



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós Graduação em Biologia Animal

**Contraste Simultâneo e Constância de Brilhos em Gambás (*Didelphis albiventris*).**

Liane Cristina Ferez Garcia Carpi

Orientador: Valdir Filgueiras Pessoa  
Co-orientador: Bráulio Magalhães-Castro

Brasília, 2008.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós Graduação em Biologia Animal

**Contraste Simultâneo e Constância de Brilhos em Gambás (*Didelphis albiventris*).**

Liane Cristina Ferez Garcia Carpi

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Valdir Filgueiras Pessoa

Co-orientador: Bráulio Magalhães-Castro

Brasília, 2008.



Dedico esse trabalho

*A todos aqueles que são fundamentais para a realização de qualquer estudo comportamental, que trazem no olhar a pureza e que entregam, literalmente, a vida em nossas mãos. A eles, que não possuem maldade, que não se negam aos nossos pedidos, que não abandonam a vontade de viver... aos seres que Deus criou para trazerem equilíbrio ao homem...*

*Aos animais.*



## AGRADECIMENTOS

Muitas são as pessoas que contribuíram, cada uma à sua maneira, para que esse trabalho fosse realizado. Assim sendo, agradeço intensa e primeiramente a Deus, por ter colocado cada uma delas em meu caminho.

Ao programa de pós graduação em biologia animal da Universidade de Brasília, que permitiu o desenvolvimento desse estudo.

À Fundação Jardim Zoológico de Brasília, por permitir a realização desse estudo em suas dependências e pelo apoio ali encontrado.

Ao meu orientador, professor Dr. Valdir Filgueiras, que me estendeu a mão e confiou em mim, permitindo assim que eu tivesse a chance de realizar um trabalho tão apaixonante.

Ao meu co-orientador, Dr. Bráulio Magalhães, que aceitou o desafio de transformar uma idéia em um projeto, e este, no inicio de uma promissora série de estudos. Sempre com paciência e firmeza, me orientando e ensinando muito.

Aos meus amados pais, Irineu e Neusa, simplesmente por tudo. Por terem aceitado minha distância, por terem investido sempre em meus sonhos, pela força e especialmente pela sabedoria, representada nas palavras de amparo que sempre ouvi de meu pai: “no fim dá tudo certo”.

Ao meu marido, que abriu mão de muitas coisas para me acompanhar nessa jornada pelo planalto central, pelo amor, pela paciência e pela ajuda em todos os momentos.

Aos meus colegas e amigos de trabalho, que tanto me ajudaram no dia-a-dia desses dois anos tão intensos... Betânia, minha grande amiga, Ana Lúcia, minha compreensiva chefe, Gisely, Fernanda e Cláudia, minhas companheiras nas tardes de experimento.



Ao Dr. Raul Gonzalez Acosta, diretor presidente do zoológico, pela contribuição profissional e pelas preciosas orientações sobre a vida.

À minha madrinha Cleyde, que me levou a ingressar no meio científico e que sempre oriente essa minha caminhada.

Aos meus companheiros de mestrado, fundamentais no preenchimento de tantas lacunas do conhecimento... Luísa, Laila, Blue, Beatriz, Rafael Ajuz e especialmente àquela que foi meu anjo da guarda quando cheguei em Brasília, com a qual compartilho a paixão pelos gatos: Giovana.

Aos meus queridos, e por que não dizer, amados *Habbib*, *Amorosa*, *Ratazana*, *Baleia*, *Pereba*, *Merry*, *Bull*, *Dimmy* e minha queridíssima *Miúda*! Os gambás que me ensinaram o quanto a vida é feita de pequenos momentos. Aos que se foram antes mesmo desse estudo, meu pedido de perdão. Aos que aqui estão, meu compromisso de zelar por cada momento de bem estar, até o fim. Obrigada meus queridos.



## SUMÁRIO

I. Introdução.....	11
1.1 Características Biológicas Gerais do Gambá.....	14
1.2 Características do Sistema Visual do Gambá.....	16
1.3 Objetivos .....	24
II. Materiais e Métodos.....	26
2.1 Sujeitos.....	26
2.2 Materiais e Métodos.....	29
2.2.1 Aparato.....	29
2.2.2 Estímulos.....	30
2.2.3 Procedimentos.....	32
III. Resultados.....	40
3.1 Fase de Modelagem.....	41
3.2 Fase de Testes.....	46
IV. Discussão.....	51
V. Conclusões.....	57
VI. Referências.....	59
VII. Anexos.....	66
7.1 Folha de Registros.....	67
7.2 Aprovação no Comitê de Ética de Uso Animal.....	68



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Indivíduo da espécie <i>Didelphis albiventris</i> .....	15
Figuras 2 e 3. Gaiolas onde os animais ficavam alojados.....	27
Figura 4. Alimentação oferecida aos animais.....	28
Figura 5. A) Vista Superior do Aparato.....	29
B) Vista frontal da área de colocação dos estímulos.....	29
Figura 6. Um dos pares de estímulos a ser utilizado.....	30
Figura 7. Luxímetro colocado no interior do aparato para medição de luminosidade no mesmo.....	31
Figura 8. Manipulação diária dos filhotes.....	32
Figura 9. Seqüência de imagens do gambá tendo acesso ao reforço alimentar após empurrar a janela com o estímulo.....	34
Figura 10. Par de estímulos utilizado nas tarefas de contraste simultâneo e de constância de brilho.....	37
Figura 11. Representação do par de estímulos utilizado nas tarefas de constância de brilho. ....	38
Figura 12. Representação gráfica do Número de Sessões necessárias para que o animal atingisse o critério de aprendizagem na fase modelagem inicial.....	42
Figura 13. Representação gráfica do Número de Sessões necessárias para que o animal atingisse o critério de aprendizagem na fase modelagem experimental.....	43
Figura 14. Indivíduo pára diante do estímulo e o observa, sem tocá-lo, recuando e se dirigindo para o outro lado, que contém o estímulo correto.....	44
Figura 15. Desempenho dos indivíduos dos dois grupos no desenvolvimento da fase Modelagem Inicial com base no número de tentativas necessárias para que o critério de aprendizagem fosse atingido.....	45
Figura 16. Desempenho dos indivíduos dos dois grupos no desenvolvimento da fase Modelagem Experimental com base no número de tentativas necessárias para que o critério de aprendizagem fosse atingido.....	45
Figura 17. Desempenho dos três indivíduos nas tarefas de discriminação	



visual para verificação dos efeitos de contraste simultâneo e constância de brilho.....	47
Figura 18. Desempenho da fêmea Baleia nos testes discriminativos para investigação do efeito de contraste simultâneo e constância de brilhos.....	48
Figura 19. Desempenho da fêmea Pereba nos testes discriminativos para investigação do efeito de contraste simultâneo e constância de brilhos.....	49
Figura 20. Desempenho do macho Bull nos testes discriminativos para investigação do efeito de contraste simultâneo e constância de brilhos.....	50



## LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Sumário da Visão de Cores em Marsupiais.....	20
Tabela 02. Relação dos indivíduos do presente estudo.....	26
Tabela 03. Medidas realizadas no estímulo da tarefa de constância de brilho....	39
Tabela 04. Número de sessões e de tentativas necessárias para que as primeiras fases fossem concluídas de acordo com o critério de aprendizagem.....	42
Tabela 05. Número de sessões necessárias em cada tarefa para que o critério de aprendizagem fosse superado pelos indivíduos Baleia, Pereba e Bull.....	47



## RESUMO

Receber informações sobre o ambiente circundante é essencial para um animal responder adequadamente a mudanças no mesmo e assim possibilitar a sobrevivência, a reprodução e a perpetuação da espécie. O sistema sensorial é um conjunto de estruturas que recebe essas informações e as transmite ao sistema nervoso central, para que possam ser interpretadas. Além dessa função, o sistema visual está relacionado também à regulação dos ciclos biológicos de muitos animais, por captar informações que sinalizam o ciclo claro-escuro. O gambá, animal marsupial de hábitos noturnos/crepusculares, tem se mostrado um interessante animal nos estudos de fisiologia da visão pelo fato de remontar a um período importante da evolução dos mamíferos, pois parece não ter sofrido muitas modificações ao longo do tempo, já sendo encontrado com características atuais desde o pleoceno. O presente estudo investigou, em 7 indivíduos, o efeito de contraste simultâneo para o gambá de orelha branca e com base nesse aspecto, pesquisou a constância de luminosidade, função que, para esses animais, pode estar relacionada à capacidade de forragear no crepúsculo e no período noturno. Foram utilizados testes de discriminação visual, com seis pares de estímulos discriminativos, compostos sempre por um alvo e um pedestal, compondo assim cenas acromáticas que serviriam para a investigação dos dois efeitos acima referidos. A fase de modelagem inicial, na qual os animais aprendiam a proceder dentro do aparato, apresentou uma diferença entre dois grupos. Os animais criados com maior contato com humanos desde filhotes, aprenderam mais rápido do que os animais que chegaram já adultos para o experimento. Três indivíduos que completaram todas as etapas do estudo, duas fêmeas e um macho, apresentaram o efeito de contraste simultâneo e também a constância de brilho. Os dados obtidos demonstram a importância de estudos de fenômenos visuais da espécie, uma vez que ambos os efeitos são relacionados a um processo complexo de percepção visual.

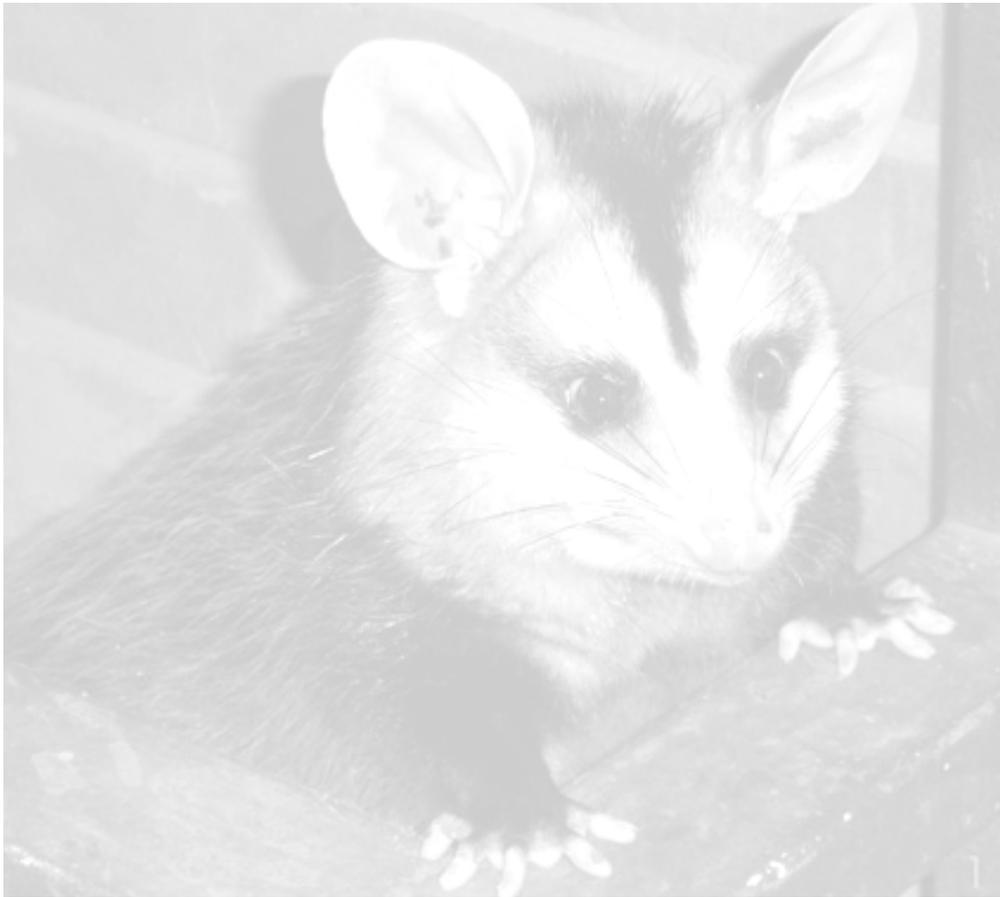
Palavras Chave: Gambá, Percepção Visual, Constância de Brilho e Contraste Simultâneo.



