



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Percepção de cores no gambá (*Didelphis albiventris*) –
Uma abordagem comportamental.**

Beatriz Medina Pegoraro

Orientador: Professor Doutor
Valdir Filgueiras Pessoa

Brasília
2009



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Percepção de cores no gambá (*Didelphis albiventris*) –
Uma abordagem comportamental.**

Beatriz Medina Pegoraro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Professor Doutor
Valdir Filgueiras Pessoa

Banca Examinadora:
Presidente: Dr. Valdir Filgueiras Pessoa
Examinadora: Dra. Marília Barros
Examinadora: Dra. Wania Cristina de Souza
Examinadora: Dra. Maria Clotilde H. Tavares

Brasília
2009

Dedico esse trabalho a Eduardo de Almeida Gutierrez, companheiro de pesquisa que esteve presente desde o momento em que peguei os filhotes até o último dia de teste.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por permitir a conclusão desse trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde e à Universidade de Brasília pelo conhecimento científico que possibilita aos pesquisadores.

Ao professor Valdir Filgueiras Pessoa pela oportunidade de realizar essa pesquisa, pela confiança, orientação e paciência que nunca acaba.

Ao professor Bráulio Magalhães-Castro e Úrsula Gomes pela grande ajuda no início do projeto.

A Vicente, meu pai, e Leninha, minha mãe, por me apoiarem ao longo dessa caminhada.

Aos estagiários Eduardo, Karina, Marina e Delanna que me ajudaram nos experimentos com os animais.

Ao meu filho Matheus, pela compreensão quando adiamos nossos passeios por minha falta de tempo.

Ao meu namorado Bruno Dantas por ter ido comigo nos finais de semana para o laboratório.

Aos meus irmãos Bruno Medina, Gabriel Medina e Katia Pegoraro por torcerem por mim.

Aos gambás Frodo, Sam, Merry, Pippin, Mohana, Safira e Ayra.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 – Filogênese dos cones e bastonetes.....	10
1.2 – Dados anatômicos e funcionais da visão cromática dos Didelphideos	11
1.3 – Justificativa e Relevância	13
1.4 – Objetivos Gerais	18
1.5 – Objetivos Específicos	18
2. MÉTODOS.....	19
2.1 – Sujeitos	19
2.2 – Labirinto	21
2.3 – Estímulos	24
2.4 – Procedimentos	25
2.4.1 – Adaptação	25
2.4.2 – Modelagem 1	26
2.4.3 – Modelagem 2	27
2.4.4 – Testes comportamentais	28
3. RESULTADOS	31
3.1 – Adaptação	31
3.2 – Modelagem 1	31
3.3 – Modelagem 2	31
3.4 – Testes comportamentais	35
4. OUTRAS FASES	39
4.1 – Protocolo A.....	39
4.2 – Protocolo B.....	39
4.3 – Protocolo C.....	42
5. DISCUSSÃO.....	44
5.1 - Motivação dos sujeitos.....	44
5.2 – Contato visual com outros indivíduos	44
5.3 – Simplificação de tarefas.....	45
5.4 – Importância do teste impossível	45
5.5 – Pistas olfativas	46
5.6 – Comparação dos resultados com outros estudos de visão de cores em marsupiais.....	47
6. CONCLUSÕES.....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
8. ANEXOS.....	57
8.1 – Anexo 1: Licença do IBAMA para captura dos animais.....	57
8.2 – Anexo 2: Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética.....	58
8.3 – Anexo 3: Artigo científico.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Absorção relativa em visão tricromática.....	9
Figura 2. Indivíduo da espécie <i>Didelphis albiventris</i>	20
Figura 3. Vista superior do labirinto.....	21
Figura 4. Representação das janelas basculantes onde são apresentados os estímulos.....	21
Figura 5. Vista frontal do labirinto a partir da câmara de partida.	22
Figura 6. Vista lateral do labirinto.....	22
Figura 7. Luxímetro posicionado próximo às janelas do labirinto.	23
Figura 8. Manipulação de filhote.....	26
Figura 9. Representação esquemática dos estímulos utilizados na modelagem 2.....	27
Figura 10. Sujeito (<i>Didelphis albiventris</i>) acessando o reforço (ovo cozido).....	28
Figura 11. Representação esquemática dos estímulos utilizados nos testes discriminativos ..	30
Figuras 12 e 13 – Desempenhos de <i>Didelphis albiventris</i> - Modelagem 2..	33
Figuras 14 e 15 – Desempenhos de <i>Didelphis albiventris</i> - Modelagem 2..	34
Figura 16. Desempenho do macho Frodo nos testes comportamentais.....	36
Figura 17. Desempenho da fêmea Safira nos testes comportamentais.....	37
Figura 18. Desempenho do macho Sam nos testes comportamentais	38
Figura 19. Resultados da modelagem utilizando o protocolo B.....	40
Figura 20. Resultados da modelagem utilizando o protocolo C.....	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SUMÁRIO DOS ESTUDOS DE VISÃO DE CORES EM MARSUPIAIS.....	16
TABELA 2 - IDENTIFICAÇÃO DOS SUJEITOS QUANTO AO SEXO E À PARTICIPAÇÃO NAS DIFERENTES ETAPAS DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL ...	20
TABELA 3 - DESEMPENHO DOS SUJEITOS - MODELAGEM 2.....	32
TABELA 4 - DESEMPENHO NO TESTE COMPORTAMENTAL - FRODO.....	36
TABELA 5 - DESEMPENHO NO TESTE COMPORTAMENTAL - SAFIRA.....	37
TABELA 6 - DESEMPENHO NO TESTE COMPORTAMENTAL - SAM.....	38

RESUMO

A visão de cores em marsupiais é um tema controverso, especialmente dentro da ordem Didelphimorphia (gambás). Enquanto o diagnóstico da visão desses animais em testes comportamentais foi o tricromatismo e nos estudos eletrofisiológicos, o monocromatismo, recentemente, em estudos de genética molecular, encontraram apenas duas classes de opsinas nos dois maiores gêneros dessa ordem. O presente estudo avaliou a habilidade discriminativa de gambás (*Didelphis albiventris*) quanto à percepção de cores utilizando testes comportamentais. Os animais realizaram as tarefas em um labirinto de dupla escolha, em forma de Y, com uma câmara de partida. Os estímulos utilizados foram papéis de Munsell de diferentes matizes. Para assegurar a escolha baseada na cor, os papéis foram apresentados com variação aleatória de brilho. Um macho obteve desempenho significativo nos testes com pares de fácil discriminação para um dicromata, mas seu desempenho caiu para a faixa da aleatoriedade no par de difícil discriminação. Esses resultados sugerem que a espécie *Didelphis albiventris* é dicromata.

ABSTRACT

Color vision in marsupials is a controversial subject, especially among the Order Didelphimorphia (American opossums). While behavioral tests have diagnosed these animals as trichromatic and electrophysiological studies as monochromatic, recent molecular genetic studies have found only two classes of cone opsin in two major genera of the order. This study examined the color discrimination abilities of opossums (*Didelphis albiventris*) through a series of tasks involving a behavioral paradigm of discrimination learning. The animals were tested in a Y-shaped maze, consisting of a start chamber and a decision area with a double choice panel. Stimuli consisting of pairs of Munsell color cards were presented in random brightness values to assure that discriminations were based on color rather than brightness cues. One male succeeded in discriminating the stimuli pairs considered easy for a dichromatic individual, but failed in the attempt to discriminate those expected to be easy only for a trichromatic. These results suggest that *Didelphis albiventris* is dichromatic.

1. INTRODUÇÃO

No nosso planeta, os seres vivos desenvolveram por forma inevitável, a habilidade de captar a luz, fornecedora da energia (eletromagnética) que suporta a vida. A maioria dos vertebrados desenvolveu sistemas de detecção de fótons, cuja capacidade de formação de imagens, permitiu a representação do ambiente externo. Todavia, este processo implicou a evolução paralela de sistemas sensoriais capazes de interpretar estas imagens e transformá-las em comportamentos cada vez mais sofisticados, tais como, a detecção de presas, de predadores e parceiros para o acasalamento e reprodução.

A energia (fótons) que os animais experienciam como luz ocupa uma pequena faixa - 400 nm (próximo ao ultravioleta) até cerca de 800 nm (infravermelho) do espectro eletromagnético. Dentro destes limites, algumas espécies utilizam quase toda sua extensão, enquanto outras se restringem a limites mais estreitos.

Desde que a função de sensibilidade dos pigmentos fotorreceptores tem uma distribuição aproximadamente normal (em forma de sino), um único pigmento não pode fornecer informações que sejam consideradas inequívocas sobre o comprimento de onda.

Assim, para a visão a cores, requerem-se pelo menos duas classes espectrais de fotorreceptores, cujas curvas de sensibilidade se sobrepõem (Dicromacia). Desta forma, para ampliar a gama de comprimentos de onda que pudessem ser determinados e aumentassem o número de cores distintas, de maneira a serem discrimináveis, foi necessária a adição de novas classes de fotorreceptores, que fossem sensíveis a outros comprimentos de onda, dentro da faixa espectral da luz (Jacobs & Rowe, 2004).

Enquanto os humanos e os primatas do Velho Mundo são sensíveis a três comprimentos de onda (Tricromacia), outros vertebrados como as aves, peixes e répteis, respondem a quatro classes de comprimentos de onda, sendo, portanto, tetracromáticos. Em geral, esta quarta classe é sensível aos comprimentos de onda curtos, o que estende a visão

destes animais à região do espectro próxima ao ultravioleta. Até a Pentacromacia tem sido sugerida em pombos (Emmerton *et al.*, 1980).

Na visão de cores dicromática, onde qualquer cor pode ser especificada pela mistura particular de duas luzes primárias, as quantidades relativas de luz absorvidas são comparadas por dois tipos de receptores. Esta é a situação encontrada na grande maioria dos mamíferos (Jacobs, 1993), que comparam sinais de cones que absorvem luz preferencialmente na faixa dos comprimentos de onda curtos (região do azul-violeta) com outro grupo de cones que possui sensibilidade espectral para comprimentos de onda longos/médios (faixa do vermelho-verde).

Entre os mamíferos, uma visão de cores tricromática, mais acurada, e que depende da combinação das respostas de três tipos de receptores (Figura 1), cada um contendo um fotopigmento diferente, é encontrada apenas nos primatas (Bowmaker *et al.*, 1991; Dulai *et al.*, 1994; Boissinot *et al.*, 1998) e em alguns marsupiais (Arrese *et al.*, 2002; Tabela 1).

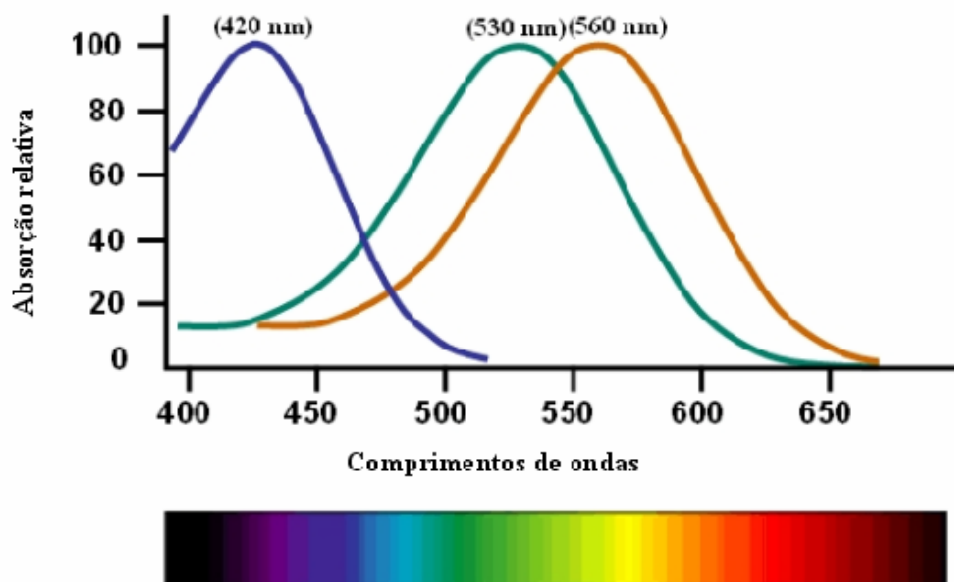


Figura 1 – Absorção relativa em visão tricromática.

1.1 - Filogênese dos cones e bastonetes

A partir das comparações de todas as seqüências das opsinas de vertebrados, tornou-se possível gerar árvores filogenéticas detalhadas dos pigmentos visuais, baseadas na duplicação e subsequente divergência seqüencial. Embora as árvores filogenéticas propostas por um grupo de autores (e.g. Okano *et al.*, 1992) apresentem ligeiras diferenças em relação a outro grupo de pesquisadores (e.g. Hisatomi *et al.*, 1994), em conjunto elas mostram-se, nas suas linhas gerais, concordantes.

O pigmento visual ancestral dos vertebrados poderia ter sido de tipo cone com um λ_{max} abaixo de 520nm, talvez próximo de 500nm. Porém, na evolução dos vertebrados (cerca de 500 milhões de anos atrás), divergindo daquele pigmento ancestral, originam-se duas novas classes de pigmentos, uma de ondas longas (OL) sintonizados com λ_{max} na faixa de 530-570 nm, e outra de ondas curtas (OC) com λ_{max} com cerca de 460nm. Esta divisão poderia ter formado a base para um sistema dicromático de visão a cores. Na seqüência, (450 milhões de anos antes) o grupo de ondas curtas sofreu novas mudanças, manifestadas pela sua diferenciação em pelo menos quatro classes de opsinas, que incluem, um grupo sensível às ondas-médias (OM) incluindo pigmentos dos grupos Mb (bastonetes) e Mc (comprimentos de onda entre 460-530nm) além dos grupos ondas curtas, diferenciados em um grupo sensível ao Azul (430-470nm) e outro sensível ao Violeta (350-340nm) (Okano *et al.*, 1992, Johnson *et al.*, 1993 ; Chang *et al.*, 1995).

A evolução precoce destes quatro grupos de opsinas forneceu as bases necessárias para a visão a cores tetracromática em todas as grandes classes de vertebrados. Contudo, esta característica permaneceu apenas nas aves, peixes e répteis de hábitos diurnos.

Finalmente, uma outra divisão gênica há cerca de 45 milhões de anos, desta feita no grupo OL, separou OL vermelho (560 nm) e OL verde (530 nm), possibilitando a visão tricromática dos primatas.

1.2 - Dados anatômicos e funcionais da visão cromática dos Didelphideos

O gambá da Mata Atlântica possui acuidade visual (1.25) inferior a dos primatas e carnívoros (Oswaldo-Cruz & Hokoç, 1979 ; Silveira *et al.*, 1982) e uma extensão total de campo visual de 223°. Tanto o gambá da Mata Atlântica como o opossum (marsupial norte-americano), exibem idêntica dimensão do campo visual binocular (125°) e, nas suas hemiretinas superiores, verifica-se uma estrutura refletora de luz (o *Tapetum Lucidum*) que, em ambientes de baixa luminosidade, pode acentuar o contraste entre objetos.

