have evolved out of cone visual pigments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(13), 5932–5936. https://doi.org/10.1073/pnas.89.13.5932

Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: a review. *Biophysical Reviews*, *9*(2), 91–102. https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1

Palacios, A. G., Varela, F. J., Srivastava, R., & Goldsmith, T. H. (1998). Spectral sensitivity of cones in the goldfish, Carassius auratus. *Vision Research*, *38*, 2135–2146.

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., & Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, *289*(5480), 739–745. https://doi.org/10.1126/science.289.5480.739

Palczewski, Krzysztof. (2012). Chemistry and biology of vision. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(3), 1612–1619. https://doi.org/10.1074/jbc.R111.301150

Páll, S., Abraham, M. J., Kutzner, C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). Tackling Exascale Software Challenges in Molecular Dynamics Simulations with GROMACS. In S. Markidis & E. Laure (Eds.), *Solving Software Challenges for Exascale* (Vol. 8759, pp. 3–27). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-15976-8

Parmenter, R., & Avery, H. W. (1990). The Feeding Ecology of the Slider Turtle. In *Life, History and Ecology of the Slider Turtle* (pp. 257–266). Smithsonian Institution Press.

Parr, R. G. (1980). Horizons of Quantum Chemistry. In K. Fukui & B. Pullman (Eds.), *Horizons of Quantum Chemistry*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-009-9027-2

Parry, J. W. L., & Bowmaker, J. K. (2000). Visual pigment reconstitution in intact

goldfish retina using synthetic retinaldehyde isomers. *Vision Research*, *40*(17), 9–15. https://doi.org/10.1016/S0042-6989(00)00101-2

Patel, A. B., Crocker, E., Eilers, M., Hirshfeld, A., Sheves, M., & Smith, S. O. (2004). Coupling of retinal isomerization to the activation of rhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(27), 10048–10053. https://doi.org/10.1073/pnas.0402848101

Patel, J. S., Brown, C. J., Ytreberg, F. M., & Stenkamp, D. L. (2018). Predicting peak spectral sensitivities of vertebrate cone visual pigments using atomistic molecular simulations. *PLoS Computational Biology*, *14*(1), 1–15. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005974

Peterson, E. H., & Ulinski, P. S. (1979). Quantitative Studies of Retinal Ganglion Cells in a Turtle, Pseudemys scripta elegans. I Number and Distribution of Ganglion Cells. *Journal of Comparative Neurology*, *186*, 17–42. https://doi.org/10.1002/cne.901860103

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, *25*(13), 1605–1612. https://doi.org/10.1002/jcc.20084

Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W. J., Hayes, W. P., & Rollag, M. D. (1998). Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(1), 340–345.

Provencio, Ignacio, Rodriguez, I. R., Jiang, G., Hayes, W. P., Moreira, E. F., & Rollag, M. D. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *Journal of Neuroscience*, *20*(2), 600–605. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-02-00600.2000

Rambaut, A. (2007). *FigTree - Molecular Evolution, Phylogenetics and Epidemiology*. http://tree.bio.ed.ac.uk

Ramón y Cajal, S. (1893). La Rétine des Vertebrés. *La Cellule*, *9*, 17–257.

Reuter, T. E., White, R. H., & Wald, G. (1971). Rhodopsin and porphyropsin fields in the adult bullfrog retina. *Journal of General Physiology*, *58*(4), 351–371. https://doi.org/10.1085/jgp.58.4.351

Rigsby, R. E., & Parker, A. B. (2016). Using the PyMOL application to reinforce visual understanding of protein structure. *Biochemistry and Molecular Biology Education : A Bimonthly Publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, *44*(5), 433–437. https://doi.org/10.1002/bmb.20966

Robinson, J., Schmitt, E. A., Hárosi, F. I., Reece, R. J., & Dowling, J. E. (1993). Zebrafish ultraviolet visual pigment: Absorption spectrum, sequence, and localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(13), 6009–6012. https://doi.org/10.1073/pnas.90.13.6009

Rocha, F. A. F., Saito, C. A., Silveira, L. C. L., De Souza, J. M., & Ventura, D. F. (2008). Twelve chromatically opponent ganglion cell types in turtle retina. *Visual Neuroscience*, *25*(3), 307–315. https://doi.org/10.1017/S0952523808080516

Rocha, G. B. (2010). *Métodos semiempíricos para o tratamento de sistemas macromoleculares: de compostos de coordenação a proteínas*. http://www.emmsb.lncc.br/vemmsb/vemmsb_teorico/Gerd.pdf

Rodieck, R. W. (1998). The First Steps in Seeing. In *Archives of Ophthalmology* (1st ed.). Sinauer Associates.

Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, *19*(12), 1572–1574. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180

Runge, E., & Gross, K. U. (1984). Density-Functional Theory for Time-Dependent Systems. *Physical Review Letters*, *52*(12). https://doi.org/10.1103/PhysRevA.34.529

Ruttner, F., Frey, D. G., & Fry, F. E. J. (1953). *Fundamentals of Limnology*. University of Toronto Press.

Saarinen, P. (2012). *Functional properties of visual pigments using A1 and A2 chromophore: from molecules to ecology* (Issue August). University of Helsinki.

Sakmar, T. P., & Fahmy, K. (1995). Properties and Photoactivity of Rhodopsin Mutants. *Israel Journal of Chemistry*, *35*(3–4), 325–337. https://doi.org/10.1002/ijch.199500034

Savelli, I., Novales Flamarique, I., Iwanicki, T., & Taylor, J. S. (2018). Parallel opsin switches in multiple cone types of the starry flounder retina: Tuning visual pigment composition for a demersal life style. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-018-23008-y

Schlick, T. (2006). Molecular modeling and simulation: an interdisciplinary guide. In S. S. Antman, J. E. Marden, & L. Sirovich (Eds.), *Transport* (2nd Editio, Vol. 8). Springer. http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-0-387-75847-3

Schwanzara, S. A. (1967). The visual pigments of freshwater fishes. *Vision Research*, *7*(3–4), 121–148. https://doi.org/10.1016/0042-6989(67)90079-x

Seidel, M. E., & Smith, H. M. (1986). Chrysemys, Pseudemys, Trachemys (Testudines: Emididae): Did Agassiz have it Right? *Herpetologica*, *42*, 242–248.