## ABSTRACT

The ability to obtain information from one's environment is essential for an animal to adequately respond to change, consequently contributing to its survival, reproduction and perpetuation of the species. The sensory system is a set of structures that receives such information, transmitting it to the central nervous system for interpretation. Additionally, the visual system is also related to the regulation of the biological rhythms of several animals, as it receives information which signals the light-dark cycle. The opossum, a marsupial with nocturnal/crepuscular habits, has been shown to be an interesting subject for studying physiological aspects of the visual system, as it remotes back to an important period of mammal evolution. In fact, these marsupials do not seem to have suffered many changes during time, having at present characteristics seen since the pleocene. The present study investigated, in seven individuals, the effects of simultaneous contrast in the *Didelphis albiventris* and based on such feature, analyzed brightness constance. In these animals, such feature may be related to the ability to forage at dawn and during nocturnal periods. Visual discrimination tests were conducted, with six pairs of stimuli, consisting always of a target and a pedestal. Thus, achromatic scenes were formed, which allowed the analysis of the two effects mentioned above. During the initial modeling phase, when the animals learned to proceed within the apparatus, two groups differed from one another. Animals that were raised with greater human contact since younglings learned faster than those who arrived for testing as adults. Three individuals that completed all the phases of the study, two females and one male, demonstrated both simultaneous contrast and brightness constance effects. The data presently obtained demonstrated the importance of conducting studies on visual features of this species, as both effects are related to a complex process of visual perception.

Key words: opossum, visual perception, brightness constance and simultaneous contrast.



## INTRODUÇÃO



## I. INTRODUÇÃO

A evolução das espécies é um processo constante, relacionado à adaptação das mesmas ao ambiente em que vivem. Sendo assim, receber informações acerca desse ambiente é essencial para responder adequadamente a mudanças no mesmo e assim possibilitar a sobrevivência, a reprodução e a perpetuação da espécie.

Dentro do Reino Animalia, muitas são as formas que os animais têm para perceber o ambiente. Os protozoários, organismos unicelulares, respondem a estímulos tácteis, químicos e físicos do ambiente, que são transduzidos e detectados na membrana celular. No entanto, conforme aumenta a complexidade dos organismos, é necessário que se façam presente estruturas e estratégias que possibilitem a percepção do ambiente.

Nos vertebrados, essa importante função é cumprida por um conjunto de órgãos especializados em receber e transmitir ao sistema nervoso central as modificações que ocorrem no ambiente circundante. É o chamado sistema sensorial, do qual faz parte o sistema visual, objeto de estudo dessa pesquisa. Além de transmitir sinais luminosos para o mesencéfalo, tálamo e daí para o córtex cerebral, compondo circuitos que formam a visão, a retina envia informações ao hipotálamo, responsável pela regulação do relógio biológico, ou seja, pelos ajustes que permitem ao organismo se adequar e reagir de acordo com o ciclo que determina as atividades vitais da maior parte dos animais: o ciclo claro-escuro (Markus et al, 2003). De acordo com essa regulação, atuam os hormônios que sinalizam ao organismo, por exemplo, o momento de se alimentar e de repousar.

Esse ciclo atua de forma diferente nos animais que apresentam hábitos noturnos, ou seja, aqueles que apresentam maior atividade durante a noite e que passam boa parte do dia em repouso. A utilização do período noturno para a realização de atividades é uma



estratégia importante para alguns animais por vários fatores, entre os quais podemos citar a baixa temperatura, que favorece grandes deslocamentos em busca de alimento e também a ausência de luminosidade, que pode auxiliar na camuflagem dos animais, favorecendo tanto predadores, que podem se aproximar de sua caça sem serem percebidos, como as presas, que também se protegem pela camuflagem.

No entanto, a escolha do período escuro para as atividades demanda do organismo uma série de adaptações, especialmente no sistema visual, cujo funcionamento é diretamente relacionado à presença de luz no ambiente. Os animais noturnos apresentam características que favorecem a visão em condições de pouca luz (escotópica), como aumento relativo do globo ocular, presença de um cristalino esférico de grande diâmetro, grande abertura da pupila e extensa área corneana, além da presença do *tapetum lucidum*. Esta estrutura consiste numa camada de células cilíndricas grandes que contêm cristais de guanina e fica localizada entre o epitélio pigmentar e a retina, formando uma camada que reflete a luz (Herman & Steinberg, 1982), acentuando assim o contraste de objetos.

Alguns estudos relacionam o hábito noturno à visão monocromática. Jacobs (1992) observou que o quati (*Nasua nasua*) apresenta diferença na composição dos fotopigmentos dos cones na retina, quando comparado ao jupará (*Potos flavus*) e ao guaxinim (*Procyon lotor*), embora pertençam à mesma família, Procyonidae. A análise por meio de eletroretinograma mostrou ainda que o quati é dicromático, enquanto o guaxinim e o jupará são monocromáticos. Essa variação foi relacionada ao fato de os dois últimos animais serem de hábitos noturnos, e o quati possuir suas atividades no período diurno.

Outros estudos revelam, no entanto, que diversos animais de hábitos noturnos possuem adaptações que confere a visão de cores (Kelber & Roth, 2006). Alguns estudos sugerem a presença até de tricromatismo em algumas espécies do gênero *Didelphis*, do qual



faz parte o gambá, animal marsupial de hábitos noturnos/crepusculares, que tem se mostrado um interessante animal nos estudos de fisiologia da visão, pelo fato de remontar a um período importante da evolução dos mamíferos. Esta importância é consubstanciada por trabalhos realizados por neurocientistas brasileiros (Oswaldo-Cruz et al., 1979; Silveira et al., 1982).

### 1.1 Características Biológicas Gerais do Gambá

A família Didelphidae inclui as formas mais antigas da ordem Marsupialia, sendo muitas delas conhecidas por meio de registros fósseis datados do período cretáceo inferior. Acredita-se que os marsupiais tenham tido, assim como os monotremados e os mamíferos insetívoros, um ancestral comum Terapsídeo, ou seja, um réptil mamaliforme (Couto, 1953).

Os representantes da família Didelphidae, de acordo com Couto (1979), apresentam evidências morfológicas e geológicas que permitem considerá-los como tronco de origem dos grupos de marsupiais subsequentes. Além disso, o gênero *Didelphis* parece não ter sofrido muitas modificações ao longo do tempo, pois já era encontrado com características atuais desde o pleoceno (Couto, 1953). Dessa forma, estudar aspectos do comportamento desses animais pode levar ao conhecimento de características dos primórdios da evolução dos mamíferos.