As retinas do gambá da Mata Atlântica (Ahnelt *et al.*, 1995) e do opossum (Kolb & Wang, 1985) são do tipo duplex, isto é, apresentam dois tipos de fotorreceptores, os bastonetes (para a visão noturna) e os cones (para a visão diurna) sendo que, nas retinas periféricas, a razão bastonetes/cones é de 130:1 no gambá e de 120:1 no opossum.

Uma particularidade adicional que se pode observar são os cones simples e duplos, ambos com gotículas de óleo, cujas maiores concentrações se localizam na hemiretina inferior (Ahnelt *et al.*, 1995). As gotículas de óleo estão localizadas entre os segmentos externo e o interno do cone e são comuns em répteis, aves e peixes. A presença das gotículas de óleo nos cones da retina do Gambá evidencia a retenção de características reptilianas em mamíferos, ainda que primitivos. Ao que parece, estas gotículas de óleo agem como verdadeiros filtros, cuja função é o aumento de contraste ou mesmo a ampliação da detecção de cores (Jacobs, 1993).

Neste sentido, existem estudos sugerindo que os pigmentos e as gotículas dos cones agindo em sinergia determinariam as características espectrais dos cones (Hokoç *et al.*, 2006).

Em resumo, podemos concluir que o gambá da Mata Atlântica possui os seguintes tipos morfológicos de cones:

- 1 - cones simples sem gotículas de óleo (CS)
- 2 - cones simples com gotículas de óleo (CS-GO+)
- 3 - cones duplos com gotículas de óleo (CD-GO+)

Para melhor compreensão da presumível visão cromática dos Didelphideos, importa salientar os resultados comportamentais e neurofisiológicos publicados até então na literatura pertinente. Testes da discriminação de cores (Friedman, 1967) produziram evidências sugestivas de que os opossums realizam uma variedade de discriminações de cor, inclusive, com a indicação de que são capazes de distinguir luzes vermelhas, verdes, amarelas e azuis, uma das outras, assim como entre elas e a luz acromática. Neste experimento o autor utilizou filtros Kodak 'Wratten' (vermelho nº. 25, amarelo nº. 15, verde nº. 58 e azul nº. 47). A adição de filtros de densidade neutra permitiu o ajuste dos brilhos dos filtros vermelhos, verde e amarelo para o brilho equivalente do filtro azul (Friedman, 1967). Se estas discriminações estão baseadas apenas em sinais resultantes da atividade dos cones, ainda é assunto a ser esclarecido.

Jacobs, 1993, utilizando técnicas electroretinográficas no opossum, após várias tentativas, obteve apenas respostas a um pigmento de cone com sensibilidade máxima em torno de 560 nm. Estes resultados, sugestivos de visão monocromática para o opossum, revelam incoerência com os de visão dicromática daqueles animais, tal como sugerido pela anatomia. Acertadamente, o autor comenta que esta não conformidade de resultados deve ser interpretada com cautela, visto que a ausência de evidências favoráveis à existência de outras classes de pigmentos ainda não foi devidamente esclarecida.

Estudo genético mais recente analisou a sequência das opsinas de dois marsupiais noturnos, *Monodelphis domestica* e *Didelphis aurita*, ambos da ordem Didelphimorphia. Para as duas espécies apenas duas classes de cones foram encontradas: uma com pico de absorção de ondas curtas na faixa do UV e a outra com pico de absorção de ondas longas cujo gene localiza-se no cromossomo X (Hunt *et al.*, 2009; Tabela 1).

Estes resultados divergentes demonstram que o quadro atual a respeito da visão cromática dos didelphídeos é uma questão em aberto e controversa, portanto, merecedora da atenção daqueles neurocientistas interessados em contribuir para o esclarecimento do papel seguramente relevante dos marsupiais na evolução da visão reptiliana tetracromática ou mesmo pentacromática das aves, peixes e répteis, para a visão tricromática dos primatas.

1.3 – Justificativa e Relevância

A família Didelphidae, da qual o gambá faz parte, inclui as formas mais antigas dentre os marsupiais (Hokoç, 2006). O gênero *Didelphis* parece não ter se modificado muito ao longo do tempo, pois já era encontrado com as características atuais desde o Pleoceno (Paula Couto, 1953). Acredita-se que os marsupiais assim como os monotremos e mamíferos tenham tido um ancestral comum (Hokoç, 2006). Por isso, estudar as características visuais cromáticas desses animais significa resgatar informações dos primórdios da evolução dos mamíferos.

Ao se fazer uma revisão na literatura existente sobre estudos feitos com o gambá de orelha branca (*Didelphis albiventris*), no que concerne à forma de detectar a luz visível refletida e como transformá-la em imagens cromáticas do seu meio ambiente externo, verifica-se uma escassez de trabalhos que possam esclarecer tal fenômeno. Mesmo para o gambá da Mata Atlântica (*Didelphis marsupialis aurita*) e para o opossum (*Didelphis*

virginiana), os poucos dados publicados apresentam algumas contradições que impedem uma clara compreensão sobre a visão cromática destes animais (Friedman, 1967; Jacobs, 1993; Cunha *et al.*, 2006; Hunt *et al.*, 2009; Tabela 1).

Os comprimentos de ondas máximos de absorbância (λ_{\max}) dos cones foram medidos através de microespectrofotometria em duas espécies de marsupiais. Os valores encontrados no *honey possum* (*Tarsipes rostratus*) foram 557, 505 e 350nm e no *fat-tailed dunnart* (*Sminthopsis crassicaudata*) foram 535, 509 e 350nm, representando sensibilidade aos comprimentos de onda longo (LWS), médio (MWS) e ultravioleta (UVS) respectivamente, primeira evidência para a base da visão tricromática (Arrese *et al.*, 2002; Tabela 1).

Através do método de reação em cadeia da polimerase (PCR), usando DNA genômico e cDNA como amostra, o código das opsinas dos cones de duas espécies de gambás: “fat-tailed dunnart” (*Sminthopsis crassicaudata*) e “stripe-faced dunnart” (*Sminthopsis macroura*) foi amplificado e sequenciado. A seqüência de aminoácidos dos pigmentos visuais indicam que ambas as espécies possuem pigmentos com sensibilidade ao comprimento de onda médio (MWS) e ao ultravioleta (UVS) com absorbância máxima (λ_{\max}) de 530nm e 360nm respectivamente. Nestes experimentos não houve a evidência da existência de um terceiro tipo de pigmento (Strachan *et al.*, 2004; Tabela 1).

Foi investigada a dimensão da visão de cores no “fat-tailed dunnart” (*Sminthopsis crassicaudata*) por meio de um protocolo de aprendizagem discriminativa com dois elementos baseado em diferenças no conteúdo cromático e independentemente do brilho relativo. Na discriminação, era feita uma escolha entre uma luz colorida (comprimento de onda do treinamento) e uma mistura aditiva de duas luzes coloridas diferentes (comprimentos de ondas primários). Concluiu-se que o “fat-tailed dunnart” tem uma tricromacia funcional como sugerido em estudos anteriores, mas que difere da dos primatas, com a contribuição do cone com sensibilidade ao ultravioleta (Arrese *et al.*, 2006; Tabela 1). Como este achado

contrasta com o do “tammam wallaby” (*Macropus eugenii*), reportado como dicromata (Hemmi, 1999), estudos comportamentais subsequentes, com uma maior variedade de espécies, irão determinar se a tricromacia é o sistema geral da visão de cores dos marsupiais australianos.

Assim, há informações contraditórias sobre visão de cores em marsupiais, onde estudos genéticos afirmam a dicromacia, e estudos de microespectrofotometria, tricromacia. No caso dos estudos com base comportamental, há também conflitos na dimensionalidade da visão de cores encontrada, embora todas estas investigações tenham utilizado estímulos luminosos (luz emitida e não refletida).

TABELA 1
SUMÁRIO DOS ESTUDOS DE VISÃO DE CORES EM MARSUPIAIS

ANIMAL	Nº Sujeitos	MÉTODO	FOTOPIGMENTOS	REFERÊNCIA
<i>Didelphis virginiana</i>	2	C	SWS, MWS, LWS	Friedman, 1967
<i>Didelphis virginiana</i>	NI	ERG	LWS	Jacobs, 1993
<i>Didelphis aurita</i>	6	ERG	UV, MWS, LWS	Cunha <i>et al.</i> , 2006
<i>Didelphis aurita</i>	NI	G	UV, LWS	Hunt <i>et al.</i> , 2009
<i>Isodon obesulus</i>	6	MSP	UV, MWS, LWS	Arrese <i>et al.</i> , 2005
<i>Macropus eugenii</i>	1	ERG	MWS	Deeb, <i>et al.</i> , 2003
<i>Macropus eugenii</i>	1	G	MWS, SWS	Deeb, <i>et al.</i> , 2003
<i>Macropus eugenii</i>	2	C	MWS, SWS	Hemmi, 1999
<i>Monodelphis domestica</i>	NI	G	UV, LWS	Hunt <i>et al.</i> , 2009
<i>Setonix brachyurus</i>	6	MSP	UV, MWS, LWS	Arrese <i>et al.</i> , 2005
<i>Sminthopsis Crassicaudata</i>	1	G	SWS, LWS	Strachan <i>et al.</i> , 2004
<i>Sminthopsis Crassicaudata</i>	2	C	UV, MWS, LWS	Arrese, <i>et al.</i> , 2006
<i>Sminthopsis crassicaudata</i>	3	MSP	UV, MWS, LWS	Arrese <i>et al.</i> , 2002
<i>Sminthopsis Macroura</i>	1	G	UV, MWS	Strachan <i>et al.</i> , 2004
<i>Tarsipes rostratus</i>	3	MSP	UV, MWS, LWS	Arrese <i>et al.</i> , 2002
<i>Tarsipes rostratus</i>	0	IT	UV, MWS, LWS	Sumner <i>et al.</i> , 2005

Abreviaturas:

C (Comportamental); ERG (eletroretinografia) G (Genética), IT (inferência teórica a partir da composição espectral de itens forrageados), LWS (sensível a comprimentos de ondas longos), NI (não informado) MSP (microespectrofotometria); MWS (sensível a comprimentos de ondas médios), SWS (sensível a comprimentos de ondas curtos), UV (sensível ao ultravioleta).

Apesar da genética molecular e da eletroretinografia propiciarem uma maior precisão na identificação dos diferentes tipos de cones existentes nas retinas dos marsupiais estudados, estes métodos não respondem a todas as perguntas. Jacobs (1993) afirma que estudos que investiguem a percepção de cores precisam contar com uma avaliação comportamental adequada, com rigoroso controle de brilho. A abordagem comportamental, quando bem conduzida, pode apresentar grande relevância, uma vez que a percepção de cores no ambiente natural reflete um processo mais complexo do que a atividade de cones (Sharpe *et al.* 1999) e envolve processamentos ativos conduzidos pelo sistema nervoso de forma geral (Zeki, 1993). A importância da abordagem comportamental também se revela nos experimentos de Jacobs e colaboradores (1999), nos quais camundongos transgênicos, diagnosticados como tricromatas através da genética molecular e eletroretinografia, comportam-se como dicromatas quando submetidos a testes de discriminação visual.

Reconhecendo, tal como Jacobs (1993), que a compreensão do fenômeno da visão cromática depende somente de evidências diretas obteníveis através de estudos comportamentais corretamente conduzidos, o presente projeto pretende contribuir para o conhecimento dos mecanismos perceptuais da visão cromática deste importante grupo de mamíferos primitivos, que foram os protagonistas de um passo decisivo na gênese de novas espécies mamíferas.

Ademais, a maior parte dos estudos comportamentais em percepção de cores, em animais, utilizam luzes monocromáticas, abruptamente ligadas e desligadas (Jacobs, 1993). Assim, optamos pela utilização de um estímulo que se aproxime mais do ambiente visual natural. Neste aspecto, os papéis cromáticos de Munsell, além de terem sido amplamente utilizados, pelo grupo de pesquisas de visão de cores do Laboratório de Neurociências e Comportamento da UnB, em experimentos com várias espécies de primatas não humanos (e.g. Gomes *et al.*, 2002; Pessoa *et al.*, 1997; Pessoa *et al.*, 2003, 2005; Prado *et al.*, 2008;

Araújo *et al.*, 2008), possuem uma refletância espectral complexa, semelhante ao que ocorre em uma superfície do ambiente natural (Lennie & D’Zmura, 1988).

1.4– Objetivos Gerais

→ Descrever a capacidade de indivíduos *Didelphis albiventris* em tarefas de discriminação de cor, utilizando uma abordagem comportamental;

→ Contribuir com informações acerca da ecologia desses marsupiais e acerca da evolução da visão de cores em mamíferos.

1.5 – Objetivos Específicos

→ Investigar a existência de tricromatismo ou de dicromatismo em machos e fêmeas de marsupiais da espécie *Didelphis albiventris*;

→ Avaliar e validar a utilização de papéis de Munsell no diagnóstico dos tipos de visão de cores em marsupiais da espécie *Didelphis albiventris*.

2. MÉTODOS

2.1 – Sujeitos

O gambá *Didelphis albiventris* (Figura 2), espécie endêmica no Cerrado da Região Centro-Oeste brasileira, foi utilizado nestes experimentos.

Os gambás são animais de pequeno porte, vida semi-arborícola e de hábitos crepusculares ou noturnos. São basicamente solitários e anti-sociais. Entre eles são agressivos, mas podem conviver vários dias juntos no período de acasalamento. Aos seis meses de vida atingem a capacidade reprodutiva. Em natureza vivem até 3 anos, mas em cativeiro podem viver até 5 anos (Nowak, 1991).

Assim, 7 filhotes (Tabela 2) foram capturados em outubro de 2006, na fazenda da UnB, FAL (Fazenda Águas Limpas), com a devida autorização do IBAMA (Anexo 1). Foram identificados e mantidos em gaiolas individuais (com 90 cm de largura, 90 cm de profundidade e 50 cm de altura, feitas de madeira e com porta com grade de ferro) localizadas no Laboratório de Neurociências e do Comportamento da Universidade de Brasília. As gaiolas eram forradas com folhas de jornais e cobertas com feno e possuíam em seu interior um tronco de árvore para o animal escalar. A dieta consistiu no fornecimento diário de ração peletizada para cães em crescimento, frutas ou ovos cozidos e água *ad libitum*. A pesquisa teve a devida autorização do Comitê de Ética (Anexo 2).



Figura 2. Indivíduo da espécie *Didelphis albiventris*.

