Anais do Congresso Brasileiro de Iniciação Científica
(https://periodicos.unisanta.br/COB)

ISSN 2317-1316

ESTUDOS COMPARATIVOS DA MORFOLOGIA DA RETINA DE *Corallus hortulanus*, *Boa constrictor* E *Eunectes notaeus* (Serpentes, Boidae): ANÁLISES DA DENSIDADE E TOPOGRAFIA DE FOTORRECEPTORES

COMPARATIVE STUDIES OF THE RETINAL MORPHOLOGY OF *Corallus hortulanus*, *Boa constrictor*, AND *Eunectes notaeus* (Serpentes, Boidae): ANALYSES OF PHOTORECEPTOR DENSITY AND TOPOGRAPHY

Lívia Camily Dias Soares[1,2], Natália Ferreira Torello-Viera[2], Juliana Hiromi Tashiro[2], Einat Hauzman[2].

[1] Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Câmpus do Litoral Paulista
[2] Universidade de São Paulo, Departamento de Psicologia Experimental, Instituto de Psicologia.
E-mail para contato: livia.d.soares@unesp.br

RESUMO – A topografia dos fotorreceptores da retina reflete adaptações ao hábito e ao ambiente, mas é pouco conhecida em Boidae. O seguinte trabalho comparou a densidade e a distribuição de bastonetes, cones LWS e SWS1 em Corallus hortulanus (arborícola), Boa constrictor (semi-arborícola) e Eunectes notaeus (semi-aquática), por imunohistoquímica. B. constrictor mostrou predominância de bastonetes e maior densidade na retina dorsal, exceto SWS1, compatível com hábito noturno. E. notaeus apresentou maior densidade de cones totais ao longo do eixo nasal-temporal, padrão geralmente descrito em espécies de ambientes abertos e C. hortulanus evidenciou cones na retina ventral, favorecendo o campo visual superior. Os resultados são preliminares e exigem testes com mais retinas, mas sugerem relação entre organização da retina e ecologia visual.

Palavras-chave: retina, fotorreceptores, Boidae, ecologia visual, serpentes.

ABSTRACT – Retinal photoreceptor topography reflects adaptations to lifestyle and habitat, but is poorly known in Boidae. We compared the density and distribution of rods, LWS cones, and SWS1 cones in Corallus hortulanus (arboreal), Boa constrictor (semi-arboreal), and Eunectes notaeus (semi-aquatic), using immunohistochemistry. B. constrictor showed a predominance of rods and higher density in the dorsal retina, except for SWS1 cones, consistent with nocturnal habits. E. notaeus showed a region of higher total cone density along the nasal-temporal axis, a pattern generally described in open environments, and C. hortulanus showed cones in the ventral retina, favoring the upper visual field. The

ISSN 2317-1316

results are preliminary and require more retinas, but suggest a relationship between retina and visual ecology.

Keywords: retina, photoreceptors, Boidae, visual ecology, snakes.

1 INTRODUÇÃO

Na maioria dos vertebrados a visão desempenha um importante papel nas atividades básicas de sobrevivência como forrageamento, fuga de predadores, reconhecimento do ambiente e reprodução. As diferenças funcionais e anatômicas das estruturas visuais geralmente refletem pressões seletivas que variam conforme o comportamento e os nichos ecológicos ocupados pelas espécies. (Hauzman et al., 2018).

O olho dos vertebrados é formado por três camadas principais, esclera, úvea e retina. Sendo a retina a camada mais interna do olho, correspondendo a um fino tecido, altamente especializado, que faz parte do sistema nervoso central e é formada por uma rede de células nervosas e gliais que captam a energia luminosa e realizam o processamento das informações visuais contidas nos fótons (Ramón y Cajal, 1893). A retina de vertebrados apresenta dois tipos principais de fotorreceptores, os cones e os bastonetes, que possuem morfologia e características funcionais distintas.

Os bastonetes contêm o fotopigmento rodopsina (RH1), com pico de absorção em cerca de 500 nm, e funcionam em condições de visão escotópica (baixa luminosidade). Os cones apresentam diferentes subtipos e podem conter fotopigmentos com sensibilidade espectral que varia do ultravioleta (UV), em cerca de 360 nm (SWS1), até a faixa dos comprimentos de onda médios e longos (verde/vermelho), em cerca de 560 nm (LWS). Esses fotorreceptores têm papel preponderante na visão de cores e funcionam em condições de luz fotópica (alta luminosidade) (Bowmaker e Hunt, 2006; Lamb, 2013). Em serpentes, os padrões de retina e os tipos de fotorreceptores presentes variam conforme os hábitos e a filogenia das espécies (Hauzman, 2014; 2020).