Soteras Gutiérrez, I., Lin, F. Y., Vanommeslaeghe, K., Lemkul, J. A., Armacost, K. A., Brooks, C. L., & MacKerell, A. D. (2016). Parametrization of halogen bonds in the CHARMM general force field: Improved treatment of ligand–protein interactions. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *24*(20), 4812–4825. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.06.034

Stavenga, D. G., & Wilts, B. D. (2014). Oil droplets of bird eyes: Microlenses acting as spectral filters. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *369*(1636). https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0041

Stone, J. E., Phillips, J. C., Freddolino, P. L., Hardy, D. J., Trabuco, L. G., & Schulten, K. (2007). Accelerating molecular modeling applications with graphics processors. *Journal of Computational Chemistry*, *28*, 2618–2640. https://doi.org/10.1002/jcc

Takahashi, Y., & Ebrey, T. G. (2003). Molecular basis of spectral tuning in the newt short wavelength sensitive visual pigment. *Biochemistry*, *42*(20), 6025–6034. https://doi.org/10.1021/bi020629+

Takenaka, N., & Yokoyama, S. (2007). Mechanisms of spectral tuning in the RH2 pigments of Tokay gecko and American chameleon. *Gene*, *399*(1), 26–32. https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.04.036. Mechanisms

Tegge, A. N., Wang, Z., & Cheng, J. (2010). Integrative Protein Fold Recognition by Alignments and Machine Learning. In *Introduction to Protein Structure Prediction: Methods and Algorithms* (pp. 195–218). Wiley. https://doi.org/10.1002/9780470882207.ch9

Temple, S. E., Plate, E. M., Ramsden, S., Haimberger, T. J., Roth, W. M., & Hawryshyn, C. W. (2006). Seasonal cycle in vitamin A1/A2-based visual pigment composition during the life history of coho salmon (Oncorhynchus kisutch). *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *192*(3), 301–313. https://doi.org/10.1007/s00359-005-0068-3

Temple, S. E., Veldhoen, K. M., Phelan, J. T., Veldhoen, N. J., & Hawryshyn, C. W. (2008). Ontogenetic changes in photoreceptor opsin gene expression in coho salmon (Oncorhynchus kisutch, Walbaum). *Journal of Experimental Biology*, *211*(24), 3879–3888. https://doi.org/10.1242/jeb.020289

Temple, Shelby E., Ramsden, S. D., Haimberger, T. J., Veldhoen, K. M., Veldhoen, N.

J., Carter, N. L., Roth, W. M., & Hawryshyn, C. W. (2008). Effects of exogenous thyroid hormones on visual pigment composition in coho salmon (Oncorhynchus kisutch). *Journal of Experimental Biology*, *211*(13), 2134–2143. https://doi.org/10.1242/jeb.009365

Thiel, W. (1988). Semiempirical methods: current status and perspectives. *Tetrahedron*, *44*(24), 7393–7408. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)86235-9

Toomey, M. B., Collins, A. M., Frederiksen, R., Cornwall, M. C., Timlin, J. A., & Corbo, J. C. (2015). A complex carotenoid palette tunes avian colour vision. *Journal of the Royal Society Interface*, *12*(111). https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0563

Toomey, M. B., & Corbo, J. C. (2017). Evolution, development and function of vertebrate cone oil droplets. *Frontiers in Neural Circuits*, *11*(December), 1–17. https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00097

Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, *31*(2), 455–461. https://doi.org/10.1002/jcc.21334

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, *40*(15), e115–e115.

Urtz, P., & Hošek, J. (2020). *The Reptile Database*. http://www.reptile-database.org

Van Nynatten, A., Janzen, F. H., Brochu, K., Maldonado-Ocampo, J. A., Crampton, W. G. R., Chang, B. S. W., & Lovejoy, N. R. (2019). To see or not to see: Molecular evolution of the rhodopsin visual pigment in Neotropical electric fishes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *286*(1906). https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1182

Vanommeslaeghe, K., & MacKerell, A. D. (2012). Automation of the CHARMM general force field (CGenFF) I: Bond perception and atom typing. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *52*(12), 3144–3154. https://doi.org/10.1021/ci300363c

Vanommeslaeghe, K., Raman, P., & MacKerell, A. D. (2012). Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: Assignment of Bonded Parameters and Partial Atomic Charges. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *52*(12), 3155–3168. https://doi.org/10.1021/ci300363c

Ventura, D. F., Zana, Y., De Souza, J. M., & Devoe, R. D. (2001). Ultraviolet colour opponency in the turtle retina. *Journal of Experimental Biology*, *204*(14), 2527–2534.

Ventura, Dora Fix, De Souza, J. M., Devoe, R. D., & Zana, Y. (1999). UV responses in the retina of the turtle. *Visual Neuroscience*, *16*(2), 191–204. https://doi.org/10.1017/S0952523899162011

Vorobyev, M. (2003). Coloured oil droplets enhance colour discrimination. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(1521), 1255–1261. https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2381

Vorobyev, M., Osorio, D., Bennett, A. T. D., Marshall, N. J., & Cuthill, I. C. (1998). Tetrachromacy, oil droplets and bird plumage colours. *Journal of Comparative Physiology - A Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *183*(5), 621–633. https://doi.org/10.1007/s003590050286

Wald, G. (1935). Carotenoids and the Visual Cycle. *The Journal of General Physiology*, *19*(2), 351–371. https://doi.org/10.1085/jgp.19.2.351

Wald, G. (1938). On the Distribution of Vitamins A1 and A2. *The Journal of General Physiology*, *22*(3), 391–415. https://doi.org/10.1085/jgp.22.3.391

Wald, G. (1939). The Porphyropsin Visual System. *The Journal of General Physiology*, *22*(6), 775–794. https://doi.org/10.1085/jgp.22.6.775

Wald, G. (1955). The photoreceptor process in vision. *American Journal of Ophthalmology*, *40*(5 PART 2), 18–41. https://doi.org/10.1016/0002-9394(55)91835-3

Wald, G. (1957). The Metamorphosis of Visual Systems in the Sea Lamprey. *The Journal of General Physiology*, *40*(6), 901–914. https://doi.org/10.1085/jgp.40.6.901

Wald, G. (1968). Molecular Basis of Visual Excitation. *Science*, *162*(3850).

Wald, G., Brown, P. K., & Smith, P. H. (1953). Cyanopsin, a new pigment of cone vision. *Science*, *118*(3070), 505–508. https://doi.org/10.1126/science.118.3070.505

Wald, G., Brown, P. K., & Smith, P. H. (1958). On the chromophores of the visual pigments. In *Visual problems of colour 1* (pp. 153–169).

Walls, G. L., & Judd, H. D. (1933). The Intra-ocular Colour-Filters of Vertebrates. *British Journal of Ophthalmology*, *17*(11), 641–675.

Walls, Gordon L. (1942). *The vertebrate eye and its adaptive radiation*. Cranbrook Press.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W296–W303. https://doi.org/10.1093/nar/gky427

Wied-Neuwied, M. A. P. (1839). *Reise in das innere Nord-America in den Jahren 1832 bis 1834;* (C. Hoelscher (ed.)). Bei J. Hœlscher.