TABELA 2
IDENTIFICAÇÃO DOS SUJEITOS QUANTO AO SEXO E À PARTICIPAÇÃO NAS
DIFERENTES ETAPAS DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Sujeito	Sexo	Etapas concluídas
Ayra (A)	Feminino	Até modelagem 2
Frodo (F)	Masculino	Todas
Merry (M)	Masculino	Outras fases – veio a óbito
Mohana (O)	Feminino	Nenhuma
Pippin (P)	Masculino	Outras fases – veio a óbito
Safira (I)	Feminino	Todas
Sam (S)	Masculino	Todas

2.2 - Labirinto

Neste estudo, foi utilizado um labirinto de dupla escolha para discriminação visual, construído em madeira compensada e revestida em fórmica de cor cinza neutro (Figura 6). Este labirinto consiste numa câmara de partida (Figura 3 - A) que, pela remoção de uma partição opaca e móvel, permite ao animal acesso à câmara de dupla-escolha (Figura 3 - B), em cuja extremidade oposta encontram-se duas peças basculantes (janelas) de acrílico (Figuras 4 e 5). Cada uma das janelas foi construída de forma a permitir a colocação e a retirada dos envelopes contendo as folhas de Munsell. As janelas permitem a visualização dos papéis por parte dos sujeitos, que devem empurrá-las de forma a ter acesso ao reforço (Figura 10).

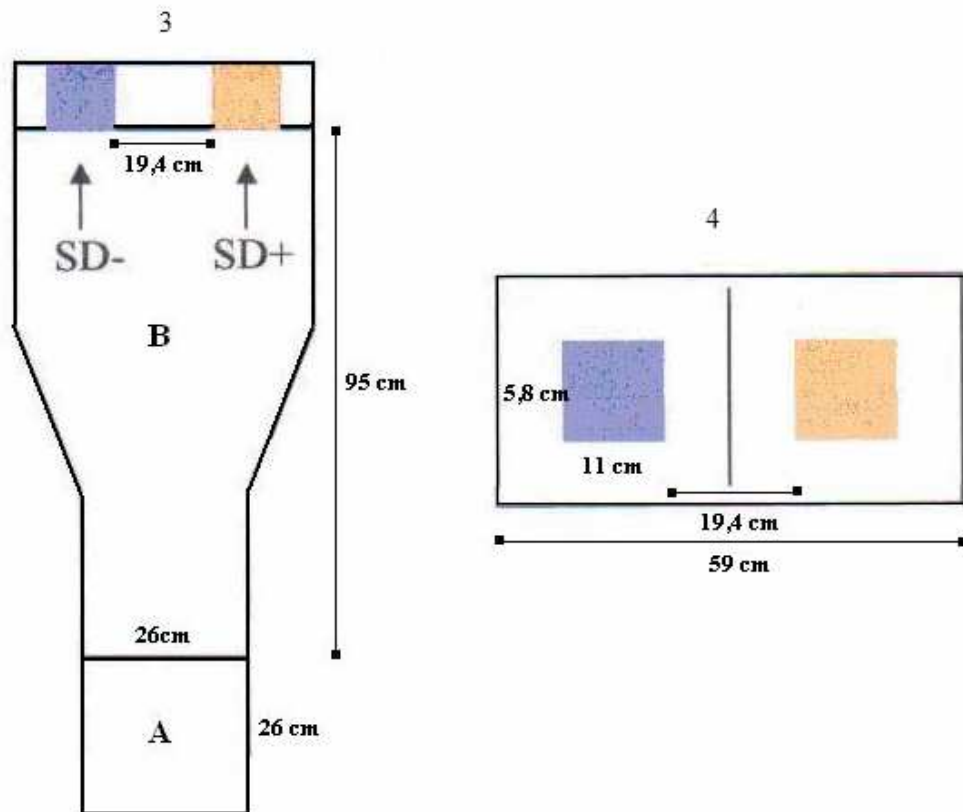


Figura 3. Vista superior do labirinto. SD- (estímulo discriminativo negativo); SD+ (estímulo discriminativo positivo).

Figura 4. Representação das janelas basculantes onde são apresentados os estímulos.

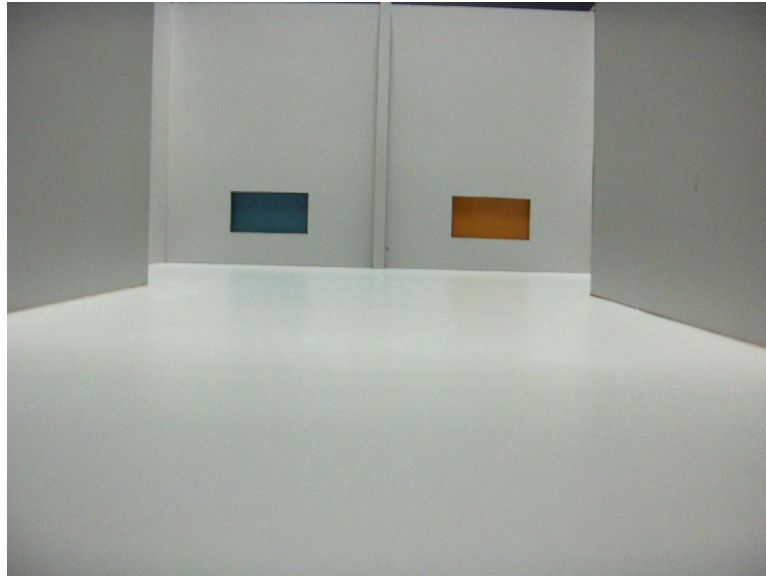


Figura 5. Vista frontal do labirinto a partir da câmara de partida.



Figura 6. Vista lateral do labirinto.

A iluminação é fornecida por lâmpada fluorescente modelo D-65 de 20 watts, suspensa por cima do labirinto, a aproximadamente 1m. Para produzir um iluminante que se assemelhasse às condições do meio ambiente natural no período de maior atividade do animal, camadas de papéis vegetais foram interpostas entre a luz e o suporte dos bulbos. A mensuração foi realizada dentro do labirinto, pelo luxímetro TENMA Light Meter 72-7250 e resultou em 119 lux (Figura 7).



Figura 7. Luxímetro posicionado próximo às janelas do labirinto.

2.3 - Estímulos

Como estímulos foram utilizados papéis de Munsell (cartões de 12,5 por 7,5). O sistema de Munsell (Munsell, 1966; Newhall, 1940) possui uma notação onde a cor é especificada pelo seu matiz (um número e a letra inicial da cor correspondente) e níveis de brilho sobre saturação (por exemplo, 2.5YR 4/14 é a notação correspondente a um “yellow-red” ou laranja 2.5, com brilho 4 e saturação 14). Os papéis de Munsell têm sido utilizados em vários experimentos de discriminação de cores em crianças e em primatas não-humanos, representando um método confiável e muito indicado em estudos comportamentais (Gomes *et al.*, 2002; Pessoa *et al.*, 1997; Savage *et al.*, 1987).

Foram utilizados, como base para este estudo, pares de papéis de Munsell selecionados em testes previamente realizados com humanos. Nestes testes, seis indivíduos daltônicos (dois com cones para o vermelho ausentes ou anômalos - protans e quatro com cones para o verde ausentes ou anômalos - deutans) estabeleceram uma seqüência de papéis de Munsell que, para eles, eram muito semelhantes. Este procedimento permitiu a escolha de dez pares de estímulos que estavam em pontos de difícil discriminação para daltônicos. Para exemplificar, dois indivíduos diagnosticados, pelo teste de Ishihara, como daltônicos protans, selecionaram o par 2.5YR 4/14 (um laranja puro ou saturado) e 7.5GY 4/10 (um verde saturado) como sendo cores muito semelhantes. Dentre os pares selecionados no experimento com os humanos, foram escolhidos aqueles que envolviam YR (yellow-red – laranja) vs. GY (green-yellow – verde).

O procedimento visa conhecer os diferentes graus de dificuldade na discriminação entre os pares de papéis de Munsell, entre indivíduos, e no mesmo indivíduo. Assim, o SD+ foi fixado e pareado com diferentes matizes, permanecendo a variação aleatória de brilho, formando pares de fácil ou de difícil discriminação. Foram montados então três blocos de testes, correspondentes aos pares encontrados nos testes com os humanos (Gomes *et al.*, 2002). Para exemplificar, o bloco do 10YR é constituído por dois pares de fácil discriminação

(10YR n/10 pareado com 7.5B n/4 e 5B n/6 podendo assumir os valores de brilho 4, 5, 6, 7 e 8) e por um par de difícil discriminação para dicromata (10YR n/10 pareado com 5GY n/10; n podendo assumir os valores de brilho 5, 6, 7 e 8) obtido no já citado experimento com humanos.

Cada papel foi mantido permanentemente dentro de um envelope de acrílico transparente (3 mm de espessura) como forma de protegê-los da manipulação direta por parte dos animais, evitando assim que fossem danificados.

2.4 – Procedimentos

Os experimentos foram conduzidos em quatro fases:

- Adaptação;
- Modelagem 1;
- Modelagem 2; e
- Testes comportamentais para discriminação visual.

2.4.1 - Adaptação

A adaptação dos animais aos experimentadores foi necessária para que a presença humana não causasse estresse aos sujeitos experimentais, prejudicando o seu desempenho nos testes comportamentais. Nesta fase, cada filhote teve o manuseio de, no mínimo, dez minutos diários (Figura 8). O período de adaptação abrangeu os primeiros 6 meses de vida dos animais. No final destas sessões de domesticação, os animais recebiam sua ração alimentar.



Figura 8. Manipulação de filhote da espécie *Didelphis abiventris*.

2.4.2 – Modelagem 1

Foram realizadas sessões diárias com objetivo de estimular o animal a explorar o labirinto. Após a abertura da porta de partida foram utilizadas iscas (pedaços de frutas e ração para cachorro) a distâncias cada vez mais próximas do painel de discriminação. Na progressão desta modelagem, os animais foram treinados a abrir, aleatoriamente, as janelas de ambos os lados (direita/esquerda), evitando-se com isto a formação de comportamentos de preferência. Ambas as janelas possuíam reforço. Em cada janela foi colocado um papel de cor laranja (10 YR), de brilho variado, para que já associassem o laranja ao estímulo positivo. Esta condição foi mais bem trabalhada na modelagem 2. O critério para esta tarefa ser considerada como finalizada com sucesso foi um tempo de latência máximo de dez segundos, contados a partir da saída do animal até a abertura da janela contendo a recompensa.

2.4.3 – Modelagem 2

Depois de retirados das suas gaiolas, os animais eram colocados na câmara de partida do labirinto. As sessões duravam aproximadamente uma hora para cada animal. Dois estímulos eram pareados, o estímulo positivo foi o papel laranja (10YR) e o estímulo negativo, a cartolina preta (Figura 9). Nesta fase não houve variação do brilho do estímulo negativo. Era colocada uma porção de 1g de ovo cozido atrás de cada janela, eliminando a escolha pela pista olfativa. Após a abertura da câmara de partida, o animal deveria dirigir-se à outra extremidade do labirinto e tocar o focinho onde estava inserido o cartão laranja, abrindo a janela e recebendo a recompensa (Figura 10). A janela com o estímulo negativo era mantida fechada. Caso o gambá escolhesse a janela com estímulo negativo, ele era reconduzido para a câmara de partida e, após dez segundos, dava-se início a uma nova tentativa. Eram realizadas em média trinta tentativas por sessão. Cada vez que o gambá escolhia a janela com o estímulo positivo era considerado acerto e a escolha da outra janela, erro. Para o animal passar desta fase de modelagem, foi necessário alcançar o número de acertos acima da aleatoriedade em cinco sessões consecutivas, considerando-se o número total de 30 tentativas em cada sessão.

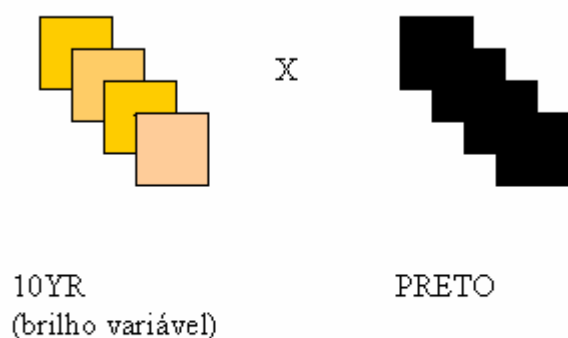


Figura 9. Representação esquemática dos estímulos utilizados na modelagem 2

2.4.4 – Testes comportamentais

Os animais já modelados fizeram escolhas entre as duas janelas com o estímulo positivo ou negativo. A apresentação dos estímulos entre as posições direita e esquerda seguiu a tabela de Gellerman (1933) para números aleatórios, para evitar que os animais utilizassem a posição de apresentação dos estímulos como uma pista na realização dos testes. Percentuais de acertos em cada sessão foram calculados. O teste binomial foi utilizado para construir os limites de confiança de 95% sobre o desempenho aleatório, com base no número de tentativas do teste (Savage *et al*, 1987). O teste para cada par foi realizado em duas sessões com 32 tentativas cada, totalizando 64 tentativas. O limite superior de aleatoriedade foi calculado em 62,25% e o inferior em 37,75%.



Figura 10. Sujeito (*Didelphis albiventris*) acessando o reforço (ovo cozido)

Não houve repetição do mesmo par no caso de erros. Todos os pares seguiram o mesmo protocolo. Após cada tentativa, os acrílicos utilizados que continham os estímulos

eram limpos com o mesmo pano úmido para homogeneizar os odores deixados pelo animal após o contato com o envelope. Foram utilizados 4 pares de discriminação (Figura 11).

2.4.4.1- 1º Par – considerado de fácil discriminação

As duas primeiras sessões foram realizadas com estímulo positivo laranja (10YR) com brilho variado (5/10, 6/10, 7/10 e 8/10) e o negativo azul (7.5B) com brilho variado (5/4, 6/4, 7/4 e 8/4).

2.4.4.2 – 2º Par – considerado de difícil discriminação

Foram pareados os papéis (10YR) com brilho variado (5/10, 6/10, 7/10 e 8/10) com o estímulo negativo verde (5GY) com brilho variado (5/10, 6/10, 7/10 e 8/10).

2.4.4.3 – 3º Par – considerado de fácil discriminação

O segundo par fácil foi realizado após as duas sessões do par difícil. Esta etapa foi importante para confirmar o desempenho dos animais na discriminação entre o laranja e o azul. Os estímulos utilizados foram (10YR) com brilho variado (5/10, 6/10, 7/10 e 8/10) e azul 7.5B com brilho variado (4/6, 5/6, 6/6 e 7/6).

2.4.4.4 – Par de impossível discriminação

A última fase de testes foi realizada com dois papéis idênticos de matiz 10YR e brilho 5/10. Havia uma pequena marcação no verso de um deles para que este fosse o estímulo positivo.