Áreas específicas da retina que dependem de um maior poder de resolução espacial, possuem uma maior densidade celular, o que é chamado de especializações da retina. Animais que ocupam ambientes abertos, como oceanos e pastagens, geralmente possuem uma faixa horizontal de maior densidade de células na retina (faixa visual). Essas faixas visuais proporcionam uma maior resolução espacial do plano horizontal ao redor do animal, de forma

ISSN 2317-1316

que não haja alta necessidade de movimentação da cabeça, para a percepção panorâmica do ambiente (Hughes, 1977). Já alguns animais, como arborícolas, por exemplo, possuem uma área concêntrica de maior densidade de células na retina, conhecida como *area centralis* (Rapaport e Stone, 1984).

As maiores serpentes não venenosas da América Neotropical pertencem à família Boidae. As diferenças ecológicas entre as três espécies de serpentes da Família Boidae, sendo *Corallus hortulanus* altamente arborícola, *Boa constrictor* semi-arborícola e *Eunectes notaeus* uma serpente primariamente semi-aquática, podem implicar em diferenças importantes na estrutura e organização topográfica das retinas, que podem estar associadas com aspectos da ecologia visual. No entanto, a topografia dos fotorreceptores em Boidae ainda é pouco conhecida, e não se sabe se as diferenças de hábitos refletem em especializações distintas das retinas. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo analisar a densidade e a topografia dos diferentes tipos de fotorreceptores – bastonetes, cones LWS e cones SWS1 – em retinas íntegras de três espécies de serpentes da família Boidae: *Corallus hortulanus, Boa constrictor* e *Eunectes notaeus*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo foram analisadas retinas de três espécies de serpentes, *Corallus hortulanus, Boa constrictor e Eunectes notaeus*. As serpentes foram coletadas anteriormente e eutanasiadas com dose letal do anestésico Thionembutal, estando de acordo com os princípios éticos de manejo e experimentações com animais com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (CEUA-IPUSP), processo nº 9284040521. Após a eutanásia dos animais, os olhos foram enucleados, fixados em solução de paraformaldeido (PFA) 4% diluído em tampão fosfato (TF) 0,1 M, por três horas, e depois preservados em TF 0,1 M a 4ºC.

Para a marcação e quantificação dos fotorreceptores (cones SWS1, cones LWS e bastonetes), as retinas íntegras foram dissecadas da cuia óptica, e após lavagens em TF 0,1 M, foram incubadas durante 1 hora em soro normal de burro 10% (Sigma-Aldrich), diluído em TF a 0,1 M com Triton X-100 a 0,3%, para bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida, as retinas foram incubadas com anticorpos primários diluídos em TF 0,1 M com Triton X-100 0,3% durante 3 a 5 dias, a 4°C, sendo que os cones SWS1 foram marcados com anticorpo de cabra

ISSN 2317-1316

anti-SWS1 (Santa Cruz Biotechnology, sc14363; diluição 1:500) e os cones LWS com anticorpo de coelho anti-LWS (Millipore, AB5405; diluição 1:500). Em seguida os tecidos foram lavados em TF 0,1 M (três lavagens, 15 min), antes de serem incubados com os anticorpos secundários (anticorpo de burro contra soro de cabra e contra soro de coelho), conjugados a moléculas fluorescentes Alexa Fluor 488 e Cy3, diluídos em TF 0,1 M com Triton 0,3%, durante 2 horas, em temperatura ambiente, protegido da luz. Após a incubação com o anticorpo secundário, foram lavados em TF 0,1 M (três lavagens, 15 min). As retinas foram aplanadas sobre lâminas histológicas, com os fotorreceptores voltados para cima, e montadas com meio de montagem para fluorescência Vectashield. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (LEICA DM5500B).

A análise da densidade e distribuição de fotorreceptores foi realizada por meio de abordagem estereológica baseada no método de fracionamento óptico. O mapeamento das retinas foi feito com o software de estereologia Stereo Investigator (MicroBrightField, Colchester, VT). Os cones SWS1 e LWS foram identificados por microscopia de fluorescência, a partir da observação dos segmentos externos marcados com os anticorpos anti-opsinas. Os cones e os bastonetes foram diferenciados em microscopia de campo claro com base no diâmetro dos segmentos internos.