O *Didelphis albiventris* é um marsupial da família Didelphidae, sendo conhecido popularmente como gambá, raposa, saruê, seriguê e micurê (Rossi et al, 2006). De coloração preta, avermelhada e raramente branca, apresentam pelagem diferenciada dentro da família, com subpelos e pelos guarda, que aparecem em menor número que os outros



(Nowak, 1991). Geralmente apresentam três listras negras na face, duas sobre os olhos e uma na fronte (Figura 1). A primeira porção da cauda preênsil apresenta pêlos e o restante é nu. (Voss & Jansa, 2003). Os adultos alcançam de 30,5 a 89 cm de comprimento de cabeça e corpo, com mais 29 a 43 cm de cauda, com a massa corporal entre 500g e 2,750 kg (Cáceres & Monteiro Filho, 1999).



Figura 1. Indivíduo da espécie *Didelphis albiventris*.

As quatro patas apresentam 5 dígitos e todas tem garras afiadas, exceto o primeiro dedo posterior, que é oponível aos outros dígitos. A fêmea apresenta uma bolsa bem desenvolvida, comumente com 13 mamas dispostas em um círculo aberto com uma mama no centro. (Nowak, 1991).

De hábitos noturnos, passam o dia em cavidades rochosas ou em troncos de árvores. Constroem ninhos de folhas e gravetos, que transportam com a cauda preênsil e com a boca. Caminham lentamente no solo, com habilidade maior nos troncos das árvores, onde utilizam a cauda para se pendurar. São basicamente solitários e anti-sociais. Entre eles são



agressivos, mas na estação reprodutiva machos e fêmeas podem passar vários dias juntos (Nowak, 1991).

A gestação varia de 12 a 14 dias e o número de filhotes varia de 04 a 14. O desmame se inicia aproximadamente após 60 dias, quando os filhotes saem do marsúpio e ficam agarrados às costas da mãe (Rossi *et al*, 2006). Atingem a idade reprodutiva aos 6 meses. Em natureza vivem até 3 anos, mas em cativeiro podem viver até 5 anos (Nowak, 1991).

São classificados como onívoros por Fonseca *et al* (1996). A dieta é composta por roedores e aves de pequeno porte, rãs, lagartos, insetos e caranguejos (Lange & Jablonski, 1998) além de variados frutos, o que faz com que esses animais atuem no ambiente como importantes dispersores de sementes (Delciellos *et al.*, 2006).

Habitam savanas, matas de galeria e florestas úmidas em latitudes tropicais (Eisenberg & Redfort, 1999; Emmons & Feer, 1990). A distribuição geográfica da espécie abrange porções leste e centro oeste do Brasil, Paraguai, Uruguai, as regiões norte e central da Argentina e o sul da Bolívia (Lemos & Cerqueira, 2002).

A espécie é considerada de baixo risco de extinção pela IUCN (2006), enquadrada na subcategoria preocupação menor.

## **1.2 Características do Sistema Visual do Gambá**

O estudo comparativo da fisiologia visual em mamíferos tem tido grandes avanços com a adoção do gambá como modelo experimental. São diversas espécies pertencentes ao gênero *Didelphis* que vem sendo estudadas, sendo de grande importância os estudos realizados por pesquisadores brasileiros, que vêm desvendando o sistema visual de animais



que representam características que remontam à evolução dos mamíferos. Nesse contexto, podem-se citar os 20 anos de pesquisas realizadas com o gambá da mata atlântica, o *Didelphis marsupialis aurita* no laboratório de Neurobiologia da Retina no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

A acuidade visual do gambá da mata atlântica (1,25 ciclos por grau) é inferior a de primatas e de carnívoros (Oswaldo-Cruz e Hokoç, 1979, Silveira et al, 1982) e a extensão total do campo visual é de 223°. O campo visual binocular é de 125°, idêntico ao do opossum, um representante norte americano do gênero (*Didelphis virginiana*). Em decorrência de seus hábitos noturnos, o olho do gambá retém certas características que atuam no sentido de melhorar a visão em condições de pouca luz (visão escotópica), como aumento relativo do globo ocular, presença de um cristalino esférico de grande diâmetro, grande abertura da pupila e extensa área corneana. Além dessas características, o gambá apresenta na hemi-retina superior uma estrutura comum aos animais de hábitos noturnos: o *tapetum lucidum*. A acuidade visual para o contraste, característica que confere a capacidade de distinção de imagens em menor contraste, foi medida por Silveira *et al* (1982) em 1,25 ciclos por grau.

A retina do gambá da mata atlântica (Ahnelt et al, 1995), assim como a do opossum norte americano (Kolb e Wang, 1985), apresenta dois tipos de fotorreceptores, sendo por essa razão chamada retina dupla. Tais fotorreceptores são os cones (responsáveis pela visão diurna) duplos e simples com gotículas de óleo, característica remanescente do sistema visual dos répteis e os bastonetes simples, comuns a todos os mamíferos e responsáveis pela visão noturna. Nas retinas periféricas, a razão bastonetes/cones é de 130:1. As maiores concentrações de cones simples e duplos, ambos com gotículas de óleo estão na hemiretina



inferior, região que recebe os raios luminosos do campo visual superior do animal. (Ahnelt *et al*, 1995). Dessa forma, o gambá possui três tipos morfológicos de cones: cones simples sem gotícula de óleo (CS), cones simples com gotícula de óleo (CS-GO+) e cones duplos com gotícula de óleo (CD-GO+). Acredita-se que a presença de cones com gotículas não seja apenas vestigial, mas possa desempenhar alguma função importante para a sobrevivência desse animal. (Hokoç *et al*, 2006).

O sinal visual, após detectado pelos fotorreceptores é conduzido pelas células bipolares até as células ganglionares, de onde seguem pelo nervo óptico até os núcleos centrais do sistema nervoso. Essas células apresentam-se em maior densidade em regiões responsáveis por uma maior acuidade visual, como a fóvea dos primatas. No caso do gambá sul americano (*Didelphis marsupialis aurita*) a região de pico de densidade das células ganglionares está localizada a 4,3° superior e 29° temporal (Volchan *et al*, 1985), sendo equivalente a 4,8 células ganglionares por grau de visão e a relação entre densidade na região pico e na região de menor densidade é de 5:1 (Hokoç & Oswaldo Cruz, 1979). O número total de células ganglionares nessa espécie foi estimado em 74.700 a partir de eletromicrografias de secções do nervo óptico (Hokoç & Oswaldo Cruz, 1978) e em 77.000 a partir de contagem das células em preparações aplanadas de retina (Hokoç & Oswaldo Cruz, 1979).