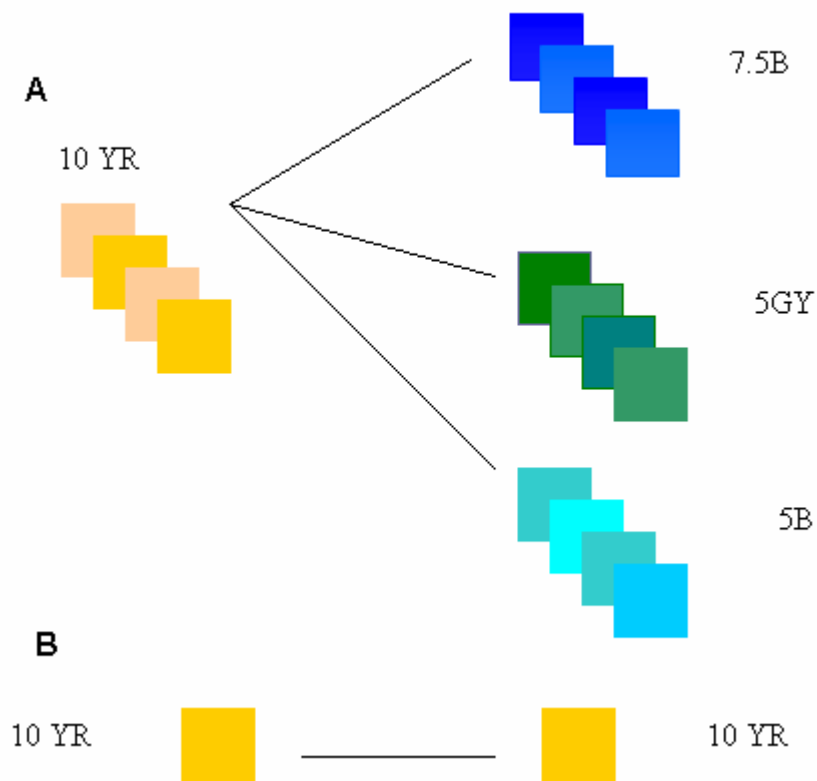


Figura 11. Representação esquemática dos estímulos utilizados nos testes discriminativos.

A - O estímulo positivo 10YR (“yellow-red”) de brilho variado foi pareado com os estímulos negativos 7.5B (“blue”), 5GY (“green-yellow”) e 5B (“blue”) representando: 1º par fácil, par difícil e 2º par fácil respectivamente.

B - O estímulo positivo 10YR de brilho fixo foi pareado com estímulo negativo 10 YR idêntico representando o par de impossível discriminação.

3. RESULTADOS

3.1- Adaptação

Os quatro gambás machos ficaram adaptados à presença humana com aproximadamente seis meses de vida. As três fêmeas apresentaram maior dificuldade de aceitar o manuseio e após esse período ainda manifestaram comportamento arisco, com tentativas de mordidas e emitindo sons de agressividade. Para diminuir a resposta agressiva dos animais, mudou-se o horário de manipulação. O contato com os sujeitos passou a ser realizado durante o período de maior atividade do animal: após as 17h. Uma fêmea (Mohana) não se adaptou à presença humana não participando das demais etapas da pesquisa.

3.2 – Modelagem 1

Durante a modelagem 1, os sujeitos exploraram o labirinto de forma dinâmica e intensa e facilmente responderam à procura de alimento. Manifestaram o interesse em abrir as janelas e comer o reforço (ração) que havia por detrás das janelas. Esta fase teve duração aproximada de um mês.

3.3 – Modelagem 2

Quatro sujeitos, sendo dois machos (S e F) e duas fêmeas (A e I), conseguiram manter seu desempenho acima da aleatoriedade em pelo menos cinco sessões consecutivas (Tabela 3).

A fêmea Ayra (A) realizou 64 sessões, com média de 24,43 tentativas por sessão, e manteve-se estável a partir da 60ª sessão (Figura 12).

O macho Frodo (F) realizou um total de 79 sessões, com média de 29,18 tentativas por sessão. O sujeito manteve seu desempenho acima do nível do acaso a partir da 54^a sessão (Figura 13).

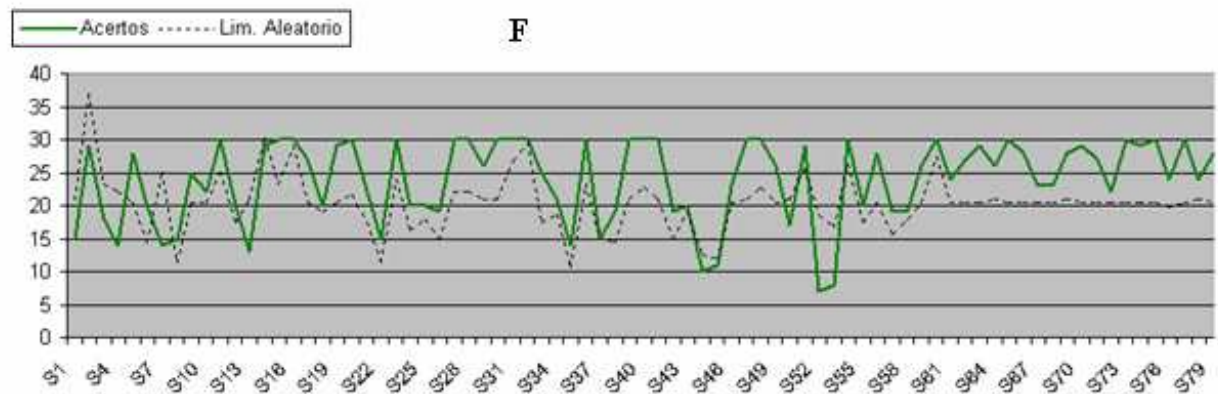
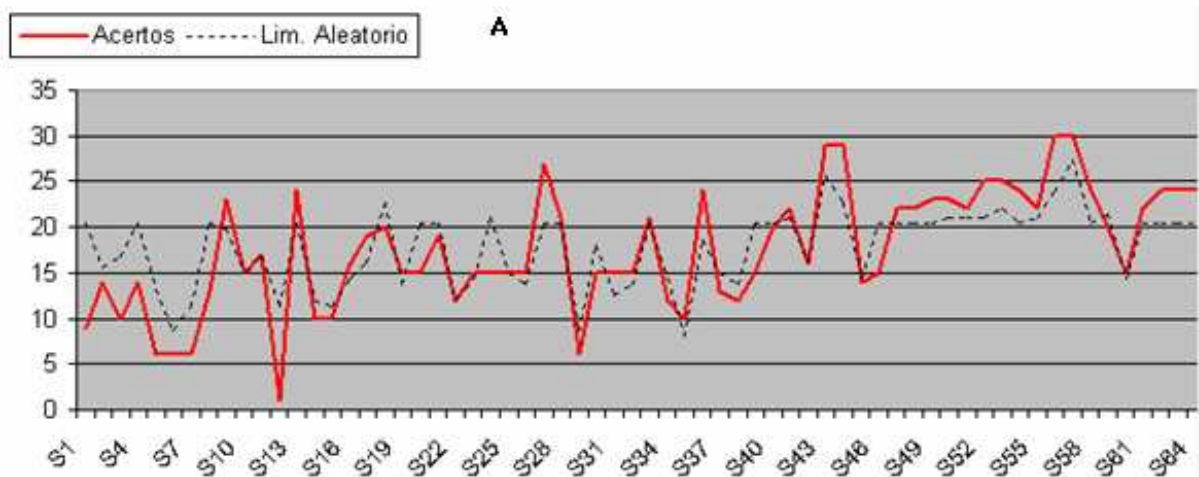
A fêmea Safira (I) realizou 64 sessões, com média de 26,31 tentativas por sessão. Ficou com o desempenho estável acima da aleatoriedade a partir da 54^a sessão (Figura 14).

O macho Sam (S) realizou 81 sessões, com média de 31,4 tentativas por sessão. Ficou com o desempenho estável acima da aleatoriedade a partir da 70^a sessão (Figura 15).

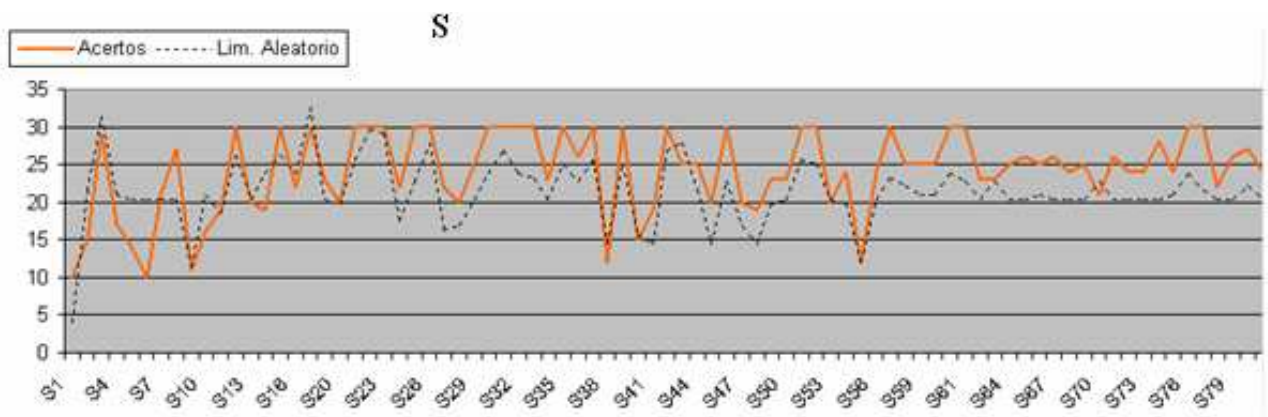
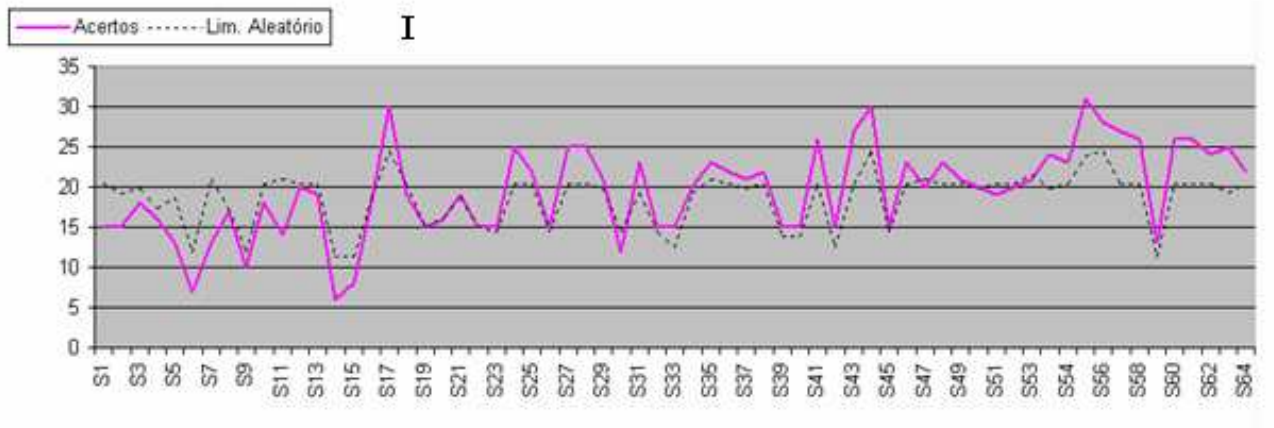
Após esta fase, os animais foram considerados aptos a realizar os testes comportamentais.

TABELA 3
DESEMPENHO DOS SUJEITOS (*Didelphis albiventris*) NA MODELAGEM 2

Sujeito	Nº de sessões	Nº de sessões com resultados acima da aleatoriedade	Estável a partir da sessão:	Média de tentativas por sessão
Ayra (A) ♀	64	38	60 ^a	24,43
Frodo (F) ♂	79	67	54 ^a	29,18
Safira (I) ♀	64	42	54 ^a	26,31
Sam (S) ♂	81	65	71 ^a	31,40



Figuras 12 e 13 – Desempenhos de *Didelphis albiventris* em tarefa visual discriminativa (modelagem 2). Sujeitos: Ayra (A) e Frodo (F). A linha tracejada representa o limite superior de aleatoriedade, a linha contínua colorida representa o número de acertos em cada sessão.



Figuras 14 e 15 – Desempenhos de *Didelphis albiventris* em tarefa visual discriminativa Modelagem 2. Sujeitos: Safira (I) e Sam (S). A linha tracejada representa o limite superior de aleatoriedade, a linha contínua colorida representa o número de acertos em cada sessão.

3.4 – Testes comportamentais

Dois machos (S e F) e uma fêmea (I) completaram todas as fases de teste. Foram encontrados três resultados distintos.

O macho F manteve-se acima da aleatoriedade em todas as fases dos testes comportamentais, inclusive na do par impossível (Figura 16; Tabela 4).

A fêmea I, por outro lado, teve seu rendimento abaixo da aleatoriedade em todas as fases dos testes comportamentais (Figura 17; Tabela 5).

O macho S manteve o número de acertos acima da aleatoriedade nos pares de fácil discriminação para dicromatas (10YR Vs. 5B e 10 YR Vs. 7.5B), porém, seu rendimento caiu para níveis aleatórios no par de difícil discriminação (10YR Vs. 7.5GY) e no impossível (10YR 5/10 Vs. 10YR 5/10) (Figura 18; Tabela 6).

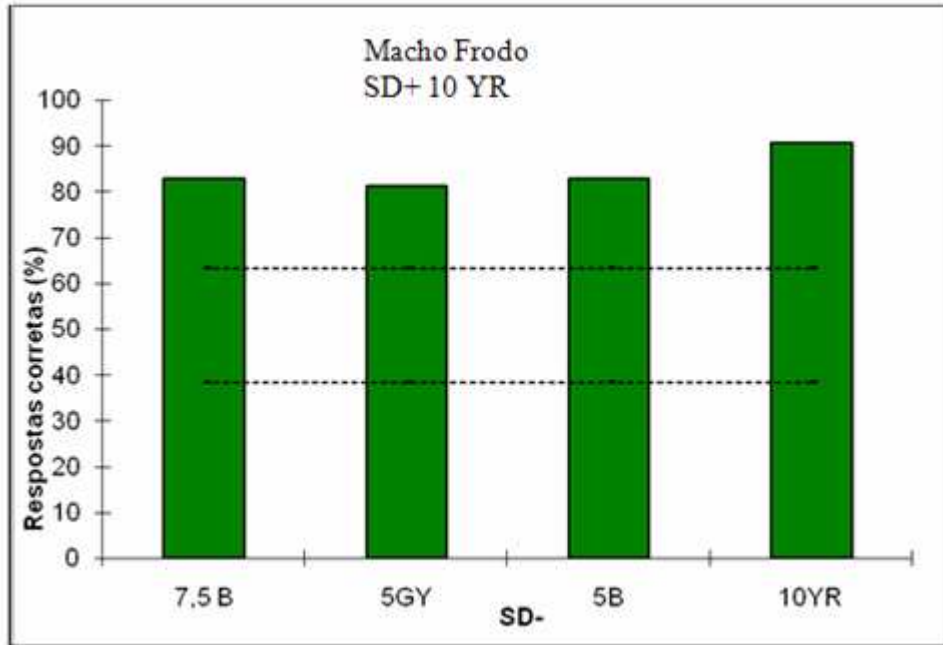


Figura 16. Desempenho do macho Frodo nos testes comportamentais. O estímulo positivo 10YR foi pareado com os estímulos negativos 7.5B, 5GY, 5B e 10YR. As linhas tracejadas representam os limites inferior e superior de aleatoriedade.