Wilkie, S. E., Robinson, P. R., Cronin, T. W., Poopalasundaram, S., Bowmaker, J. K., & Hunt, D. M. (2000). Spectral tuning of avian violet- and ultraviolet-sensitive visual pigments. *Biochemistry*, *39*(27), 7895–7901. https://doi.org/10.1021/bi992776m

Wilt, F. H. (1959). The differentiation of visual pigments in metamorphosing larvae of Rana catesbeiana. *Developmental Biology*, *1*(2), 199–233. https://doi.org/10.1016/0012-1606(59)90026-0

Wright, D. S., van Eijk, R., Schuart, L., Seehausen, O., Groothuis, T. G. G., & Maan, M. E. (2019). Testing sensory drive speciation in cichlid fish: Linking light conditions to opsin expression, opsin genotype and female mate preference. *Journal of Evolutionary Biology*, *June*, 1–13. https://doi.org/10.1111/jeb.13577

Wu, S., & Zhang, Y. (2007). LOMETS: A local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic Acids Research*, *35*(10), 3375–3382. https://doi.org/10.1093/nar/gkm251

Yazulla, S. (1976). Cone input to horizontal cells in the turtle retina. *Vision Research*, *16*(7), 727–735. https://doi.org/10.1016/0042-6989(76)90183-8

Yokoyama, S. (1997). Molecular genetic basis of adaptive selection: examples from color vision in vertebrates. *Annual Review of Genetics*, *31*, 315–336.

Yokoyama, S, & Radlwimmer, F. B. (1999). The molecular genetics of red and green color vision in mammals. *Genetics*, *153*(2), 919–932.

Yokoyama, S, Zhang, H., Bernhard, F., & Blow, N. S. (1999). Adaptive evolution of color vision of the comon coelacanth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *96*(May), 6279–6284.

Yokoyama, Shozo. (1996). Molecular evolution of retinal and nonretinal opsins. *Genes to Cells*, *1*(9), 787–794. https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.d01-273.x

Yokoyama, Shozo. (2000). Molecular evolution of vertebrate visual pigments. In *Progress in Retinal and Eye Research* (Vol. 19, Issue 4).

https://doi.org/10.1016/S1350-9462(00)00002-1

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

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

Yokoyama, Shozo, Blow, N. S., & Radlwimmer, F. B. (2000). Molecular evolution of color vision of zebra finch. *Gene*, *259*(1–2), 17–24. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00435-2

Yokoyama, Shozo, Radlwimmer, F. B., & Kawamura, S. (1998). Regeneration of ultraviolet pigments of vertebrates. *FEBS Letters*, *423*(2), 155–158. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00086-6

Yokoyama, Shozo, Starmer, W., Takahashi, Y., & Tada, T. (2006). Tertiary structure and spectral tuning of UV and violet pigments in vertebrates. *Gene*, *365*, 95–103. https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.09.028. Tertiary

Yokoyama, Shozo, & Tada, T. (2003). The spectral tuning in the short wavelength-sensitive type 2 pigments. *Gene*, *306*(1–2), 91–98. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00424-4

Yokoyama, Shozo, Tada, T., Liu, Y., Faggionato, D., & Altun, A. (2016). A simple method for studying the molecular mechanisms of ultraviolet and violet reception in vertebrates. *BMC Evolutionary Biology*, *16*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/s12862-016-0637-9

Yokoyama, Shozo, Takenaka, N., & Blow, N. S. (2007). A novel spectral tuning in the short wavelength-sensitive (SWS1 and SWS2) pigments of bluefin killifish (Lucania goodei). *Gene*, *396*(1), 196–202. https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.03.019

Yokoyama, Shozo, & Yokoyama, R. (1996). Adaptive evolution of photoreceptors and visual pigments in vertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *27*, 543–567. https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.543

Zana, Y., Ventura, D. F., De Souza, J. M., & Devoe, R. D. (2001). Tetrachromatic input to turtle horizontal cells. *Visual Neuroscience*, *18*(5), 759–765. https://doi.org/10.1017/S0952523801185093

Zhao, H., Ru, B., Teeling, E. C., Faulkes, C. G., Zhang, S., & Rossiter, S. J. (2009). Rhodopsin molecular evolution in mammals inhabiting low light environments.

PLoS ONE, *4*(12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008326

Zheng, W., Zhang, C., Wuyun, Q., Pearce, R., Li, Y., & Zhang, Y. (2019). LOMETS2: improved meta-threading server for fold-recognition and structure-based function annotation for distant-homology proteins. *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), W429–W436. https://doi.org/10.1093/nar/gkz384

9. APÊNDICE I

9.1. Modelagem Molecular

A modelagem molecular, de modo geral, trata de simulações químicas e biológicas em ambiente computacional (*in silico*), onde são utilizados modelos atomísticos que, associados a uma série de cálculos distintos, tentam prever o comportamento de átomos e moléculas em determinados sistemas, possibilitando a compreensão de propriedades estruturais/eletrônicas e físico-químicas destes sistemas, dependendo do método a ser utilizado (Abraham *et al*., 2015; Páll *et al*., 2015). Configuram-se, portanto, como um termo coletivo capaz de englobar uma série de técnicas que visam mimetizar o comportamento de moléculas por meio de modelos simplificados. A aplicação e o desenvolvimento de tais aproximações podem ser classificados em categorias que levam em consideração diferentes pressupostos.

A criação de um modelo computacional de uma estrutura molecular qualquer, permite isolá-la e "congelá-la". Tal possibilidade admite que propriedades deste sistema possam ser medidas e seu comportamento químico estudado com relativa facilidade (Barreiro *et al*., 1997). Por se tratar de exercícios teóricos, que consideram diferentes pressupostos, a aplicação de diferentes métodos de modelagem deve ser restrita às propriedades do sistema em questão. Via de regra, a quantidade de átomos em um determinado sistema influencia diretamente na exigência de maior poder computacional, demandando maior tempo de cálculo (Adcock & McCammon, 2006; McCammon *et al*., 1977; Stone *et al*., 2007).

Deste modo, diferentes métodos de cálculo podem ser aplicados a sistemas moleculares dependendo da estratégia adotada. De modo geral, tais métodos tendem a diferir principalmente em relação à natureza do campo de força adotado, ou seja, em relação ao conjunto de funções matemáticas de energia e parâmetros numéricos associados (Barreiro *et al*., 1997). É possível distribuir os diferentes métodos adotados em química computacional em três grandes grupos: (i) Método *ab initio*, baseado em princípio de mecânica quântica e da aproximação da solução numérica da Equação de Schrödinger (Dreuw & Head-Gordon, 2005); (ii) Métodos Semiempíricos, caracterizados como métodos baseados no formalismo da teoria de Hartree-Fock, ou teoria dos orbitais, que pressupõe que os elétrons são capazes de se movimentares de forma independente em campos de núcleos que são considerados fixos (Thiel, 1988); (iii) Mecânica Molecular, método empírico responsável por considerar os átomos de um

determinado sistema como esferas maciças e as ligações entre os átomos como molas (Gundertofte *et al*., 1996).