Os mapas topográficos de densidade celular foram elaborados no software R, com base nos dados de densidade de cada campo amostrado. Os dados de densidade celular, incluindo população total de células, densidade média, densidade mínima e máxima de cada tipo de fotorreceptor foram analisados para cada espécie. Os mapas de isodensidade foram analisados de modo qualitativo para a identificação dos tipos de especialização da retina (faixa visual ou *area centralis*) para cada tipo celular. Os resultados de densidade e topografia neural foram interpretados com base nas características ecológicas e comportamentais de cada uma das espécies analisadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de imuno-histoquímica permitiu a contagem de três tipos celulares: cones LWS, cones SWS1 e bastonetes. O número amostral foi de 1 para cada espécie (uma retina de um indivíduo por espécie). Portanto, os resultados são considerados preliminares. Os bastonetes foram contados apenas em *B. constrictor*, devido à integridade comprometida das demais

ISSN 2317-1316

retinas. Somente a retina de *E. notaeus* possuía marcação de orientação anatômica, feita por uma incisão radial na região dorsal durante a dissecação. Nas demais retinas, a orientação foi estabelecida com base na posição do nervo óptico, que, em serpentes, de modo geral, ocupa o quadrante ventro-temporal da retina (Hauzman et al., 2018).

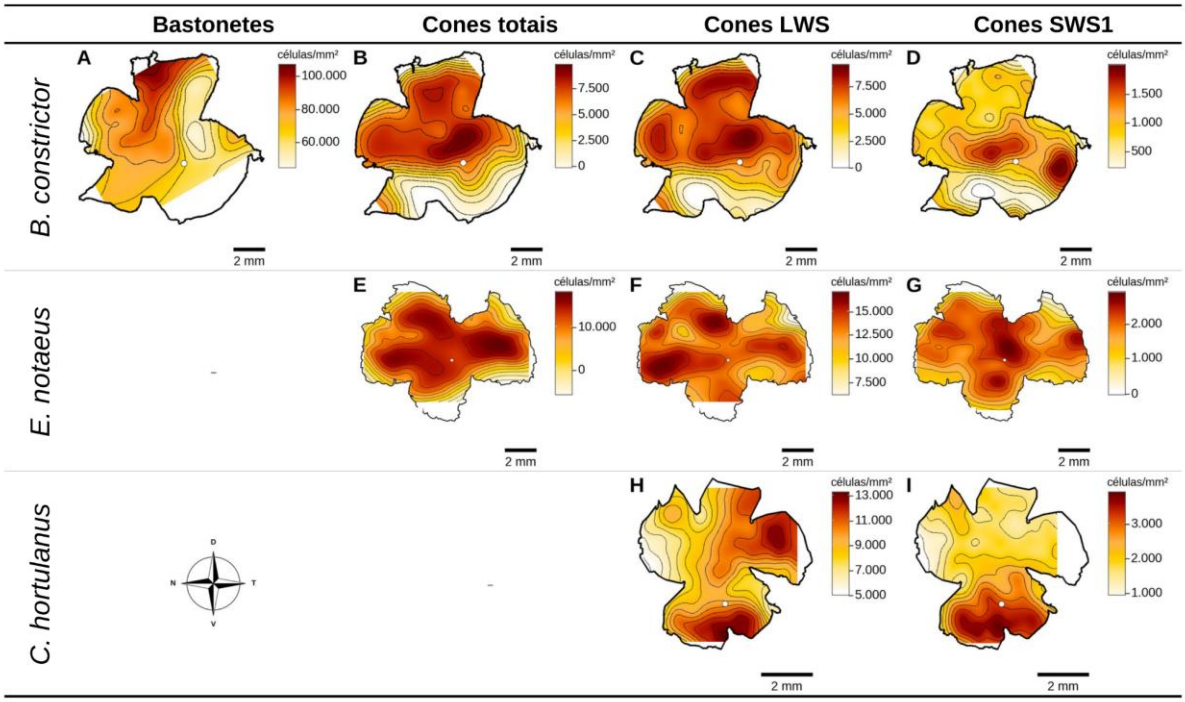
A partir das estimativas obtidas pelas contagens celulares, observou-se que *B. constrictor* apresentou densidade média de 74.098 bastonetes/mm² e 5.470 cones/mm², padrão consistente com a maior sensibilidade visual esperada para espécies de hábito predominantemente noturno, devido à ampla concentração de bastonetes, sensíveis à baixa luminosidade. A maior densidade de fotorreceptores ocorreu na região que, pela posição do nervo óptico, é considerada dorsal (Figura 1A–D), exceto para cones SWS1, com maior concentração na retina temporal. Como a imagem é projetada invertida na retina, a retina dorsal amostra o campo visual inferior, o que pode estar relacionado ao hábito semi-arborícola da espécie, que também forrageia no solo e, por isso, necessita de maior sensibilidade visual da região inferior (Gomes et al., 1989).

E. notaeus apresentou densidade média de 10.690 cones/mm². Na Figura 1E–G, observa-se uma região de maior densidade de cones totais ao longo do eixo nasal-temporal da retina. Esse padrão é descrito em espécies de ambientes abertos, nos quais o horizonte amplo favorece a resolução espacial ao longo do eixo horizontal (Hughes, 1977). Assim, pode estar relacionado ao hábito primariamente semi-aquático da espécie, favorecendo a visão na interface água e superfície.