TABELA 4
DESEMPENHO NO TESTE COMPORTAMENTAL - FRODO

TAREFA	Nº de acertos	Percentual de acertos
10 YR Vs. 7.5B (par fácil)	53	82,81%
10YR Vs. GY (par difícil)	52	81,25%
10YR Vs. 5B (par fácil)	53	82,81%
10YR Vs. 10YR (par impossível)	58	90,62%

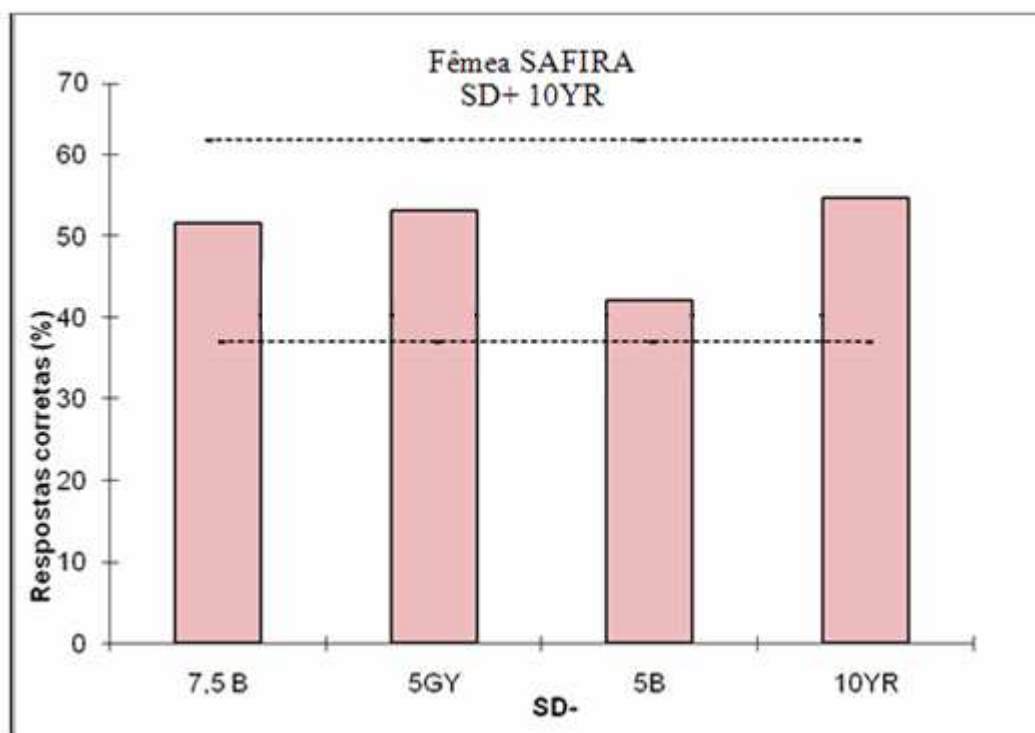


Figura 17. Desempenho da fêmea Safira nos testes comportamentais. O estímulo positivo 10YR foi pareado com os estímulos negativos 7.5B, 5GY, 5B e 10YR. As linhas tracejadas representam os limites inferior e superior de aleatoriedade.

TABELA 5
DESEMPENHO NO TESTE COMPORTAMENTAL - SAFIRA

TAREFA	Nº de acertos	Percentual de acertos
10 YR Vs. 7.5B (par fácil)	33	51,56%
10YR Vs. GY (par difícil)	34	53,12%
10YR Vs. 5B (par fácil)	27	42,18%
10YR Vs. 10YR (par impossível)	35	54,68%

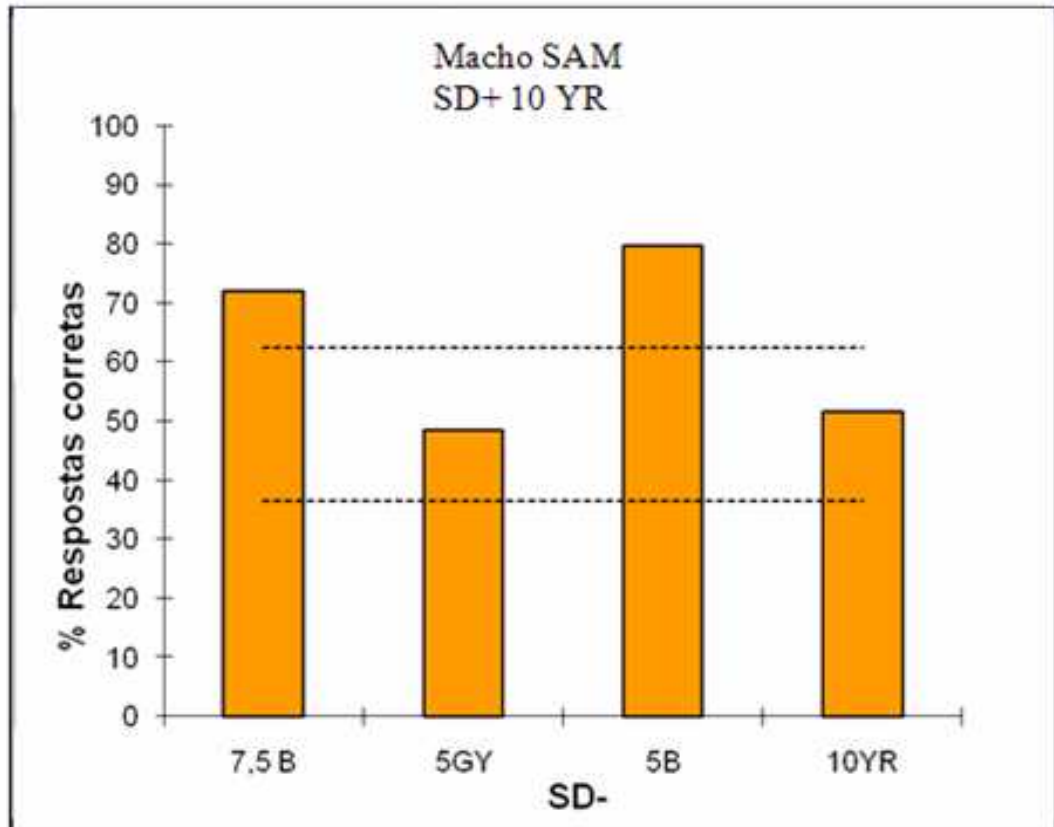


Figura 18. Desempenho do macho Sam nos testes comportamentais. O estímulo positivo 10YR foi pareado com os estímulos negativos 7.5B, 5GY, 5B e 10YR. As linhas tracejadas representam os limites inferior e superior de aleatoriedade.

TABELA 6
DESEMPENHO NO TESTE COMPORTAMENTAL - SAM

TAREFA	Nº de acertos	Percentual de acertos
10 YR Vs. 7.5B (par fácil)	46	71,87%
10YR Vs. GY (par difícil)	31	48,43%
10YR Vs. 5B (par fácil)	51	79,68%
10YR Vs. 10YR (par impossível)	33	51,56%

4. OUTRAS FASES

A proposta inicial para o treinamento dos sujeitos até chegarem a fase de testes comportamentais foi bem diferente da acima descrita. Houve uma evolução de tentativas e idéias que merecem ser comentadas e discutidas.

4.1 – Protocolo A

Este protocolo refere-se à primeira modelagem realizada para que os animais escolhessem um dos lados do labirinto. Foi iniciada após a modelagem 1 já comentada na parte da metodologia.

Nesta fase os animais deveriam fazer escolhas entre o laranja (10YR) e o azul (7.5B), ambos com variação aleatória de brilho. Cada sessão era realizada com 10 tentativas e seguia uma tabela de pseudo-aleatoriedade. Após seis meses de treino, os sujeitos ainda apresentavam desempenho abaixo da aleatoriedade. O número de tentativas por sessão foi aumentado de 10 para 30. Mesmo com este aumento, os animais permaneceram com desempenho aleatório.

4.2 – Protocolo B

Refere-se ao protocolo da nova modelagem utilizada após o fracasso da modelagem com o protocolo A. Aparentemente, o nível de dificuldade da tarefa discriminatória estava alto. Para simplificar a tarefa, foram apresentados pares de estímulos com brilho fixo. Foram utilizados pares como exemplo: 10YR 5/10 Vs. 7.5B 5/4 durante as 15 primeiras tentativas e 10YR 6/10 Vs. 7.5B 6/4 nas 15 restantes da mesma sessão.

A fase de modelagem utilizando o protocolo B durou de 36 a 49 sessões e todos os quatro sujeitos, sendo três machos (S, F e P) e uma fêmea (A), mantiveram o número de acertos acima da aleatoriedade após a 15ª sessão (Figura 19).

Com este novo protocolo o desempenho dos sujeitos passou a ser significativo. Passou-se então para o Protocolo C.

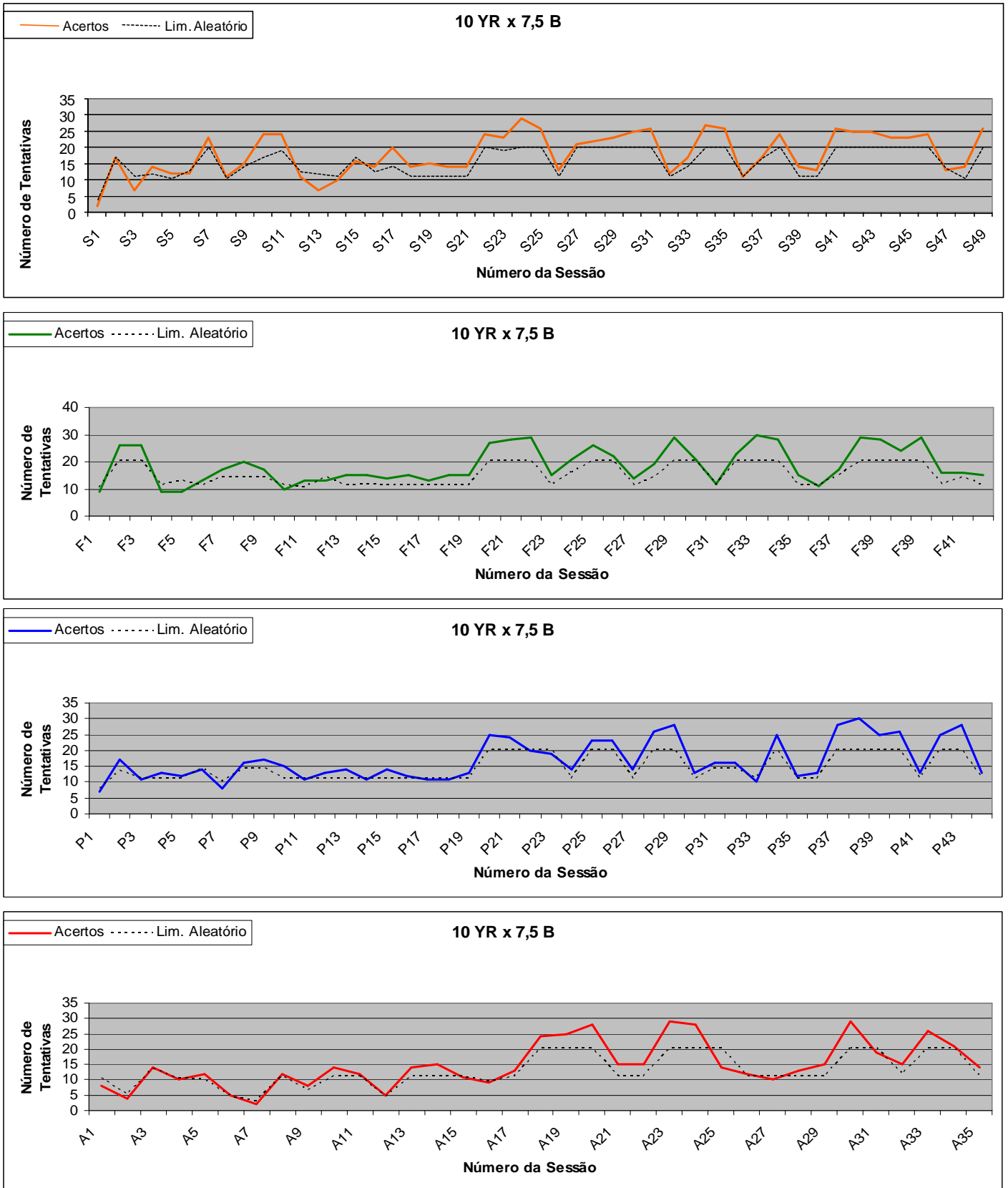


Figura 19. Resultados da modelagem utilizando o protocolo B. O SD+ (10YR) foi pareado com azul (7.5B), ambos com brilho fixo. A linha contínua representa o número de acertos e a linha tracejada o limite superior de aleatoriedade. S, F, P e A representam as iniciais dos gambás (*Didelphis albiventris*): Sam, Frodo, Pippin e Ayra. Ao lado das iniciais estão os números respectivos das sessões.

4.3 – Protocolo C

Refere-se ao mesmo procedimento realizado após concluída a modelagem com o protocolo B. Utilizou-se o mesmo procedimento realizado no protocolo A, ou seja, apresentação do primeiro par de fácil discriminação (laranja 10YR e azul 7.5B) com variação aleatória de brilho.

Foram realizadas de 40 a 43 sessões com três indivíduos, sendo dois machos (S e F) e uma fêmea (A). Os três sujeitos conseguiram os resultados acima da aleatoriedade; o macho F e a fêmea A após a 7ª sessão. O resultado do macho S oscilou próximo à linha da aleatoriedade até a 19ª sessão, após esta, o resultado se manteve acima da aleatoriedade (Figura 20).

O número de acertos dos sujeitos manteve-se acima da aleatoriedade e estavam aptos a passar para a fase de testes quando se comprovou a existência de pistas olfativas.

Quando o sujeito passava pela janela para acessar a recompensa (ovo cozido), havia o contato direto do dorso do gambá com os envelopes que continham os estímulos positivos e estes ficavam marcados com o cheiro do animal. Já os envelopes com os estímulos negativos só eram tocados pelos focinhos.