9.1.1. Modelagem Estrutural de Proteínas

A estrutura de uma proteína pode ser investigada, a priori, por meio da aplicação de técnicas de cristalografia associadas a difração de Raios-X e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Entretanto, a complexidade do processo de cristalização, dificulta ou, em alguns casos, impossibilita a análise da estrutura proteica por intermédio destes métodos (McPherson & Gavira, 2014). Além de problemas com a cristalização da macroestrutura proteica, as análises utilizando RMN ficam limitadas a proteínas de até aproximadamente 35 kDa, uma vez que a velocidade de decaimento radioativo para proteínas muito grandes é demasiadamente lenta, tornando a observação por ressonância muito demorada e de difícil observação (Schlick, 2006). O conjunto destas dificuldades associada com um número crescente de sequências primárias depositadas em bancos de dados, torna extremamente necessário o desenvolvimento de novas técnicas capazes de predizer as conformações tridimensionais destas proteínas. Em bioinformática, a modelagem estrutural de proteínas baseada em sua sequência primária, permite inferir a posição mais provável dos aminoácidos levando, portanto, à construção de modelos computacionais coerentes capazes de estimar as suas conformações biológicas (Schlick, 2006). Diferentes métodos podem ser aplicados com o intuito de estimar a conformação espacial de uma proteína.

9.1.1.1. Modelagem Comparativa

A técnica de Modelagem Comparativa (MC) é capaz de utilizar uma proteína, cuja estrutura seja conhecida como molde para a construção de um modelo da organização tridimensional de proteínas que apresentem uma boa identidade de sequência. Por ser uma técnica muito dependente do alinhamento e da similaridade entre determinadas sequências proteicas, a precisão das informações obtidas com modelos de MC tende a depender da proximidade evolutiva entre a estrutura molde e a estrutura alvo. Apresentando cerca de 50% de identidade de sequência, por exemplo, a estrutura molde e a estrutura alvo, ou modelo, tendem a apresentar variação no Desvio da Raiz Média Quadrática, ou *Root-Mean-Square Desviation* (RMSD) de aproximadamente 1 Å (**Figura 62 A**) (Ginalski, 2006; Schlick, 2006). De 30 a 50% de

identidade de sequência, molde e modelo coincidem em ~80-90% de suas estruturas terciária, com RMSD variando entre 2 e 3 Å (**Figura 62 B**) (Ginalski, 2006; Schlick, 2006) e erros localizados, principalmente, nas regiões das alças da proteína alvo. Com identidade de sequência inferior a 30%, entretanto, as semelhanças entre as estruturas caem para ~55% (**Figura 62 C**). Abaixo de 20% menos da metade dos resíduos permanecem desalinhados (Ginalski, 2006; Schlick, 2006).

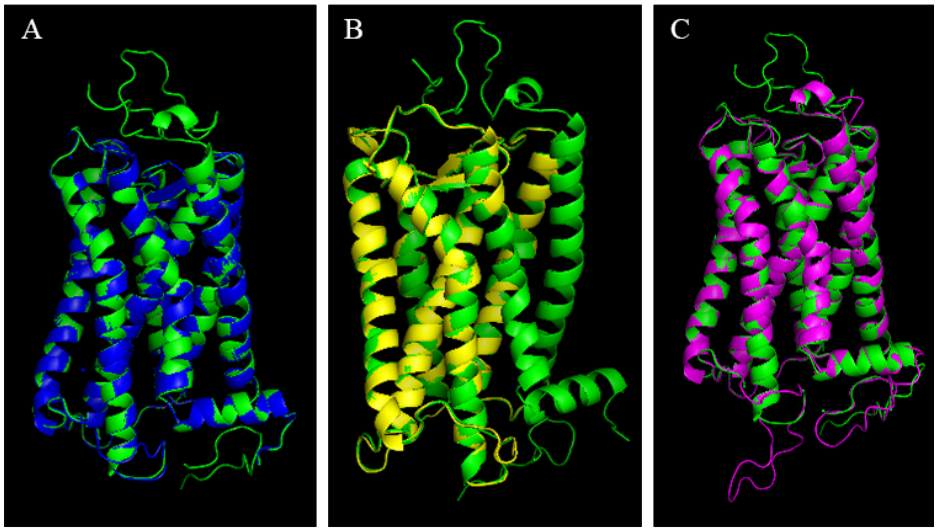


Figura 62 - Comparação de modelos de opsinas oriundas de diferentes espécies, criados a partir do método de Modelagem Comparativa. Todos os modelos utilizaram a estrutura da rodopsina bovina (verde; Nº de acesso no *PDB*: 1F88) como *template*. **(A)** Modelo da rodopsina RH1 da tartaruga *T. s. elegans* (azul) sobreposta à estrutura da rodopsina bovina (verde). Ambas as estruturas, modelo e molde, apresentaram 86% de identidade de sequência. Como pode ser observado, as estruturas se sobrepõem com alto grau de precisão. **(B)** Estrutura da opsina SWS1 da tartaruga *T. s. elegans* (amarelo) sobreposta à estrutura da rodopsina bovina (verde). Ambas as estruturas, molde e modelo, apresentaram 47% de identidade de sequência. Apesar de a identidade de sequência, neste caso ser quase a metade da observada na situação anterior, ambas as estruturas apresentam um alto grau de sobreposição. **(C)** Estrutura da rodopsina RH1 da mosca *Bactrocera dorsalis* (magenta; Nº acesso no GenBank: NM_001304973.1) sobreposta à estrutura da rodopsina bovina (verde). Ambas as estruturas, molde e modelo, apresentaram 29% de identidade de sequência. Pode ser observado que as estruturas apresentam um maior grau de desalinhamento focado, principalmente na região das alças da proteína. Todos os modelos foram construídos com o auxílio do servidor SwissModel. A sobreposição das estruturas foi realizada com o auxílio do *software* PyMol.

9.1.1.2. Modelagem Estrutural por *Threading*

A técnica de modelagem estrutural por *Threading* baseia-se no padrão de enovelamento das estruturas proteicas já elucidadas. Por desconsiderar a existência de estruturas homólogas, tal técnica permite que sejam elucidadas as estruturas de proteínas de grande porte partindo-se do pressuposto de que a estrutura terciária das proteínas apresenta maior conservação que é ainda mais restritivo ao se considerar a estrutura secundária (Fox *et al*., 2015; Schlick, 2006). A técnica busca determinar o padrão de dobras de uma determinada sequência comparando-a com dobras depositadas

em bancos de dados, como o SCOPe (https://scop.berkeley.edu). Existem duas abordagens distintas englobadas por esta metodologia: baseada em critérios de energia ou baseada em perfis. A primeira abordagem alinha a sequência problema com cada uma das dobras presentes no banco de dados, selecionando os padrões de dobras que apresentarem as menores energias. Os modelos são, então, novamente avaliados e ranqueados considerando-se, desta vez, as energias de solvatação e hidrofóbicas. É selecionado o modelo que apresentar a menor energia final (Tegge *et al*., 2010).