De acordo com estudos realizados com o gambá sul americano, utilizando preparações planas de retinas coradas com violeta de cresila, as células ganglionares podem ser classificadas em três grupos: grandes, médias e pequenas. Tal classificação é feita com base na forma, tamanho, diâmetro nuclear e coloração do citoplasma, núcleo e nucléolo (Hokoç *et al*, 2006).



Presume-se, de acordo com evidências comportamentais, genéticas, eletrofisiológicas e anatômicas, que parte dos marsupiais apresentem visão cromática, isto é, sejam capazes de discriminar estímulos que diferem apenas na composição espectral, independentemente da intensidade dos mesmos. Essa habilidade é conferida pela presença e atuação de fotorreceptores sensíveis aos diferentes espectros e pela capacidade do sistema visual de produzir, a partir do sinal captado por esses fotorreceptores, imagens cromáticas.

A maioria dos animais apresenta essa característica, sendo que ocorre variação no número de tipos de fotorreceptores presentes na retina. Com a presença de duas classes espectrais de fotorreceptores, cujas curvas de sensibilidade se sobrepõe, o animal é classificado em dicromata, como a maioria dos mamíferos. Os humanos e os primatas do Velho Mundo são sensíveis a três comprimentos de onda, sendo então tricromatas, assim como alguns peixes, répteis e anfíbios. Algumas espécies de primatas do Novo Mundo, como o macaco de cheiro, apresentam fêmeas tricromatas e machos dicromatas, variação cuja importância ecológica ainda tem sido pesquisada e que tem embasamentos em estudos comportamentais e principalmente genéticos (Rowe, 2002, Jacobs, 2007). Existem ainda, animais que respondem a quatro comprimentos de onda, portanto, tetracromatas, como alguns peixes, a maioria dos répteis e das aves (Kelber & Poth, 2006).

Existem divergências quanto ao tipo de visão cromática nos marsupiais (Vide Tabela 1), pois nem todos os estudos mostram tricromatismo nas espécies estudadas. Ademais, são poucos os estudos comportamentais, que são imprescindíveis para que se confirme a ocorrência da visão tricromática (Jacobs, 1993). Assim, estudos comportamentais subseqüentes, com uma maior variedade de espécies, poderão determinar se a visão tricromática é o sistema predominante da visão de cores em marsupiais, ou ao menos em algumas ordens, mais estudadas nesse aspecto, como a Didelphimorphia e



Peramelemorphia. A variabilidade que existe no grupo dos Marsupiais, divididos em 7 ordens, é um fator que dificulta a generalização de um padrão visual para esse grupo, especialmente pela diversidade de habitats e a posição ecológica das diferentes espécies que compõe esse interessante grupo de mamíferos.

TABELA 01 – SUMÁRIO DA VISÃO DE CORES EM MARSUPIAIS

ANIMAL	MÉTODO	TRICROMATISMO	REFERÊNCIA
<i>Didelphis aurira</i>	ERG	SIM	Cunha et al, 2006
<i>Didelphis virginiana</i>	C	SIM	Friedman, H., 1967
<i>Isoodon obesulus</i>	MSP	SIM	Arrese et al., 2005
<i>Macropus eugenii</i>	C	NÃO	Hemmi, 1999
<i>Macropus eugenii</i>	ERG; G	NÃO	Deeb et al., 2003
<i>Setonix brchyurus</i>	MSP	SIM	Arrese et al., 2005
<i>Sminthopsis crassicaudata</i>	G	NÃO	Strachan et al, 2004
<i>Sminthopsis crassicaudata</i>	C	SIM	Arrese et al., 2006
<i>Sminthopsis crassicaudata</i>	MSP	SIM	Arrese et al, 2002
<i>Sminthopsis macroura</i>	G	NÃO	Strachan et al., 2004
<i>Tarsipes rostratus</i>	MSP	SIM	Arrese et al., 2002
<i>Tarsipes rostratus</i>	IT	SIM	Sumner et al., 2005

Abreviaturas:

C (Comportamental); ERG (eletroretinografia); G (Genética); IT (inferência teórica a partir da composição espectral de itens forrageados) e MSP (microespectrofotometria).

Outro importante aspecto da visão de cores é o fenômeno da constância de cores. A visão de cores possui papel fundamental na ecologia alimentar, na detecção de presas e predadores e na escolha de parceiros nos animais, porque a cor é uma propriedade do objeto, e não do iluminante. É exatamente esse fenômeno, no qual a cor de um objeto é a mesma, independentemente dos comprimentos de onda refletidos, que é conhecido como constância de cores (Land, 1977; Zeki, 1993; Ruttiger et al, 1999; Walsh, 1999). Assim, se não fosse a constância de cores, a visão de cores perderia seu significado como um mecanismo de sinalização biológica (Mollon, 1989).



Postula-se que a constância de cores seja o resultado de um processo visual na retina e no cérebro, que produz várias pistas para a percepção do estímulo e atua em diferentes condições de iluminação. As reflexões mútuas, ou seja, a luz que os objetos refletem uns nos outros, podem ser uma dessas pistas, já que contém informações sobre as propriedades de refletância das superfícies envolvidas (Funt et al, 1991). Outra provável pista é a informação contida em ‘pontos luminosos’ especulares refletidos de superfícies brilhantes, como a epiderme das plantas (Lee, 1986; D’Zmura e Lennie, 1986). De acordo com esta hipótese, os pontos luminosos funcionariam como espelhos quase perfeitos, refletindo a fonte de luz e fornecendo pistas para a composição cromática do iluminante. Ainda, de acordo com a teoria da adaptação de von Kries ocorreria um reajuste nos fotorreceptores, que, dessa forma, permitem que a cor seja percebida da mesma forma em diferentes condições de luminosidade (Murray *et al*, 2006). Esse fenômeno tem sido estudado principalmente em humanos, com estudos em animais a princípio limitados a abelhas, mariposas, peixes, borboletas (Balkienius & Kelber, 2004) e macacos (Zeki, 1993).

Enquanto se investiga a presença de tricromacia nessa espécie, que será importante para favorecer a realização do estudo da constância de cores, pelo fato de oferecer respostas quanto aos estímulos cromáticos mais adequados, outra importante característica do sistema visual desses animais a ser conhecida é a constância de brilhos, que consiste na distinção entre dois estímulos acromáticos em diferentes condições de luminosidade. Considerando, no sentido evolutivo, a visão acromática como base para o processo visual de cores, a observação da constância de brilho é um indício da presença de constância perceptual, sendo, dessa forma, essa investigação, um passo no estudo desse complexo fenômeno.