Para comprovar a veracidade deste fato, os envelopes de acrílico que contêm os papéis de Munsell foram trocados: os papéis 10YR (SD+) foram colocados nos envelopes onde antes permaneciam os papéis 7.5B (SD-) e, da mesma forma, estes últimos foram guardados nos acrílicos dos primeiros. Os sujeitos, que já apresentavam um resultado significativo, passaram a escolher os envelopes com o estímulo negativo.

Adotou-se então a limpeza dos acrílicos após cada tentativa do animal, independentemente de sua resposta (acerto ou erro). Esse procedimento teve como objetivo homogeneizar os odores deixados nos acrílicos e evitar a pista olfativa. Após esse novo procedimento, os desempenhos voltaram aos níveis de aleatoriedade.



Figura 20. Resultados da modelagem utilizando o protocolo C. O SD+ (10YR) com brilho variado (5/10, 6/10, 7/10, 8/10) foi pareado com o azul (7.5 B) com brilho variado (4/10, 5/10, 6/10, 7/10). A linha contínua representa o número de acertos e a linha tracejada o limite superior de aleatoriedade. S e F representam as iniciais dos machos (Sam e Frodo), e A, da fêmea (Ayra). Ao lado das iniciais estão os números respectivos das sessões.

5. DISCUSSÃO

5.1 - Motivação dos sujeitos

Com o desenvolvimento desta pesquisa foi possível constatar a importância de manter os sujeitos experimentais motivados para a realização do teste.

O sujeito Sam apresentou maior motivação para a realização do teste, pois foi possível começar os testes com este indivíduo mais cedo do que com os demais. Aparentemente os machos se esforçavam mais para concluir com sucesso a tarefa discriminatória do que as fêmeas. Um dos motivos relevantes observados para explicar essa diferença do comportamento entre os indivíduos era o apetite do animal. Os machos se movimentavam mais dentro das gaiolas, bebiam mais água e estavam frequentemente com muito apetite. Durante os testes comiam todo o reforço oferecido.

Para aumentar a motivação dos animais, em especial a das fêmeas, foi trocado o reforço que inicialmente era uva e passou a ser ovo cozido e ração. A quantidade de alimento oferecido durante as sessões e após o término dessas precisou ser revista sempre que a motivação dos sujeitos caía. A água permaneceu *ad libitum*.

5.2 – Contato visual com outros indivíduos

Os sujeitos foram mantidos em gaiolas, privados do contato visual com outros indivíduos da mesma espécie ou de outras espécies. Entre os sujeitos foram mantidos apenas os contatos auditivo e olfativo. As gaiolas eram dispostas lado a lado, impedindo que os sujeitos se vissem. O contato visual era realizado esporadicamente nos momentos em que o sujeito saía da sua gaiola durante a limpeza dessas e nas sessões do experimento.

O bem-estar dos animais facilita o desenvolvimento dos experimentos. Os sujeitos precisam de um local maior para explorar, gastar suas energias. Apesar do ambiente pequeno,

os machos ainda se mostravam ativos durante o final da tarde e à noite. As fêmeas, por outro lado, apresentavam-se diversas vezes sonolentas, vagarosas e pouco motivadas a realizar os experimentos, mesmo com a privação de alimentos durante o dia.

5.3 – Simplificação de tarefas

A partir desse estudo, foi possível perceber que a realização de tarefas aparentemente simples pode ser muito complexa para o animal. Foi importante alterar as fases de realização do experimento, incluindo a modelagem com o cartão preto, para diminuir o nível de dificuldade das tarefas. A inclusão dessa nova fase tornou possível o aprendizado de tarefas de discriminações menos evidentes: pareamento dos estímulos (positivos e negativos) com variação aleatória de brilho.

5.4 – Importância do teste impossível

O teste considerado de discriminação impossível foi de extrema importância nesta pesquisa. O resultado dos testes comportamentais do sujeito Frodo foi invalidado devido ao alto desempenho durante as sessões com o par impossível. Caso esta fase final não fizesse parte da seqüência de testes, poder-se-ia concluir erroneamente que esse indivíduo era um tricromata.

Por outro lado, a utilização do par impossível permitiu corroborar os resultados dos testes discriminativos do sujeito Sam que teve queda em seu desempenho na realização da fase final. Com isso, concluímos que esse sujeito guiava-se por pistas visuais e não olfativas.

5.5 – Pistas olfativas

O encéfalo do gambá, classificado como sendo típico de um animal macrosmático, sem corpo caloso, apresenta um enorme bulbo olfatório com um grosso e curto pedúnculo e amplos tratos olfatórios, que distribuem suas fibras numa enorme área de paleopálio, correspondente à superfície do trígono (tubérculo) olfatório, fossa lateral e lobo piriforme (Lindemann *et al.*, 2003).

Devido a essa grande capacidade de discriminação olfativa, mesmo com a limpeza dos acrílicos onde eram apresentados os estímulos, o sujeito Frodo conseguiu discriminar o cheiro deixado nos acrílicos e teve o desempenho acima do acaso em todas as fases de teste, inclusive no par impossível.

Os sujeitos Pippin, Ayra, e Sam também mostraram um forte reconhecimento de cheiros ao realizar com sucesso as fases relatadas acima: protocolo B e protocolo C. Aparentemente, os animais dão mais importância aos estímulos olfativos do que aos visuais cromáticos. O gambá apresenta um pequeno globo ocular e nervos ópticos proporcionalmente muito finos, revelando não ser um animal de essência visual (Lindemann *et al.*, 2003).

Ao realizar os testes, o macho Sam, que conseguiu realizar com sucesso os pares de fácil discriminação e não conseguiu o mesmo desempenho nas demais fases (par difícil e impossível), era o que fazia a escolha das janelas de forma singular. Sam olhava freqüentemente para os dois lados. A escolha era feita com uma maior distância da janela, quando comparada com a dos outros sujeitos.

O macho Frodo, que teve seu desempenho acima da aleatoriedade, por outro lado, fazia a escolha bem próximo às janelas, cheirando-as.

Para evitar esse tipo de pista, é importante a construção de um labirinto que impeça o contato dos sujeitos com os estímulos, ou com os envelopes que os contenham. Uma alternativa seria manter fixo o acrílico protetor em ambas as janelas, alternando-se apenas os papéis de Munsell.

5.6 - Comparação dos resultados com outros estudos de visão de cores em marsupiais

A afirmação que o marsupial *Didelphis albiventris* é dicromata foi reforçada pelo desempenho de um sujeito (S) desta espécie que teve desempenho nos testes comportamentais acima da aleatoriedade nos pares de fácil discriminação para um dicromata e na faixa da aleatoriedade nos pares de discriminação difícil. O fato de que este animal não tenha discriminado o par impossível assegura que a discriminação não foi fundamentada em pistas olfativas.

De acordo com os estudos eletroretinográficos de Jacobs, não publicados integralmente, mas relatados em sua revisão (Jacobs, 1993), no *Didelphis virginiana* foi detectado apenas um tipo de cone com pico espectral de 560nm. Essa técnica é bastante sensível, mas a ausência de evidência de uma segunda classe de pigmento deve ser vista com cuidado (Jacobs, 1993).

Contudo, pela própria natureza metodológica, não se podem comparar os resultados encontrados neste trabalho com os obtidos por métodos não-comportamentais: microespectrofotometria, genética molecular e eletroretinografia. Essas pesquisas auxiliam na obtenção de dados referentes à presença de determinados fotopigmentos, mas com essas informações não se pode afirmar com certeza o tipo de visão de cores dos sujeitos analisados, tendo em vista que o processamento visual envolve outras regiões fora da retina. A percepção de cores no ambiente natural envolve processamentos ativos conduzidos pelo sistema nervoso de forma geral (Zeki, 1993). Testes comportamentais, portanto, são decisivos para se afirmar se uma espécie se comporta como dicromata ou tricromata (Jacobs, 1993; Kelber et al., 2003).

A conclusão desta pesquisa está de acordo com a publicada por Hemmi (1999), que realizou testes comportamentais com a espécie *Macropus eugenii*. Hemmi pareou dois estímulos luminosos monocromáticos com variação de intensidade e treinou os sujeitos a escolherem o de maior comprimento de ondas. Após esta fase, os sujeitos já modelados responderam a novos estímulos monocromáticos coloridos que eram intercalados por um par

no qual se substituía uma das luzes coloridas pela luz branca. Para um dicromata, a luz branca tem aparência subjetiva de uma luz monocromática de um comprimento de onda particular (Neumeyer, 1991). Sabendo-se disso, foi possível determinar o ponto neutro, encontrado exclusivamente em dicromatas, ponto no qual o sujeito posiciona a luz branca no eixo dos comprimentos de onda.

Por outro lado, o resultado do nosso trabalho diverge do realizado por Friedman (1967), com o gambá *Didelphis virginiana*. Friedman concluiu que essa espécie, do mesmo gênero utilizado no presente estudo, era tricromata. Essa divergência pode ser atribuída a uma diferença interespecífica. Porém, fatores metodológicos podem ter contribuído para um resultado equivocado. Friedman avaliou o desempenho do gambá na tarefa discriminatória entre as luzes azul, vermelha, amarela e verde cujos brilhos foram equalizados com o brilho do azul, segundo os parâmetros do olho humano. Não houve o controle baseado na visão do sujeito experimental. A partir disso, não se pode garantir que o animal não tenha percebido diferença de intensidade entre uma luz e outra. Apesar do pesquisador ter eliminado as pistas olfativas, posicionando reforço em ambos os lados e isolando os filtros de luz do contato direto com o gambá, o sujeito pode ter se guiado por pistas de brilho. Além disso, não foi realizado nenhum teste impossível para corroborar a hipótese proposta.

Nosso resultado também difere do realizado com marsupiais *Sminthopsis crassicaudata*, no qual o animal já modelado deveria escolher entre a luz colorida (do treino) e uma mistura aditiva de luzes coloridas (comprimentos de onda primários) com intensidades variadas (Arrese *et al.*, 2006). Arrese e colaboradores encontraram evidências de três tipos de cones, sendo um com pico de absorção na faixa UV. Os pesquisadores não relataram se houve controle de pistas olfativas, mas realizaram teste impossível no qual o acerto dos sujeitos caiu para 50% nessa tarefa.

Essa diferença entre nossos resultados, dicromatismo na espécie *Didelphis albiventris*, e os apresentados para a espécie *Sminthopsis crassicaudata* (Arrese *et al.*, 2006) pode ser

atribuída ao fato de fazerem parte de ordens distintas, Didelphimorphia e Dasyuromorphia respectivamente, apresentando características particulares em relação a percepção de cores.

6. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados nos testes comportamentais de discriminação visual sugerem que a espécie *Didelphis albiventris* se comporta como dicromata.

Ao analisar os desempenhos nas tarefas discriminativas constatou-se forte tendência dos sujeitos da espécie *Didelphis albiventris* a se guiarem por pistas olfativas.

É possível utilizar papéis de Munsell para diagnosticar o tipo de visão de cores em marsupiais da espécie *Didelphis albiventris*.

Estudos comportamentais subseqüentes com um maior número de indivíduos irão determinar se a dicromacia é o sistema geral da visão de cores dos marsupiais *Didelphis albiventris*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahnelt, P., Hokoç, J.N. & Röhlich, P. (1995). Photoreceptors in a primitive mammal, the South American opossum, *Didelphis marsupialis aurita*: Characterization with anti-opsin immunolabeling. *Visual Neuroscience*, 12: 793-804.
- Araújo JR, A.C., Didonet, J.J., Araújo, C.S., Saletti, P.G., Borges, T.R.J. & Pessoa, V.F. (2008). Color vision in the black howler monkey (*Alouatta caraya*), *Visual Neuroscience*, 25: 243-248.
- Arrese, C. A., Beazley, L. D. & Neumeyer, C. (2006). Behavioral evidence for marsupial trichromacy, *Current Biology*, 16: 193-194.
- Arrese, C.A., Hart N. S., Thomas, N., Beazley L.D. & Shand J. (2002) Trichromacy in Australian marsupials. *Current Biology*, 12: 657-660.
- Arrese, C. A., Oddy, A. Y., Runham P. B., Hart N. S., Shand J., Hunt D. M. & Beazley, L. D. (2005). Cone Topography and spectral sensitivity in two potentially trichromatic marsupials, the quokka (*Setonix brachyurus*) and quenda (*Isoodon obesulus*). *Proceedings of Biological Sciences* 272: 791-796.
- Boissinot, S., Tan, Y., Shyne, S.K., Schneider, H., Sampaio, I., Neiswanger, K., Hewett-Emmett, D. & Li, W.H. (1998) Origins and antiquity of X-linked triallelic color vision systems in New World monkeys. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 13749-13754.

- Bowmaker, J.K., Astell, S., Hunt, D.M. & Mollon, J.D. (1991) Photosensitive and photostable pigments in the retinæ of Old World monkeys. *The Journal of Experimental Biology*, 156: 1-19.
- Chang, B.S., Crandall, K. A., Carulii, J.P. & Hartl, D.L. (1995). Opsin phylogeny and evolution: a model for blue shifts in wavelength regulation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 4: 33-43.
- Cunha, D. C. F. A., Hokoç, J. M., Dantas, A. M. Moraes, A. M. M. (2006). Estudo eletrorretinográfico de visão cromática. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 69: 857-863.
- Deeb, S. S., Wakefield M. J., Tada T., Marotte L. Yokoyama S., Marshall Graves J. A. (2003). The cone visual pigments of an Australian marsupial, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*): sequence, spectral tuning, and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 10: 1642-1649.
- Dulai, K.S., Bowmaker, J.K., Mollon, J.K. & Hunt, D.M. (1994) Sequence divergence, polymorphism and evolution of the middle-wave and long-wave pigment genes of Great Apes and Old World monkeys. *Vision Research*, 34: 2483-2492.
- Emmerton, J., Delius, J.D. (1980). Wavelength discrimination in the “visible” and ultraviolet spectrum by pigeons. *Journal of Comparative Physiology A*, 141: 47-52.
- Friedman, H. (1967). Colour Vision in the Virginia opossum. *Nature*, 213; 835-836.

- Gellerman, L.W. (1933) Chance orders of alternating stimuli in visual discrimination experiments. *Journal of Genetic Psychology.*, 42: 206-208.
- Gomes, U.R., Pessoa, D.M.A., Tomaz, C. & Pessoa, V.F. (2002). Color vision perception in the capuchin monkey *Cebus apella*: a re-evaluation of procedures using Munsell papers. *Behavioural Brain Research*, 129: 153-157.
- Hemmi, J.M. (1999). Dichromatic colour vision in an Australian marsupial, the tammar wallaby. *Journal of Comparative Physiology A*, 185: 509-505.
- Hisatomi, O., Kayada, S., Aki, Y., Iwasa, T. & Tokunaga, F. (1994). Phylogenetic relationships among vertebrate visual pigments. *Vision Research*, 34: 3097-3102.
- Hunt, D.M., Chan, J., Carvalho, L.S., Hokoç, J.N., Ferguson, M.C., Arrese, C.A., Beazley, L.D. (2009). Cone visual pigments in two species of South American marsupials. *Gene*, 433: 50-55.
- Hokoç, J.N., Lima, S.M.A. Moraes, A. M.M. & Ahnelt, P.A. (2006). Visão em Marsupiais: Características e evolução em Cáceres, N.C. & Monteiro Filho, E. L. (org) Os Marsupiais do Brasil – Biologia, Ecologia e Evolução. UFMS. Campo Grande, MS.
- Jacobs, G.H. (1993). The distribution and nature of colour vision among the mammals. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 68: 413-471.