As abordagens baseadas em perfis iniciam-se com a superposição da sequência problema com estruturas secundárias do banco de dados gerando uma série de informações estatísticas acerca da posição dos aminoácidos, chamadas de perfis. Os perfis estabelecem uma pontuação para cada aminoácido pertencente ao sistema em relação à estrutura de referência. Também são determinadas pontuações para a exposição da estrutura a solventes, em relação à polaridade e à hidrofobicidade de cada aminoácido. A estrutura da sequência problema é então modelada em função de sua possível estrutura secundária, acessibilidade ao solvente e polaridade. Tais informações são comparadas aos perfis criados e aquele que melhor se adequar é selecionado como *template* (Tegge *et al*., 2010).

9.1.2. Docagem Molecular

É denominado como docagem molecular (do inglês: *molecular docking*) o processo de atracação de duas ou mais moléculas, geralmente um receptor e um ligante, responsável por determinar a existência de interações energéticas favoráveis (Knegtel *et al*., 1997; Pagadala *et al*., 2017). Assim, os algoritmos aplicados ao estudo de *docking* são capazes de avaliar as melhores conformações em função de energia e posicionamento (Knegtel *et al*., 1997; Pagadala *et al*., 2017). Tendo em vista que os procedimentos de *docking* são capazes de determinar as melhores posições de um determinado ligante, em termos de posicionamento e energia, em relação a complementaridade eletrostática e de *Van der Waals*, buscando a maximização das interações moleculares, o ligante e o receptor formam um complexo por complementariedade estrutural e estabilização energética (Knegtel *et al*., 1997; Pagadala *et al*., 2017). A qualidade do atracamento molecular é avaliada segundo a Equação: $E_{docking} = E_{inter}+E_{intra}$. Onde a Energia de Interação E_{inter} refere-se a energia de interação entre o receptor e o ligante, baseada nas interações de Van der Waals e eletrostáticas. O termo seguinte (E_{intra}) relaciona-se aos graus de liberdade apresentados

pelos ligantes. Via de regra, quanto menor a energia de *docking* melhor será a qualidade do atracamento molecular (Knegtel *et al*., 1997; Pagadala *et al*., 2017).

9.1.3. Dinâmica Molecular

A Dinâmica Molecular (DM) faz parte do que é denominado Mecânica Molecular e fundamenta-se na determinação da trajetória dos átomos que compõem determinado sistema. A trajetória atômica será pautada na evolução da posição dos átomos ao longo do tempo segundo a resolução das equações de movimento de Newton, segundo a equação $\vec{F}_{xi} = \frac{\partial}{\partial t}\left(\frac{\partial x_i}{\partial x}\right).m_i = \frac{\Delta v_i}{\Delta t}.m_i = a_i.m_i$. Onde m_i e a_i representam a massa e a aceleração de cada átomo do sistema, respectivamente. O termo $\vec{F}xi$ da equação é fornecido por parâmetros do Campo de Forças. A velocidade de cada átomo do sistema é representada pelo termo $\frac{\partial x_i}{\partial t}$ e pode ser determinada por meio da distribuição de Maxwell-Boltzmann, partindo de uma temperatura específica, segundo a equação $\frac{3}{2}.N.K_B.T = \frac{1}{2}.\sum_{i=1}^{N} m_i.v_i^2$. Onde *N* é o número de partículas no sistema; K_B é a constante de Boltzmann (K_B = 1,380650310 * 10^{-23} J/K); m_i e v_i representam a massa e a velocidade das partículas, respectivamente (Karplus & McCammon, 2002; Schlick, 2006).

Entretanto, o formalismo newtoniano nem sempre permite um tratamento mais geral dos dados físicos, de modo que é preferível optar pelas descrições lagrangiana e hamiltoniana da equação do movimento. Além da aplicação das equações newtonianas responsáveis por determinar a posição dos átomos em um conjunto atômico componente de um sistema, devem, também, ser determinadas as forças sob as quais estes átomos estão submetidos. Tais forças são derivadas dos potenciais harmônicos clássicos e seu conjunto dá origem aos chamados Campos de Forças. O Campo de Forças é caracterizado como um conjunto de equações funcionais responsáveis por descrever as energias potenciais, a que cada átomo do sistema está submetido. De modo geral, os Campos de Forças consideram, basicamente, potenciais de estiramento, angular, diedrais e coulômbicos.

Os potenciais de estiramento caracterizam-se pela generalização das ligações covalentes, considerando-as como molas. Os potenciais de contração e estiramento destas ligações são, portanto, descritos segundo a equação $E_{est} = K_{est}.(\Delta l)^2$. Onde E_{est} representa o potencial de estiramento da ligação em questão, K_{est} indica a constante de força e Δl representa a variação de comprimento esperada para a ligação. Uma

esquematização mais detalhada, acerca dos potenciais de estiramento, pode ser verificada na **Figura 63 A**. Desta mesma maneira, os potenciais angulares compreendem a variação na angulação formada por ligações entre átomos. Os potenciais angulares podem ser descritos pela equação $E_{ang} = K_{ang}.(\Delta a)^2$. Onde E_{ang} representa o potencial de angulação formado pelas ligações em questão, K_{ang} indica a constante de força associada e Δa representa a variação na angulação esperada para a ligação. Uma esquematização mais detalhada acerca destes potenciais de deformação angular pode ser verificada na **Figura 63 B**.