A sensibilidade ao contraste é uma importante função do sistema visual desses animais pelo fato de apresentarem hábitos noturnos, o que significa que distinguem objetos



ao seu redor pelo contraste entre os mesmos e o ambiente. Essa função, nos seres humanos, está relacionada ao reconhecimento de formas, incluindo faces (Santos & Simas, 2001) uma importante atividade exigida constantemente na vida em sociedade. Para esses animais, é de suma importância que diferenciem, no ambiente, suas presas e seus predadores, sendo possível que tal função seja executada por sistema semelhante ao do reconhecimento facial em humanos, relacionado, portanto, à sensibilidade ao contraste.

Ainda sobre contraste, em humanos, é observado o efeito de contraste simultâneo de luminosidade, no qual uma região parece mais clara quando observada contra um fundo escuro e mais escura quando observada contra um fundo claro. Esse efeito, que foi descrito inicialmente por Aristóteles (384 – 322 a.C.), permanece ainda sem consenso sobre seu funcionamento. No entanto, a partir de estudos psicofísicos, o filósofo árabe Alhazen (965 a.C. - 1040 d.C.) concluiu que a aparência das cores era, em parte, resultado de um processo mental, ou seja, o que é percebido não corresponde exatamente às informações que chegam à retina, sendo resultado de uma faculdade do julgamento cerebral, envolvendo um processo denominado inferência, então o efeito de contraste simultâneo seria resultado de uma avaliação cerebral sobre a força relativa das cores emanadas das partes vizinhas à cena observada (Sabra, 1978). Hering, (1874/1964) contribuiu com essa conclusão no momento em que, com base na idéia de que a aparência das cores envolveria a comparação de sensações visuais a partir de suas regiões vizinhas, desenvolve a idéia de que interações recíprocas na formação da imagem neural determinaria muito a aparência de uma superfície ou objeto, havendo mecanismos fisiológicos sensíveis ao contraste que estariam diretamente relacionados ao fenômeno. Essa função fisiológica é evidenciada pela descoberta de neurônios na área V4 do córtex visual de primatas que aparentemente



respondem por uma significativa quantidade de propriedades visuais que respondem pela produção de efeitos de contraste e constância visual (Spillman e Werner, 1996).

Os efeitos da luminosidade foram estudados também por Katz (1935), que desenvolveu uma variante do método de análise da constância de luminosidade, ou de brilhos, que consiste basicamente, na inserção de luminosidade adicional sob um dos estímulos, o que faz com que seja relevante não apenas as características físicas dos estímulos, mas sim a relação espacial entre eles.

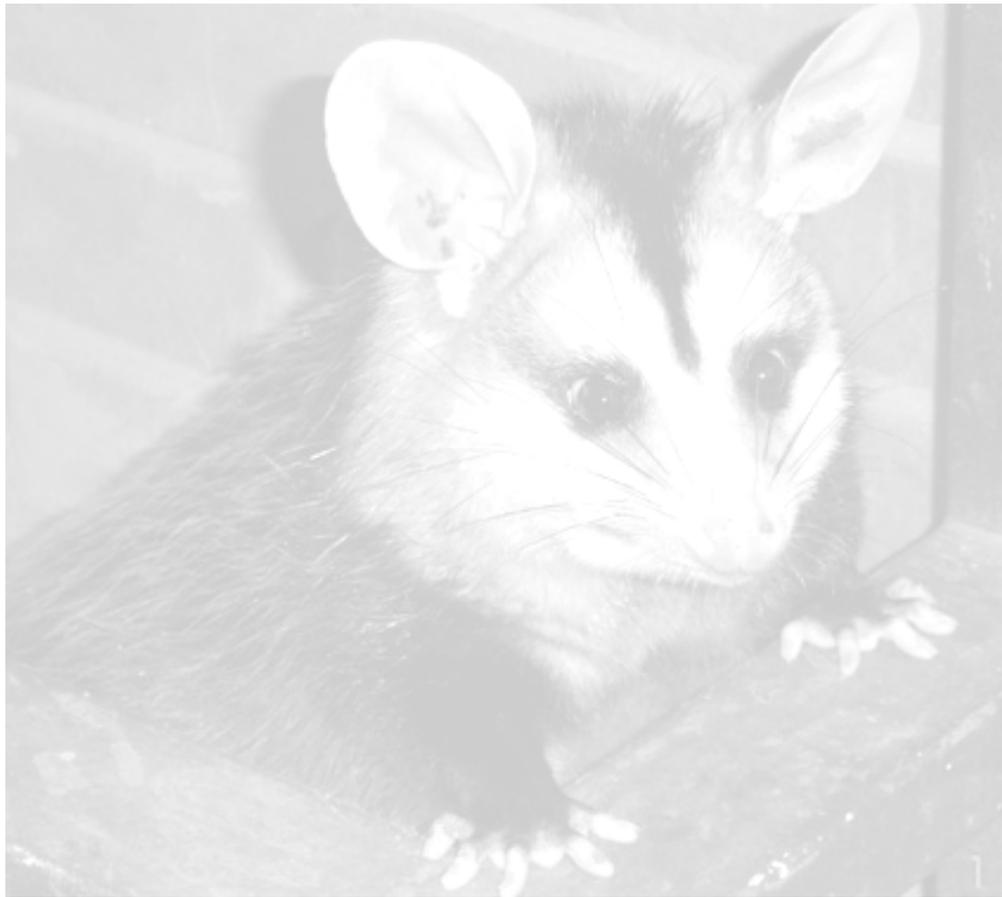
O presente estudo investigou o efeito de contraste simultâneo para o gambá de orelha branca e com base nesse aspecto, pesquisou a constância de luminosidade. A importância de tal investigação está, principalmente, no fato de não haver, na literatura, estudos sobre esses dois fenômenos em marsupiais, o que confere a esse estudo um caráter pioneiro. Essa função, para esses animais, pode estar relacionada à capacidade dos mesmos de forragear no crepúsculo e no período noturno, entre os quais a diferença primordial está na luminosidade, ou seja, a constância de brilhos pode determinar o sucesso na manutenção da capacidade de distinguir o meio que o cerca em diferentes horários e até mesmo em diferentes condições climáticas, que afetam diretamente a luminosidade do ambiente, bem como as fases da lua.