- Jacobs, G.H., Fenwick, J.C., Calderone, J.B. & Deeb, S.S. (1999). Human cone pigment expressed in transgenic mice yields altered vision. *The Journal of Neuroscience*, 19: 3258-3265.
- Jacobs, G.H., Rowe, M.P. (2004). Evolution of vertebrate colour vision. *Clinical and Experimental Optometry*, 87: 206-216.
- Johnson, R.L., Grant, K.B., Zankel, T.C., Boehm, M.F., Merbs, S.L., Nathans, J. & Nakanishi, K. (1993). Cloning and expression of goldfish opsin sequences. *Biochemistry*, 32: 208-214.
- Kelber, A., Vorobyev, M., Osorio, D. (2003). Animal colour vision – behavioral tests and physiological concepts. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 78: 81-118.
- Kolb, H. & Wang, H.H. (1985). The distribution of photoreceptors, dopaminergic amacrine cells and ganglion cells in the retina of the North American Opossum (*Didelphis virginiana*). *Vision Research*, 25: 1207-1221.
- Lennie P. & D'Zmura, M. (1988). Mechanisms of color vision. *Critical Reviews in Neurobiology*, 3: 333-400
- Lindemann, T., Campos, R. (2003). Systematization, distribution, and territory of the middle cerebral artery on the surface of the brain in *Didelphis albiventris* (opossum). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 40: 349-358.

Munsell Book of Color. (1966) *Munsell Color Company, Inc.* Baltimore, Maryland, USA.

Neumeyer, C. (1991). Evolution of colour vision. In: Cronly-Dillon, J.K., Gregory, R.L., Evolution of the eye and visual system, MacMillan Press, Basingstoke, 284-305.

Newhall, S.M. (1940) Preliminary report of the OSA subcommittee on the spacing of the Munsell colors. *Journal of Optical Society of America*, 10: 617-645.

Nowak, R.M. (1991). Walker's mammals of the world. 5th ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press. Vol. I.

Okano, T., Kojima, D., Fukada, Y., Shichida, Y. E & 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*, 89: 5932-5936.

Oswaldo-Cruz, E., Hokoç, J.N. & Sousa, A.P.B. (1979). A schematic eye for the opossum. *Vision Research*, 19: 263-278.

Paula Couto, C. (1953). *Paleontologia Brasileira (Mamíferos)*, Ministério da Educação e Saúde, Instituto Nacional do Livro, Rio de Janeiro, vol. XVI, 516pp.

Pessoa, D.M.A., Araujo, M.F.P., Tomaz, C., Pessoa, V.F. (2003). Colour discrimination learning in black-handed tamarin (*Saguinus midas niger*). *Primates*, 44: 413-418.

- Pessoa, D.M.A., Cunha, J. F., Tomaz, C.A.B., Pessoa, V.F. (2005). Colour discrimination in the black-tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*): ecological implications. *Folia Primatologica*, 76: 125-134.
- Pessoa, V.F., Tavares, M.C.H., Aguiar, L., Gomes, U.R. & Tomaz, C. (1997). Color vision discrimination in the capuchin monkey *Cebus apella*: evidence for trichromaticity. *Behavioral Brain Research*, 89:285-288.
- Prado, C.C., Pessoa, D.M.A., Sousa, F.L.L. & Pessoa, V.F. (2008). Behavioural Evidence of sex-linked colour vision polymorphism in the squirrel monkey *Saimiri ustus*. *Folia Primatologica*, 79: 172-184.
- Savage, A., Dronzek, L.A. & Snowdon, C.T. (1987) Color discrimination by the cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus oedipus*) and its relation to fruit coloration. *Folia Primatologica*, 49: 57-69.
- Sharpe, L.T., Stockman, A., Jagle, H. & Nathans, J. (1999) Opsin genes, cone photopigments, color vision and color blindness. In: COLOR VISION. From Genes to Perception. Karl R Gegenfurtner & Lindsay T Sharpe eds., pp: 3-51, Cambridge University Press, UK.
- Silveira, L.C.L., Picanço-Diniz, C.W. & Oswaldo-Cruz, E. (1982). Contrast sensitivity function and visual acuity of the opossum. *Vision Research*, 22: 1371-1377.

Simpson, G.G. (1945). The principles classification and a classification of mammals.

Bulletin of the American Museum of Natural History, 85: 1-350.

Strachan, J., Chang, L. Y., Wakefield, M. J., Graves, J. A. & Deeb, S. S. (2004). Cone

visual pigments of the stripe-faced and fat-tailed dunnarts: Sequence and inferred spectral properties. *Visual Neuroscience*, 21: 223-229.

Sumner, P., Arrese, C. A. & Partridge J. C. (2005). The ecology of visual pigment tuning

in an Australian marsupial: the honey possum *Tarsipes rostratus*. *The Journal of Experimental Biology*, 208: 1803-1815.

Zeki, S. (1993) The physiology of the colour pathways. In: A vision of the brain, Blackwell

Scientific Publications, pp 256-263. Oxford, UK

8. ANEXOS

8.1 – Anexo 1 : Licença do IBAMA para captura dos animais.

8.2 – Anexo 2: Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética.

8.3 – Anexo 3: Artigo científico formatado segundo especificações da revista Neurobiologia (Recife).

Percepção de cores no gambá (*Didelphis albiventris*)

Color vision in the white-eared opossum (*Didelphis albiventris*)

Beatriz Medina Pegoraro¹, Eduardo de Almeida Gutierrez², Valdir Filgueiras Pessoa³

1 – Estudante de Mestrado da Universidade de Brasília (UnB)

2 – Estudante de iniciação científica da Universidade de Brasília (UnB)

3 – Professor da Universidade de Brasília (UnB)

Número de páginas: 11

RESUMO

A visão de cores em marsupiais é um tema controverso, especialmente dentro da ordem Didelphimorphia (gambás). Enquanto o diagnóstico da visão desses animais em testes comportamentais foi o tricromatismo e nos estudos eletrofisiológicos, o monocromatismo, recentemente, em estudos de genética molecular, encontraram apenas duas classes de opsinas nos dois maiores gêneros dessa ordem. O presente estudo avaliou a habilidade discriminativa de gambás (*Didelphis albiventris*) através de testes comportamentais. Os animais realizaram as tarefas em um labirinto de dupla escolha em forma de Y com uma câmara de partida. Os estímulos utilizados foram papéis de Munsell de diferentes matizes. Para assegurar a escolha baseada na cor, os papéis foram apresentados com variação aleatória de brilho. Um macho obteve desempenho significativo nos testes com pares de fácil discriminação para um dicromata, mas seu desempenho caiu para a faixa da aleatoriedade no par de difícil discriminação. Esses resultados sugerem que a espécie *Didelphis albiventris* é dicromata.

Unitermos: visão de cores, marsupial, comportamento, gambá

ABSTRACT

Color vision in marsupials is a controversial subject, especially among the Order Didelphimorphia (American opossums). While behavioral tests have diagnosed these animals as trichromatic and electrophysiological studies as monochromatic, recently molecular genetic studies have found only two classes of cone opsin in two major genera of the order. This study examined the color discrimination abilities of opossums (*Didelphis albiventris*) through a series of tasks involving a behavioral paradigm of discrimination learning. The animals were tested in a Y-shaped maze, consisting of a start chamber and a decision area with a double choice panel. Stimuli consisting of pairs of Munsell color cards were presented in random brightness values to assure that discriminations were based on color rather than brightness cues. One male succeeded on discriminating the stimuli pairs considered easy for a dichromatic individual, but failed in the attempt to discriminate those expected to be easy only for a trichromatic. These results suggest that *Didelphis albiventris* is dichromatic.

Key words: colour vision, marsupial, behavior, opossum

INTRODUÇÃO

Ao fazermos uma revisão na literatura existente sobre estudos feitos com o gambá do cerrado (*Didelphis albiventris*), no que concerne à forma de detectar a luz visível refletida e como transformá-la em imagens cromáticas do seu meio ambiente externo, verifica-se uma

escassez de trabalhos que possam esclarecer tal fenômeno. Mesmo para o gambá da Mata Atlântica (*Didelphis marsupialis aurita*) e para o opossum (*Didelphis virginiana*), os poucos dados publicados apresentam algumas contradições que impedem uma clara compreensão sobre a visão cromática destes animais.

Assim, há informações contraditórias sobre visão de cores em marsupiais, onde estudos genéticos afirmam a dicromacia¹, e estudos de microespectrofotometria, tricromacia². No caso dos estudos com base comportamental, há também conflitos na dimensionalidade da visão de cores encontrada, embora todos estas investigações tenham utilizado estímulos luminosos³ (luz emitida e não refletida).

Apesar da genética molecular e da eletroretinografia propiciarem uma maior precisão na identificação dos diferentes tipos de cones existentes nas retinas dos primatas estudados, estes métodos não respondem a todas as perguntas⁴. Jacobs (1993) afirma que estudos que investiguem a percepção de cores precisam contar com uma avaliação comportamental adequada, com rigoroso controle de brilho. A abordagem comportamental, quando bem conduzida, pode apresentar grande relevância, uma vez que a percepção de cores no ambiente natural reflete um processo mais complexo do que a atividade de cones⁵ e envolve processamentos ativos conduzidos pelo sistema nervoso de forma geral⁶. A importância da abordagem comportamental também se revela nos experimentos de Jacobs e colaboradores (1999) onde camundongos transgênicos diagnosticados como tricromatas através da genética molecular e eletroretinografia, comportam-se como dicromatas quando submetidos a testes de discriminação visual.

Reconhecendo que a compreensão do fenômeno da visão cromática depende somente de evidências diretas obtíveis através de estudos comportamentais corretamente conduzidos⁴, o presente projeto pretende contribuir para o conhecimento dos mecanismos perceptuais da visão cromática deste importante grupo de mamíferos primitivos, que foram os protagonistas de um passo decisivo na gênese de novas espécies mamíferas.

METODOLOGIA

Sujeitos

O gambá *Didelphis albiventris*, espécie endêmica no Cerrado da região Centro-Oeste brasileira, foi utilizado nestes experimentos.

Assim, 1 filhote macho foi capturado com a devida autorização do IBAMA. Foi mantido em gaiola individual (com 90 cm de largura, 90 cm de profundidade e 50 cm de altura, feitas de madeira e com porta com grade de ferro) localizada no Laboratório de Neurociências e do Comportamento da Universidade de Brasília. A gaiolas era forrada com

folhas de jornais e cobertas com feno, possuía em seu interior um tronco de árvore para o animal escalar. A dieta consistiu no fornecimento diário de ração peletizada para cães em crescimento, frutas ou ovos cozidos e água *ad libitum*. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética.

Aparato

Neste estudo foi utilizado um aparato de dupla escolha para discriminação visual, construído em madeira compensada e revestida em fórmica de cor cinza neutro. Este aparato consiste numa câmara de partida que, pela remoção de uma partição opaca e móvel, permite ao animal acesso à câmara de dupla-escolha, em cuja extremidade oposta encontram-se duas peças basculantes (janelas) de acrílico. Cada uma das janelas foi construída de forma a permitir a colocação e retirada dos envelopes contendo as folhas de Munsell. As janelas permitem a visualização dos papéis por parte do sujeito, que deve empurrá-las de forma a ter acesso ao reforço. A janela contendo o estímulo negativo permanece fechada.

A iluminação foi fornecida por lâmpada fluorescente modelo D-65 de 20 watts, suspensa por cima do aparato, a aproximadamente 1m. Para produzir um iluminante que se assemelhasse às condições do meio ambiente natural no período de maior atividade do animal, camadas de papéis vegetais foram interpostas entre a luz e o suporte dos bulbos. A mensuração foi realizada dentro do aparato, por um luxímetro e resultou em 119 lux.

Estímulos

Como estímulos foram utilizados papéis de Munsell (cartões de 12,5 por 7,5). O sistema de Munsell ^{7,8} possui uma notação onde a cor é especificada pela sua matiz (um número e a letra inicial da cor correspondente) e níveis de brilho sobre saturação (por exemplo, 2.5YR 4/14 é a notação correspondente a um “yellow-red” ou laranja 2.5, com brilho 4 e saturação 14). Os papéis de Munsell têm sido utilizados em vários experimentos de discriminação de cores em crianças e em primatas não-humanos, representando um método confiável e muito indicado em estudos comportamentais^{9,10,11}. Foram utilizados como base para este estudo pares de papéis de Munsell selecionados em testes previamente realizados com humanos. Nestes testes, seis indivíduos daltônicos (dois protans e quatro deutans) estabeleceram uma seqüência de papéis de Munsell que, para eles, eram muito semelhantes. Este procedimento permitiu a escolha de dez pares de estímulos que estavam em pontos de difícil discriminação para daltônicos.

Assim, o SD+ foi fixado e pareado com diferentes matizes, permanecendo a variação aleatória de brilho, formando pares de fácil ou de difícil discriminação. Foram montados

então três blocos de testes, correspondentes aos pares encontrados nos testes com os humanos
9.

Cada papel foi mantido permanentemente dentro de um envelope de acrílico transparente (3 mm de espessura) como forma de protegê-los da manipulação direta por parte dos animais, evitando assim que fossem danificados.

PROCEDIMENTOS

Adaptação

A adaptação foi necessária para que a presença humana não causasse estresse ao animal, prejudicando o seu desempenho nos testes comportamentais. Nesta fase, cada filhote teve o manuseio de, no mínimo, dez minutos diários. O período de adaptação abrangeu os primeiros 6 meses de vida dos animais. No final destas sessões de domesticação, os animais recebiam sua ração alimentar

Modelagem 1

Foram realizadas sessões diárias com objetivo de estimular o animal a explorar o aparato. Após a abertura da porta de partição foram utilizadas iscas (pedaços de frutas e ração para cachorro) a distâncias cada vez mais próximas do painel de discriminação. Na progressão desta modelagem, os animais foram treinados a abrir, aleatoriamente, as janelas de ambos os lados (direita/esquerda), evitando-se com isto a formação de comportamentos de preferência. Ambas as janelas possuíam o reforço. Em cada janela foi colocado um papel de cor laranja (10 YR), de brilho variado, para que já associasse o laranja ao estímulo positivo. Esta condição foi melhor trabalhada na modelagem 2. O critério para esta tarefa ser considerada como finalizada com sucesso foi um tempo de latência máximo de dez segundos, contados a partir da saída do animal até a abertura da janela contendo a recompensa.