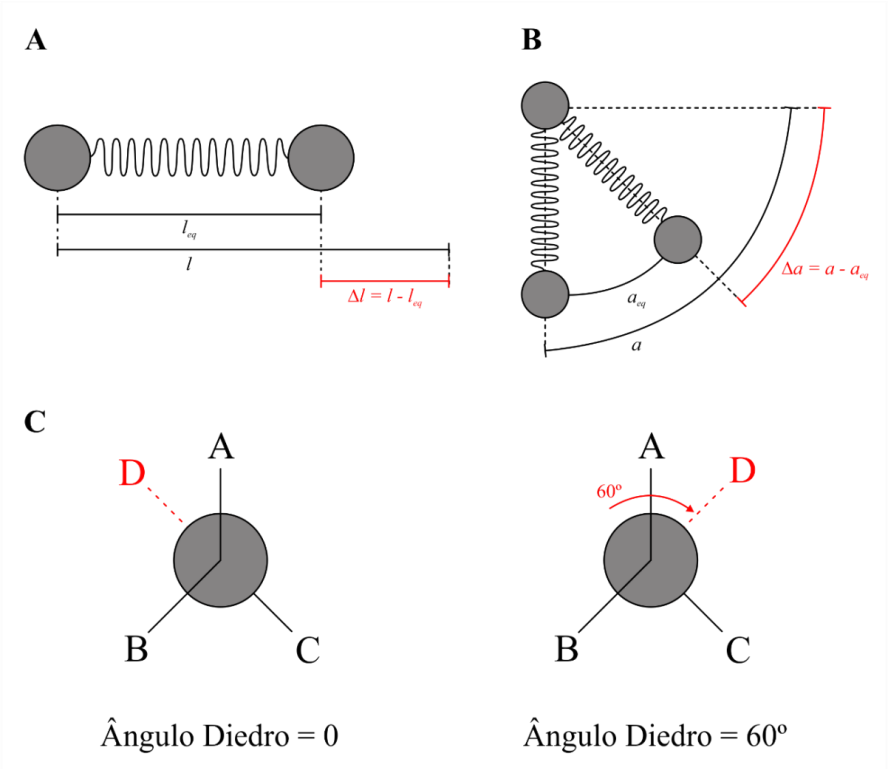


Figura 63 - Representação esquemática de três classes de potenciais componentes aos Campos de Força. **(A)** O potencial de estiramento considera a variação (Δl) na taxa de compressão e/ ou estiramento de ligações estabelecidas entre dois átomos. A variação é calculada a partir da subtração do comprimento da ligação estirada pelo comprimento da ligação no estado de repouso. Os círculos cinzas representam os átomos pertencentes ao sistema de interesse e as molas representam as ligações entre os átomos. **(B)** O potencial de deformação angular, desta mesma maneira, considera a variação (Δa) da deformação angular como a subtração da deformação angular pelo ângulo da ligação em estado de repouso. Os círculos cinzas representam os átomos pertencentes ao sistema de interesse e as molas representam as ligações entre os átomos. **(C)** Representação da variação angular que dá origem ao potencial diedral. Na imagem, as letras A, B, C e D representam átomos ligados a um eixo em comum, representado pelo círculo cinza. A rotação do eixo causa uma alteração na posição do átomo "D", indicado em vermelho.
Modificado de "Compuational chemistry: Introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics" de E. Lewars (2011). Kluwer Academic Publishers.

O terceiro potencial considerado é o potencial rotacional, ou diedral, onde é analisada a taxa de rotação das ligações estabelecidas entre os átomos, segundo a equação $E_{died} = K_o + \sum_{r=1}^{n} K_r.[1 + \cos(r\theta)]$ (**Figura 63 C**). Onde E_{died} indica o

potencial diedral, K_r representa a constante que define a barreira de rotação e θ indica o ângulo diedral. Além das equações responsáveis por descrever os potenciais estabelecidos entre as ligações atômicas, temos a descrição das energias potenciais não ligadas, caracterizadas como energia potencial eletrostática, ou coulômbica, como indica a equação $E_{coul} = \frac{q_i.q_j}{4\pi.\varepsilon_0.r_{ij}}$. Em que E_{coul} representa o potencial coulômbico, q_i e q_j indicam o valor das cargas dos átomos envolvidos, ε_o indica a permissividade do espaço livre e r_{ij} figura como o raio entre os núcleos dos átomos. A soma de todos estes potenciais configura o Campo de Forças, definido pela equação $E = \sum E_{est} + \sum E_{ang} + \sum E_{died} + \sum E_{coul}$ e configurando-se como a variação dos diferentes fatores que compõe estes potenciais, como variação nos funcionais e parâmetros obtidos para as constantes de força e distância, responsáveis por dar origem aos diferentes Campos de Forças (Lewars, 2011).

9.1.4. Métodos Semi-empíricos

A Mecânica Quântica, como método de modelagem computacional, descreve as interações atômicas em um sistema molecular considerando a influência dos núcleos atômicos e elétrons pertencentes a este dado sistema (Lewars, 2011; Schlick, 2006). Considerando, portanto, a natureza dual (onda/partícula) do elétron, a determinação da função de onda responsável por indicar a posição deste, exige que o ponto de partida de tais análises seja a aplicação e resolução da equação de Schrödinger. Deste modo, cada função de onda (Ψ) corresponde a um estado diferente para o elétron. Para cada estado há uma energia e posição associada, passível de ser calculada pela equação de Schrödinger (Lewars, 2011; Schlick, 2006).

A literatura descreve dois métodos principais responsáveis por fornecerem parâmetros quânticos cabíveis e que possuem aplicação em química computacional. Os métodos *ab initio* representam um tratamento teórico mais rigoroso fornecendo informações com maior grau de precisão acerca do comportamento eletrônico. Por exigirem um maior formalismo e um tratamento matemático mais cuidadoso, os métodos *ab initio* exigem um maior custo computacional o que, dependendo do tamanho do sistema submetido a análise, pode inviabilizar sua aplicação (Arroio *et al*., 2010).

Por outro lado, os métodos Semiempíricos, ainda que sejam baseados no formalismo apresentado para os métodos *ab initio*, tendem a apresentar uma abordagem

mais simplista, uma vez que utilizam parâmetros obtidos experimentalmente (Thiel, 1988). Neste sentido, os métodos semiempíricos são capazes reduzir o número de cálculos e o custo computacional por considerarem uma análise de similaridade com dados estruturais e químicos já conhecidos e documentados pela literatura (Thiel, 1988). De modo geral, neste método, os núcleos são inseridos em sucessivas posições estacionárias, sobre os quais a distribuição ótima dos elétrons é calculada pela resolução da equação de Schrödinger. O processo é repetido, de maneira iterativa, até que a energia deixe de variar dentro de um limite pré-estabelecido. Os métodos semiempíricos consideram apenas os elétrons de valência, uma vez que são estes os envolvidos em uma ligação química (Lewars, 2011; Schlick, 2006; Thiel, 1988).

9.1.4.1. Teoria do Funcional da Densidade

Descrito em 1964 pelos físicos Walter Kohn e Pierre Hohenberg, a Teoria do Funcional da Densidade (*Density Functional Theory*; DFT) determina que toda grandeza física medida em um sistema é, exclusivamente, derivada da densidade eletrônica configurando-se, portanto, como funções de densidade (Parr, 1980; Schlick, 2006). Assim, o método DFT utiliza a densidade eletrônica como variável no cálculo de propriedades eletrônicas, diferente da Teoria de Hartree-Fock (HF), responsável por utilizar a função de onda de *N* elétrons na resolução dos cálculos (Lieb & Simon, 2005; McLachlan & Ball, 1964). A presença de resultados demonstrando precisão química aceitável e uma boa correlação com dados experimentais, contribuíram para tornar o método DFT importante no estudo de propriedades estruturais e eletrônicas de moléculas e sistemas químicos (Parr, 1980; Schlick, 2006). Para o estudo de moléculas em estado de excitação utiliza-se, como recurso adicional, a Teoria do Funcional de Densidade Tempo-Dependente (*Time Dependent Density Functional Theory*; TD-DFT) (Runge & Gross, 1984). A TD-DFT se baseia na descrição da mecânica quântica em função da densidade eletrônica dependente do tempo. A descrição dos estados excitatórios de sistemas químicos por meio do método TD-DFT tem sido amplamente utilizada pela literatura e a fotoabsorção de átomos, tratada com sucesso.