### **1.3 Objetivos**

- Investigar o efeito de contraste simultâneo e o fenômeno da constância de brilho no gambá de orelha branca, *Didelphis albiventris*.

- Obter informações que possam contribuir para a compreensão do fenômeno da visão acromática no gambá e a partir dessas informações oferecer subsídios para os estudos com visão de cores nesses animais.



## MATERIAIS E MÉTODOS



## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Sujeitos

O estudo foi realizado com 08 indivíduos da espécie *Didelphis albiventris*, sendo 05 fêmeas e 03 machos (Tabela 02). Todos os indivíduos fazem parte do plantel do Jardim Zoológico de Brasília. Os filhotes criados no zoológico de Brasília foram recebidos em setembro de 2005, com idade estimada entre 50 e 60 dias, (Samoto *et al*, 2006). Dessa forma, a idade desses animais durante a fase experimental era de 2 anos, mesma idade dos três indivíduos que foram recebidos já adultos, vindos da Universidade de São Paulo. Fez parte ainda um macho jovem, com idade estimada em 06 meses, que foi recebido no zoológico de Brasília ainda filhote, em setembro de 2007.

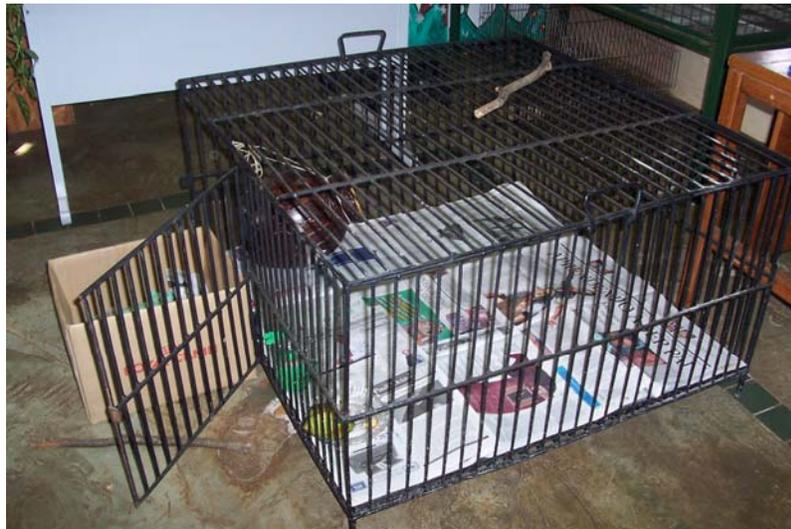
TABELA 02 – RELAÇÃO DOS INDÍVIDUOS DO PRESENTE ESTUDO.

Sujeito	Sexo	Origem	Etapas concluídas
Baleia	Fêmea	Zoológico de Brasília	Todas
Pereba	Fêmea	Zoológico de Brasília	Todas
Miúda	Fêmea	Zoológico de Brasília	Modelagem (sofreu intervenção cirúrgica e foi afastada dos testes)
Ratazana	Fêmea	Zoológico de Brasília	Até a Tarefa 2 (veio a óbito)
Dimmy	Macho	Zoológico de Brasília	Modelagem
Prima	Fêmea	Universidade de São Paulo	Nenhuma
Bull	Macho	Universidade de São Paulo	Todas
Merry	Macho	Universidade de São Paulo	Modelagem (veio a óbito)

Os animais foram alojados em gaiolas (Figuras 2 e 3) nas dependências da Superintendência de Educação e Lazer – SUEL, local de desenvolvimento dos testes e onde anteriormente a este estudo alguns participavam de projetos de educação ambiental, como palestras e visitas noturnas realizadas no Zoológico. Tais acomodações estão de acordo



com os ideais de bem estar animal e suprem as necessidades físicas dos animais, que após o experimento foram destinados a recintos mais adequados à espécie.



Figuras 2 e 3. Gaiolas onde os animais ficavam alojados.

O manejo diário desses animais era realizado pela equipe técnica da SUEL, composta por uma bióloga e uma médica veterinária. A alimentação era realizada diariamente por volta das 17 horas, composta por frutas e ração para cães e a água sempre fornecida *ad libitum* (Figura 4). Ovos crus eram oferecidos uma vez por semana e eventualmente eram oferecidos insetos (besouros e tenébrios).



Figura 4. Alimentação oferecida aos animais.

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



## 2.2 Materiais e Métodos

### 2.2.1 Aparato

Para a realização dos testes foi utilizado um aparato de dupla escolha para discriminação visual, revestido em fórmica cinza (Figura 5). Esse aparato consiste numa câmara de partida que permite, pela abertura de uma porta tipo guilhotina, o acesso à câmara de dupla escolha, na extremidade oposta encontram-se duas janelas, do tipo basculante, confeccionadas em acrílico transparente, nas quais são colocados os estímulos, quadrados de 20 X 20 cm. Atrás de cada uma das janelas havia uma plataforma para colocação do reforço. A parte superior do aparato, mantido a 60 cm do chão, é aberta, por onde é possível observar e manipular o animal.