Modelagem 2

Depois de se retirar o animal de sua gaiola, este era colocado na câmara de partida do aparato. Eram realizadas sessões de aproximadamente uma hora. Dois estímulos eram pareados, o estímulo positivo foi o papel laranja (10YR), o estímulo negativo, a cartolina preta. Nesta fase não houve variação do brilho do estímulo negativo. Era colocada uma porção de 1g de ovo cozido atrás de cada janela, eliminando a escolha pela pista olfativa. Após a abertura da câmara de partida, o animal deveria dirigir-se à outra extremidade do aparato e tocar o focinho onde está inserido o cartão laranja, abrindo a janela e recebendo a recompensa. A janela com o estímulo negativo era mantida fechada. Caso o gambá escolhesse

a janela com estímulo negativo, ele era reconduzido para a câmara de partida e, após dez segundos, dava-se início a uma nova tentativa.. Eram realizadas em média trinta tentativas. Cada vez que o gambá escolhia a janela com o estímulo positivo era considerado acerto e a escolha da outra janela, erro. Para o animal passar desta fase de modelagem, foi necessário alcançar o número de acertos acima da aleatoriedade em cinco sessões consecutivas, considerando-se o número total de 30 tentativas em cada sessão.

Testes comportamentais

O animal já modelado fez escolhas entre as duas janelas com o estímulo positivo ou negativo. A apresentação dos estímulos entre as posições direita e esquerda seguiu a tabela de Gellerman¹⁶ para números aleatórios, para evitar que os animais utilizassem o lado de apresentação dos estímulos como uma pista na realização dos testes. Percentuais de acertos em cada sessão foram calculados. O teste binomial foi utilizado para construir os limites de confiança de 95% sobre o desempenho aleatório, baseado no número de tentativas do teste¹¹. O teste para cada par foi realizado em duas sessões com 32 tentativas cada totalizando 64 tentativas. O limite superior de aleatoriedade foi calculado em 62,25% e o inferior em 37,75%.

Não houve repetição do mesmo par no caso de erros. Todos os pares seguiram o mesmo protocolo. Após cada tentativa osacrílicos utilizados que continham os estímulos eram limpos com o mesmo pano úmido para homogeneizar os odores deixados pelo animal após o contato com o envelope. Foram utilizados 4 pares de discriminação.

1º par fácil

SD+ 10YR com brilho variado (5/10, 6/10, 7/10 e 8/10)

SD- 7.5B com brilho variado (5/4, 6/4, 7/4 e 8/4).

Par difícil

SD+ 10YR com brilho variado (5/10, 6/10, 7/10 e 8/10)

SD- 5GY com brilho variado (5/10, 6/10, 7/10 e 8/10).

2º Par fácil

SD+ 10YR com brilho variado (5/10, 6/10, 7/10 e 8/10).

SD- 7.5B com brilho variado (4/6, 5/6, 6/6 e 7/6).

Par impossível

SD+ 10YR 5/10

SD- 10YR 5/10

Neste último caso houve marcação atrás de um dos papéis para a identificação do estímulo positivo.

RESULTADOS

O gambá Sam ficou adaptado à presença humana com aproximadamente seis meses de vida. O contato com o sujeito foi realizado durante o período de maior atividade do animal: após às 17h.

Durante a modelagem 1, o sujeito explorou o aparato de forma dinâmica e intensa e facilmente respondeu à procura de alimento.

Durante a modelagem 2, o sujeito conseguiu manter-se acima da aleatoriedade em cinco sessões consecutivas. Realizou 81 sessões com uma média de 31,4 tentativas cada. Ficou com o desempenho estável acima da aleatoriedade a partir da 70ª sessão.

Após esta fase foi considerado apto a realizar os testes comportamentais.

O macho manteve o número de acertos acima da aleatoriedade nos pares de fácil discriminação para dicromatas (10YR X 5B e 10 YR X 7.5B), porém, seu rendimento caiu para níveis aleatórios no par de difícil discriminação (10YR X 7.5GY) e no impossível (10YR 5/10 X 10YR 5/10) (**tabela 1, gráfico 1**).

DISCUSSÃO

A afirmação que o marsupial *Didelphis albiventris* é dicromata foi comprovada pelo desempenho do um sujeito (Sam) desta espécie que teve desempenho nos testes comportamentais acima da aleatoriedade nos pares de fácil discriminação para um dicromata e na faixa da aleatoriedade nos pares difícil e impossível.

De acordo com os estudos eletroretinográficos de Jacobs, não publicados integralmente, mas relatados em sua revisão⁴, no *Didelphis virginiana* foi detectado apenas um tipo de cone com pico espectral de 560nm. Essa técnica é bastante sensível, mas a ausência de evidência de uma segunda classe de pigmento deve ser vista com cuidado⁴.

Contudo, pela própria natureza metodológica, não se pode comparar os resultados encontrados neste trabalho com os obtidos por métodos não-comportamentais: microespectrofotometria, genética molecular e eletroretinografia. Essas pesquisas auxiliam na obtenção de dados referentes à presença de determinados fotopigmentos, mas com essas informações não se pode afirmar com certeza o tipo de visão de cores dos sujeitos analisados

tendo em vista que o processamento visual envolve outras regiões fora da retina. A percepção de cores no ambiente natural envolve processamentos ativos conduzidos pelo sistema nervoso de forma geral⁶. Testes comportamentais, portanto, são decisivos para se afirmar se uma espécie se comporta como dicromata ou tricromata^{4,12}.

A conclusão desta pesquisa está de acordo com a publicada por Hemmi (1999), que realizou testes comportamentais com a espécie *Macropus eugenii*. Hemmi¹³ pareou dois estímulos luminosos monocromáticos com variação de intensidade e treinou os sujeitos a escolherem o de maior comprimento de ondas. Após esta fase, os sujeitos já modelados, responderam a novos estímulos monocromáticos coloridos que eram intercalados por um par no qual se substituíam uma das luzes coloridas pela luz branca. Para um dicromata, a luz branca tem aparência subjetiva de uma luz monocromática de um comprimento de onda particular¹⁴. Sabendo-se disso, foi possível determinar o ponto neutro, encontrado exclusivamente em dicromatas, ponto no qual o sujeito posiciona a luz branca no eixo dos comprimentos de onda.

Por outro lado, o resultado do nosso trabalho diverge do realizado por Friedman (1967) com o gambá *Didelphis virginiana*. Friedman³ concluiu que essa espécie, do mesmo gênero utilizado no presente estudo, era tricromata. Essa divergência pode ser atribuída a uma diferença interespecífica. Porém, fatores metodológicos podem ter contribuído para um resultado equivocado. Friedman avaliou o desempenho do gambá na tarefa discriminatória entre as luzes azul, vermelha, amarela e verde cujos brilhos foram equalizados com o brilho do azul segundo os parâmetros do olho humano. Não houve o controle baseado na visão do sujeito experimental. A partir disso, não se pode garantir que o animal não tenha percebido diferença de intensidade entre uma luz e outra. Apesar do pesquisador ter eliminado as pistas olfativas, posicionando reforço em ambos os lados e isolando os filtros de luz do contato direto com o gambá, o sujeito pode ter se guiado por pistas de brilho. Além disso, não foi realizado nenhum teste impossível para corroborar a hipótese proposta.

Nosso resultado também difere do realizado com marsupiais *Sminthopsis crassicaudata*, no qual o animal já modelado deveria escolher entre a luz colorida (do treino) e uma mistura aditiva de luzes coloridas (comprimentos de onda primários) com intensidades variadas¹⁵. Arrese e colaboradores¹⁵ encontraram evidências de três tipos de cones, sendo um com pico de absorção na faixa UV. Os pesquisadores não relataram se houve controle de pistas olfativas, mas realizaram teste impossível no qual o acerto dos sujeitos caiu para 50% nessa tarefa.

Essa diferença entre nossos resultados, dicromatismo na espécie *Didelphis albiventris*, e os apresentados para a espécie *Sminthopsis crassicaudata*¹⁵ pode ser atribuída ao fato de

fazerem parte de ordens distintas, Didelphimorphia e Dasyuromorphia respectivamente, apresentando características particulares em relação a percepção de cores.

CONCLUSÕES

Os resultados encontrados nos testes comportamentais de discriminação visual sugerem que a espécie *Didelphis albiventris* se comporta como dicromata.

É possível utilizar papéis de Munsell para diagnosticar o tipo de visão de cores em marsupiais da espécie *Didelphis albiventris*.

Estudos comportamentais subseqüentes com um maior número de indivíduos irão determinar se a dicromacia é o sistema geral da visão de cores dos marsupiais *Didelphis albiventris*.

REFERÊNCIAS

1. Hunt DM, Chan J, Carvalho LS, Hokoç JN, Ferguson MC, Arrese CA, Beazley LD. Cone visual pigments in two species of South American marsupials. *Gene* 2009; 433:50-5.
2. Cunha DCFA, Hokoç JM, Dantas AM, Moraes AMM. Electroretinographic study of chromatic vision. *Arq Bras Oftalmol* 2006; 69:857-63.
3. Friedman H. Colour Vision in the Virginia Opossum. *Nature* 1967; 213:835-6.
4. Jacobs GH. The distribution and nature of colour vision among the mammals. *Biol Rev* 1993; 12:413-71.
5. Sharpe LT, Stockman A, Jagle H, Nathans J. Opsin genes, cone photopigments, color vision and color blindness In: Gegenfurtner KR, Sharpe LT editors. *Color Vision. From Genes to Perception*. UK: Cambridge University Press: 1999, p. 3-51.
6. Zeki S. The physiology of the colour pathways. In: *A vision of the brain*, Blackwell Scientific Publications, UK: Oxford: 1993, p. 256-63.
7. Munsell Book of Color. Baltimore (MD): Munsell Color Company Inc: 1966.
8. Newhall SM. Preliminary report of the OSA subcommittee on the spacing of the Munsell colors. *J. Op. Soc. Am* 1940; 10:617-45.
9. Gomes UR, Pessoa DMA, Tomaz C, Pessoa VF. Color vision perception in the capuchin monkey *Cebus apella*: a re-evaluation of procedures using Munsell papers. *Behav. Brain Res* 2002; 129:153-7.

10. Pessoa VF, Tavares MCH, Aguiar L, Gomes UR, Tomaz C. Color vision discrimination in the capuchin monkey *Cebus apella*: evidence for trichromaticity. *Behav Brain Res* 1997; 89:285-8.
11. Savage A, Dronzek LA, Snowdon CT. Color discrimination by the cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus oedipus*) and its relation to fruit coloration. *Folia Primatol* 1987; 49:57-69.
12. Kelber A, Vorobyev M, Osorio D. Animal colour vision – behavioral tests and physiological concepts. *Biol Rev* 2003; 78:81-118.
13. Hemmi JM. Dichromatic colour vision in an Australian marsupial, the tammar wallaby. *J. Comp. Physiol* 1999; 185:505-9.
14. Neumeyer C. Evolution of colour vision. In: Cronly-Dillon JK., Gregory RL, editors *Evolution of the eye and visual system*. Basingstoke: MacMillan Press: 1991, p. 284-305.
15. Arrese CA, Beazley LD, Neumeyer C. Behavioural evidence for marsupial trichromacy, *Current Biology* 2006; 16:193-4.
16. Gellerman LW. Chance orders of alternating stimuli in visual discrimination experiments. *J Genetic Psychol* 1933; 42:206-8.

ANEXO 1

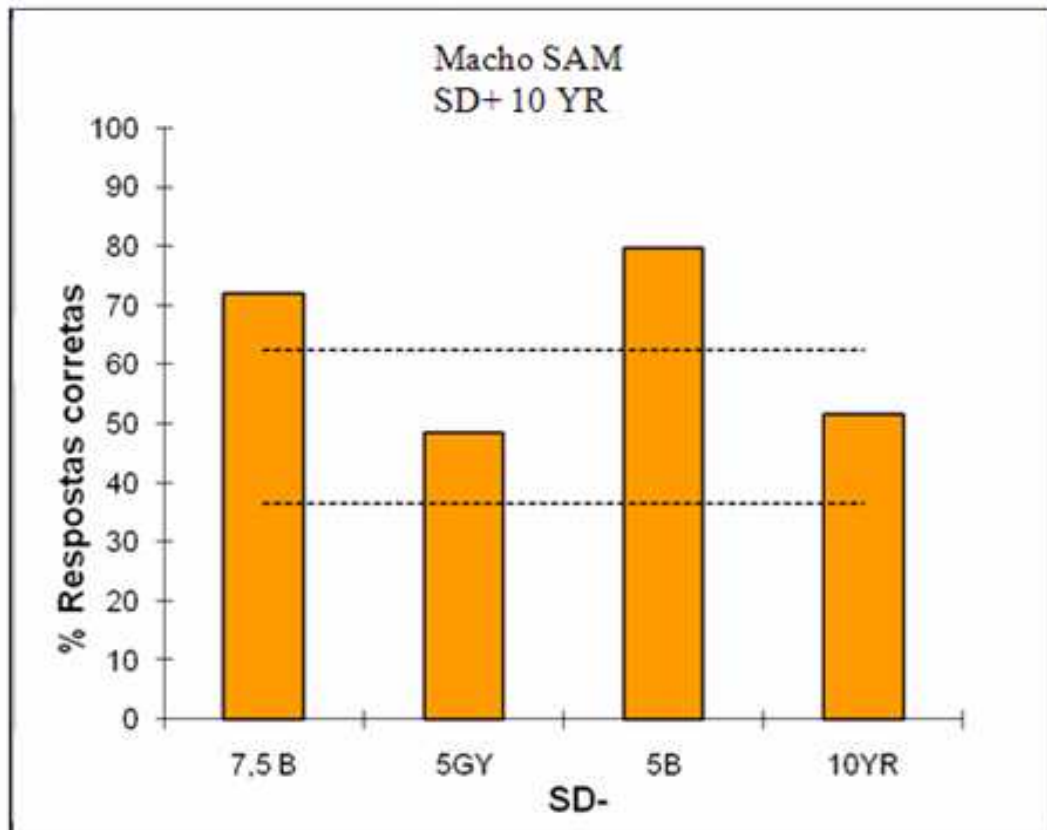


Gráfico 1. Gráfico representativo do desempenho do macho Sam nos testes comportamentais. As linhas tracejadas representam os limites inferior e superior de aleatoriedade.

ANEXO 2

TABELA 1
DESEMPENHO DO SUJEITO (*Didelphis albiventris*) EM TESTE DE
DISCRIMINAÇÃO VISUAL

TAREFA	Nº de acertos	Percentual de acertos
10 YR Vs. 7.5B (par fácil)	46	71,87%
10YR Vs. GY (par difícil)	31	48,43%
10YR Vs. 5B (par fácil)	51	79,68%
10YR Vs. 10YR (par impossível)	33	51,56%