10. ANEXO I

Av Vital Brasil 1500
05503-900 São Paulo SP
T +55 11 2627-9300
www.butantan.gov.br

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO

Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos de Saúde
Instituto Butantan

butantan

São Paulo, 14 de setembro de 2017.

DECLARAÇÃO DE CESSÃO DE ANIMAIS

A quem possa interessar,

Eu, Myriam Elizabeth Velloso Calleffo, Bióloga, Assistente Técnico de Pesquisa Científica e Tecnológica VI e Coordenadora do Biotério de Quelônios e Lagartos, do Laboratório de Herpetologia, Instituto Butantan, São Paulo, declaro para os devidos fins, a cessão de quatro espécimes adultos excedentes, sem procedência, da espécie *Trachemys scripta elegans*, adequadamente mantidos no Biotério de Quelônios e Lagartos, para realização do projeto de mestrado intitulado: "*Análise genética dos pigmentos visuais da tartaruga de orelha-vermelha (Trachemys scripta elegans) (Testudine; Emydidae)*".

O projeto será desenvolvido pelo aluno Vitor Henrique Corredor, Laboratório de Psicofisiologia Sensorial do Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, sob a orientação da professora Dra. Dora Fix Ventura, do Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, e co-orientação da Dra. Einat Hauzman, do mesmo Instituto. O projeto está previsto para ser realizado entre agosto de 2017 e agosto de 2019. Para a realização do projeto serão utilizados métodos aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal seguindo as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

Atenciosamente,

Myriam Elizabeth Velloso Calleffo
Bióloga - CRBio 18342/01-D
Assistant Research Biologist
Laboratório Herpetologia/ Casa Vital Brazil
t +55 11 2627-9813
www.butantan.gov.br

11. ANEXO II

INSTITUTO DE PSICOLOGIA
www.ip.usp.br

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ANÁLISE GENÉTICA DOS PIGMENTOS VISUAIS DA TARTARUGA DE ORELHA VERMELHA (Trachemys scripta elegans) (Testudine, Emydidae).", protocolada sob o CEUA nº 5446131117, sob a responsabilidade de **Dora Selma Fix Ventura** *e equipe; Vitor Henrique Corredor; Daniela Maria Oliveira Bonci ; 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 23/11/2017.

We certify that the proposal "GENETIC ANALYSIS OF THE VISUAL PIGMENTS OF THE RED EAR TURTLE (Trachemys scripta elegans) (Testudine, Emydidae).", utilizing 4 Reptiles (males and females), protocol number CEUA 5446131117, under the responsibility of **Dora Selma Fix Ventura** *and team; Vitor Henrique Corredor; Daniela Maria Oliveira Bonci ; 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 11/23/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 01/2018 a 07/2019 Área: Psicologia Experimental

Origem:	Animais provenientes de doação espontânea						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	10 a 20 anos	N:	4
Linhagem:	Trachemys srcipta elegans			Peso:	3 a 4 kg		

Resumo: Determinação genética dos picos de sensibilidade espectral das cinco classes de opsinas visuais na retina de Trachemys scripta elegans.

Local do experimento: Todos os procedimentos serão realizados nas dependências do Laboratório da Visão do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 27 de novembro 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

12. ANEXO III

Espécies utilizadas nas análises filogenéticas e seus correspondentes números de acesso no GenBank.

Opsina	Nome Comum	Espécie	Nº GenBank
RH1	Tartaruga-pintada	*Chrysemys picta bellii*	XM_008168043.1
	Tartaruga-verde	*Chelonia mydas*	XM_007059947.1
	Tartaruga de caixa comum	*Terrapene carolina*	XM_024207554.1
	Tartaruga de gopher	*Gopherus evgoodei*	XM_030570330.1
	Tartaruga de casco mole	*Pelodiscus sinensis*	XM_006132837.3
	Cobra-marrom	*Pseudonaja textilis*	XM_026722881.1
	Víbora manchada marrom	*Protobothrops mucrosquamatus*	XM_015823472.1
	Lagartixa japonesa de Schlegel	*Gekko japonicus*	XM_015425230.1
	Víbora do Shi-Lanka	*Trimeresurus trigonocephalus*	MK494154.1
	Jararaca do Norte	*Bothrops atrox*	MK494152.1
	Sapo com garras ocidentais	*Xenopus tropicalis*	NM_001097334.1
	Salamandra	*Ambistoma tigrinum*	U36574.1
	Cobra-cega	*Microcaecilia unicolor*	XM_030206598.1
	Cobra-cega	*Rhinatrema bivittatum*	XM_029597615.1
	Boi	*Bos taurus*	NM_001014890.2
	Cachorro doméstico	*Canis lupus familiaris*	NM_001008276.1
	Morcego	*Pteronotus quadridens*	MG873069.1
	Ratazana	*Rattus norvegicus*	NM_033441.1
	Morcego de ferradura	*Rhinolophus ferrumequinum*	XM_033132484.1
	Peixe dourado	*Carassius auratus*	L11863.1
	Lungfish	*Neoceratodus forsteri*	EF526295.1
	Peixe-Zebra	*Danio rerio*	NM_131084.1
	Limia Corcunda	*Limia nigrofasciata*	KX768564.1
	Mandarim	*Taeniopygia guttata*	AF222329.1
	Galinha	*Gallus gallus*	NM_001030606.1
	Pássaro	*Poecilia caymanensis*	KX768565.1
	Sabiá de óculos	*Catharus ustulatus*	XM_033071598.1
	Coruja	*Tyto alba alba*	XM_032987823.1
RH2	Tartaruga-pintada	*Chrysemys picta bellii*	XM_005309675.1
	Tartaruga de gopher	*Gopherus evgoodei*	XM_030561359.1
	Tartaruga de caixa comum	*Terrapene carolina*	XM_024199187.2
	Tartaruga de casco mole	*Pelodiscus sinensis*	XM_006119345.3
	Tartaruga-verde	*Chelonia mydas*	XM_007063507.1
	Lagartixa japonesa de Schlegel	*Gekko japonicus*	XM_015419621.1
	Lagarto	*Podarcis sicula*	AY941829.1
	Lagarto	*Uta stansburiana*	DQ100324.1
	Peixe-Zebra	*Danio rerio*	AF109370.1
	Lungfish	*Neoceratodus forsteri*	EF526296.1
	Lampreia	*Geotria australis*	KT749673.1
	Peixe	*Notothenia angustata*	AY771354.1
	Peixe	*Scopelarchus analis*	EF517406.1
	Buff-barred Warbler	*Phylloscopus pulcher*	KM977591.1
	Fantail	*Rhipidura hypoxantha*	KM977594.1
	Pale-rumped warbler	*Abrornis chloronotus*	KM977590.1
	Toutinegra de Whistler	*Seicercus whistleri*	KM977593.1
	Mandarim	*Taeniopygya guttata*	NM_001076696.1
SWS1	Tartaruga-pintada	*Chrysemys picta bellii*	XM_005281289.1
	Tartaruga-verde	*Chelonia mydas*	XM_007067421.1
	Tartaruga de caixa comum	*Terrapene carolina*	XM_024194545.1