Devido ao comprometimento da integridade da retina de *C. hortulanus*, não foi possível estimar a quantidade total de cones e bastonetes, apenas a dos cones LWS e SWS1 marcados por imuno-histoquímica, que corresponderam a 9.503 e 2.187 células/mm², respectivamente. Na Figura 1H-I, observa-se maior concentração de cones LWS e SWS1 na região ventral, definida pela posição do nervo óptico. Como a retina ventral amostra o campo visual superior, esse padrão poderia estar relacionado ao hábito altamente arborícola da espécie, que demandaria maior acuidade visual do campo de visão superior, favorecendo a observação de predadores aéreos em ambiente arborícola (Henderson e Prémel, 2024).

ISSN 2317-1316

Figura 1: Mapas topográficos das retinas das três espécies de Serpentes Boidae estudadas.



4 CONCLUSÃO

Os mapas topográficos evidenciaram diferenças na distribuição dos fotorreceptores entre as espécies da família Boidae analisadas. *B. constrictor* apresentou alta porcentagem de bastonetes, o que pode estar relacionado ao seu hábito noturno, e maior concentração de células na região dorsal da retina, exceto cones SWS1, favorecendo o campo visual inferior, o que pode estar associado ao hábito semi-arborícola. *E. notaeus* apresentou uma região de maior densidade de cones totais ao longo do eixo nasal-temporal da retina. Esse padrão é geralmente descrito em espécies de ambientes abertos e pode estar relacionado ao hábito primariamente semi-aquático da espécie, o que condiz com Hughes (1977). Em *C. hortulanus*, observou-se maior concentração de cones LWS e SWS1 na retina ventral, favorecendo o campo visual superior, o que pode estar relacionado com a observação de predadores aéreos em ambiente arborícola. Entretanto, um maior número amostral de retinas é necessário para confirmar os padrões observados e permitir uma melhor relação entre a densidade e a organização

ISSN 2317-1316

topográfica dos fotorreceptores. Agradecemos ao Instituto de Psicologia da USP e à UNESP IB-CLP pelo apoio institucional e à FAPEMAT, à FAPESP e ao CNPq pelo fomento.

5 DECLARAÇÃO DE USO DE IA

Declaração de Uso de IA: Durante a elaboração deste trabalho, utilizou-se a ferramenta Claude (Anthropic) para estruturar a Figura 1 e revisar a tradução para o inglês. O conteúdo gerado foi revisado, editado e validado pelos autores, que assumem total responsabilidade pelo texto final.

6 REFERÊNCIAS

BOWMAKER, J. K., & Hunt, D. M. (2006). Evolution of vertebrate visual pigments. Current Biology, 16(13), R484-R489.

GOMES, N.; PUORTO, G.; BUONONATO, M. A.; RIBEIRO, M. F. M. Atlas anatômico de *Boa constrictor* Linnaeus, 1758 (Serpentes: Boidae). São Paulo: Instituto Butantan, 1989. 59p.

HAUZMAN, E. (2020). Adaptations and evolutionary trajectories of the snake rod and cone photoreceptors. Semin. Cell Dev. Biol. 106, 86–93. doi: 10.1016/j.semcdb.2020.04.004.

HAUZMAN, Einat; BONCI, Daniela M. O.; VENTURA, Dora F. Retinal topographic maps: a glimpse into the animals' visual world. In: Sensory Nervous System. London: IntechOpen, 2018. DOI: 10.5772/intechopen.74645.

HAUZMAN, Einat. Ecologia e evolução do sistema visual de serpentes caenophidia: estudos comparativos da morfologia retiniana e genética de opsinas. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. DOI: https://doi.org/10.11606/T.47.2014.tde-09032015-150530.

HENDERSON, Robert W.; PRÉMEL, Vincent. *Boa constrictor*, Corallus caninus and C. hortulana road mortality. Herpetological Review, v. 54, n. 4, p. 677, 2024.

HUGHES, A. A topografia da visão em mamíferos com estilos de vida contrastantes: óptica comparativa e organização da retina. In: Manual de Fisiologia Sensorial. Crescitelli, F. (ed.). v. 5. New York: Springer, 1977. p. 613–756.

LAMB, T. D. (2013). Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina. Progress in retinal and eye research, 36, 52-119.

ISSN 2317-1316

RAMÓN Y CAJAL, S. La rétine des vertebrés. La Cellule, v. 9, p. 17-257, 1893.

RAPAPORT, D. H.; STONE, J. The *area centralis* of the retina in the cat and other mammals: focal point for function and development of the visual system. Neuroscience, v. 11, n. 2, p. 289-301, 1984.