Opsina	Nome Comum	Espécie	Nº GenBank
SWS1	Tartaruga de gopher	*Gopherus evgoodei*	XM_030582861.1
	Tartaruga de casco mole	*Pelodiscus sinensis*	XM_006110204.1
	Cobra-marrom	*Pseudonaja textilis*	XM_026722693.1
	Víbora manchada marrom	*Protobothrops mucrosquamatus*	XM_015825841.2
	Lagartixa japonesa de Schlegel	*Gekko japonicus*	XM_015427348.1
	Serpente (píton)	*Python regius*	FJ497237.1
	Cobra Brilhante	*Arizona elegans*	MH011636.1
	Sapo com garras ocidentais	*Xenopus tropicalis*	NM_001126076.1
	Salamandra	*Ambystoma tigrinum*	AF038948.1
	Rã	*Nanorana parkeri*	XM_018560743.1
	Boi	*Bos taurus*	NM_174567.1
	Morcego	*Pteronotus quadridens*	MG775064.1
	Gambá	*Thylamys elegans*	DQ356245.1
	Gambá	*Didelphis aurita*	DQ352182.1
	Rato-cachorro	*Monodelphis domestica*	DQ352181.1
	Peixe dourado	*Carassius auratus*	D85863.1
	Peixe-Zebra	*Danio rerio*	KT008399.1
	Lungfish	*Neoceratodus forsteri*	EF526298.1
	Limia Cubana	*Limia vittata*	KX768648.1
	Espada	*Xiphophorus hellerii*	KX768637.1
	Galinha	*Gallus gallus*	NM_205438.1
	Toutinegra	*Seicercus whistleri*	KM516272.1
	Blyth's leaf warbler	*Phylloscopus reguloides*	KM516271.1
	Mariquita-de-barrete-preto	*Cardellina pusilla*	KM516265.1
	Toutinegra de Nashville	*Oreothlypis ruficapilla*	KM516264.1
SWS2	Tartaruga-pintada	*Chrysemys picta bellii*	XM_005281281.2
	Tartaruga de casco mole	*Pelodiscus sinensis*	XM_025179802.1
	Tartaruga-verde	*Chelonia mydas*	XM_027834629.1
	Tartaruga de caixa comum	*Terrapene carolina*	XM_024222465.3
	Lagarto	*Uta stansburiana*	DQ100326.1
	Lagartixa-dos-muros	*Podarcis muralis*	XM_028712723.1
	Dragão-barbudo	*Pogona vitticeps*	XM_020793071.1
	Salamandra	*Ambystoma tigrinum*	AF038946.1
	Sapo	*Mantella baroni*	LC180362.1
	Salamandra	*Ambystoma mexicanum*	LC180361.1
	Sapo com garras ocidentais	*Xenopus tropicalis*	XM_002937226.3
	Ornitorrinco	*Ornithorhynchus anatinus*	EU624412.1
	Equidna	*Tachyglossus aculeatus*	EU636012.1
	Salmão Vermelho	*Oncorhynchus nerka*	AY214159.1
	Lampreia	*Geotria australis*	AY366492.1
	Peixe-Zebra	*Danio rerio*	KT008398.1
	Peixe-faca-palhaço	*Chitala ornata*	MG584734.1
	Peixe	*Acrossocheilus paradoxus*	EU919540.1
	Toutinegra de Garganta Cinza	*Phylloscopus maculipennis*	KM516243.1
	Galinha	*Gallus gallus*	NM_205517.2
	Pássaro	*Phylloscopus pulcher*	KM516246.1
	Pássaro	*Passerina cyanea*	KM516241.1
	Pássaro	*Regulus regulus*	KM516250.1
LWS	Tartaruga-pintada	*Chrysemys picta bellii*	XM_005281282.2
	Tartaruga-verde	*Chelonia mydas*	XM_007052772.1
	Tartaruga de gopher	*Gopherus evgoodei*	XM_030548048.1
	Tartaruga de caixa comum	*Terrapene carolina*	XM_026661446
	Tartaruga de casco mole	*Pelodiscus sinensis*	XM_014581850.2
	Cobra-marrom	*Pseudonaja textilis*	XM_026711431.1
	Víbora manchada marrom	*Protobothrops mucrosquamatus*	XM_015812260.1
	Lagartixa japonesa de Schlegel	*Gekko japonicus*	XM_015415465.1

Opsina	Nome Comum	Espécie	Nº GenBank
LWS	Jararaca do Norte	*Bothrops atrox*	MH244490.1
	Camaleão americano	*Anolis carolinensis*	XM_008103916.2
	Anfíbio	*Microcaecilia unicolor*	XM_030192059.1
	Rã	*Xenopus laevis*	U90895.1
	Sapo com garras ocidentais	*Xenopus tropicalis*	NM_001102861.1
	Salamandra	*Ambystoma tigrinum*	AF038947.1
	Rato-cachorro	*Monodelphis domestica*	DQ352179.1
	Morcego	*Pteronotus quadridens*	MG775060.1
	Gambá de orelha preta	*Didelphis aurita*	DQ352180.1
	Gambá de cauda gorda	*Thylamys elegans*	DQ356244.1
	Boi	*Bos taurus*	AF280398.1
	Peixe dourado	*Carassius auratus*	L11867.1
	Lampreia	*Geotria australis*	AY366491.1
	Rolland's demoiselle	*Chrysiptera rollandi*	KU745456.1
	Peixe-Zebra	*Danio rerio*	NM_001002443.2
	Peixe unicórnio	*Naso brevirostris*	MN720503.1
	Galinha	*Gallus gallus*	NM_205440.1
	Grou-americano	*Grus americana*	KM508487.1
	Rosela vermelha	*Platycercus elegans*	KF134493.1
	Mandarim	*Taeniopygia guttata*	AF222333.1
Gp. Ext.	Galinha	*Gallus gallus*	NM_001044653.1
	Pássaro	*Chiroxiphia lanceolata*	XM_032694179.1
	Tartaruga verde	*Chelonia mydas*	XM_007069593.1
	Tartaruga	*Pelodiscus sinensis*	XM_014578738.1

Nota: Gp. Ext., Grupo Externo.