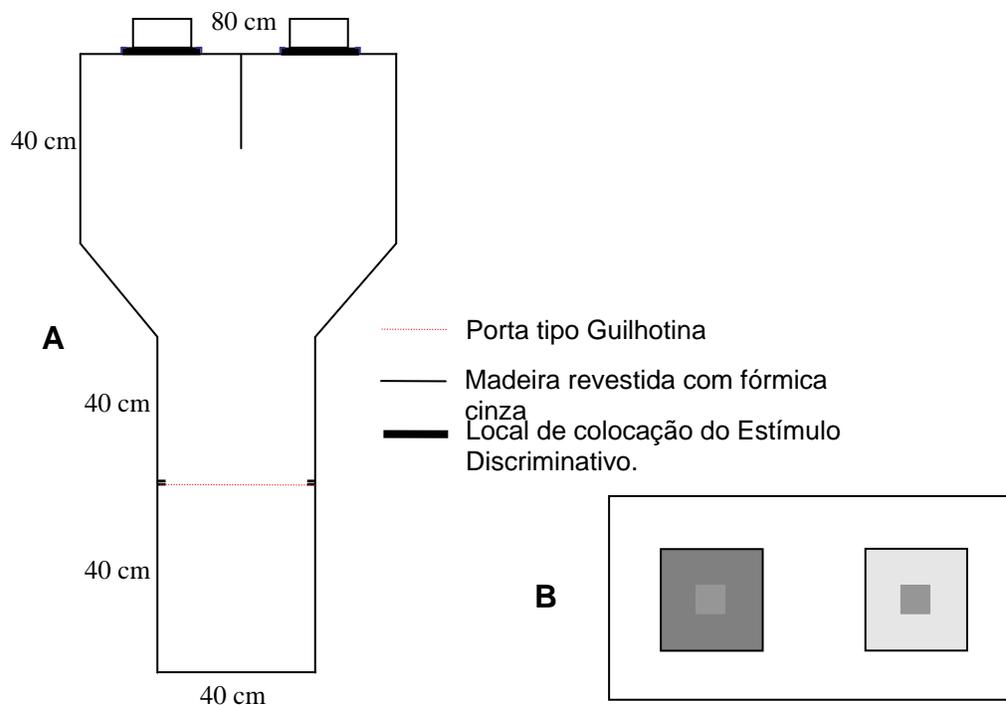


Figura 5. A) Vista superior do aparato.

B) Vista frontal da área de colocação dos estímulos



### 2.2.2 Estímulos

Em qualquer abordagem comportamental para o estudo da visão, uma etapa fundamental e decisiva para a boa condução dos experimentos é a escolha e caracterização dos estímulos a serem discriminados, bem como a definição do iluminante. Os estímulos foram desenvolvidos no programa de computação gráfica CorelDrawl, (que permite a definição da porcentagem dos tons de cinza utilizados), impressos em papel comum utilizando-se uma impressora Jato de Tinta Epson C4770 e tiveram sua composição espectral medida utilizando-se um espectrofotômetro acoplado a um laptop. Foram elaborados pares discriminativos compondo cenas acromáticas mais complexas (Figura 6).

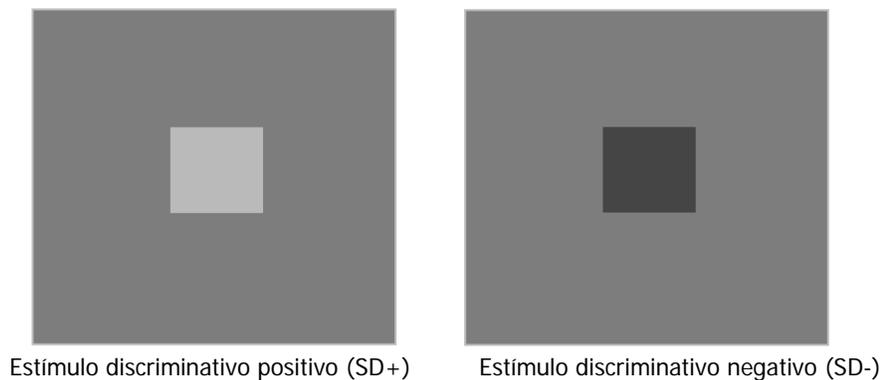


Figura 6. Um dos pares de estímulos a ser utilizado.

Os testes foram desenvolvidos na sala onde os animais ficam, em uma pequena área isolada por divisórias cinzas. Como iluminante foi utilizada uma lâmpada D65, que apresenta a mesma composição espectral da luz solar, recriando assim as condições de luminosidade do ambiente externo, natural para esses animais. A intensidade luminosa do interior do aparato foi medida com um luxímetro (Tenma 72-7250), mantendo-se em 594 lux ou 55,2 cd. (Figura 7).



Figura 7. Luxímetro colocado no interior do aparato para medição de luminosidade no mesmo. Observe que a fotocélula foi posicionada exatamente no centro do mesmo, local onde o animal tem a visão dos dois estímulos e de onde efetua a escolha.



### 2.2.3 Procedimentos

Estudos que envolvem a realização de testes que tornam necessária a manipulação de animais silvestres, que normalmente são agressivos, tem geralmente início com a fase de habituação, na qual os animais são manipulados e condicionados a aceitar o contato humano. Essa fase foi realizada com esses animais desde filhotes, incluindo cuidados e manipulação diária de pelo menos 10 minutos com cada indivíduo para cada um dos indivíduos criados no zoológico de Brasília (Figura 8). Os indivíduos que foram recebidos já adultos, vieram da Universidade de São Paulo, onde chegaram ainda filhotes e foram habituados à manipulação humana, mas não com a mesma intensidade e frequência.



Figura 8. Manipulação diária dos filhotes.



## **Modelagem**

Foram realizadas duas etapas na fase de modelagem, diferenciadas pelo grau de dificuldade exigido para a realização das tarefas.

Todos os testes foram conduzidos por uma única pessoa, que após abrir a câmara inicial dirigia-se à extremidade onde havia os estímulos, ali permanecendo até que o indivíduo em questão concluísse a tentativa, encostando o focinho em uma das janelas. Nesse momento o animal era gentilmente conduzido à câmara inicial, onde consumia o reforço, caso o tivesse obtido.

### *Modelagem Inicial*

Nessa fase os animais foram ensinados a sair da câmara inicial, se dirigir às janelas basculantes e empurrá-las com o focinho para acessar o reforço, um pedaço de fígado cozido, de cerca de 1cm<sup>3</sup>, localizado sobre uma pequena plataforma, (Figura 9). O animal era então reconduzido à câmara inicial, onde permanecia por 10 segundos até o início da próxima tentativa. Nessa fase eram colocados estímulos iguais, ambos brancos. Em todas as etapas, nas duas plataformas havia o reforço, para evitar que os animais escolhessem o lado por orientação olfativa. Cada sessão era constituída por 10 tentativas. Era considerado como tentativa o deslocamento do animal até uma das janelas e a abertura da mesma com o focinho.

A fase era considerada superada quando o tempo de latência máximo após a abertura da porta era de 5 segundos, ou seja, quando em até 5 segundos o animal saía da câmara de partida.



Figura 9. Sequência de imagens do gambá tendo acesso ao reforço alimentar após empurrar a janela com o estímulo. Obs: esse animal ainda estava sendo adaptado ao fígado, seus primeiros testes foram feitos com fruta.

### *Modelagem Experimental*

Nessa fase, foram utilizados pares de estímulos de fácil discriminação, como preto e branco. O estímulo positivo (SD+) era o branco. Quando o animal acessava o estímulo incorreto, nesse caso o preto, ele era reconduzido à câmara inicial, na qual permanecia por 10 segundos, tempo equivalente ao que seria ocupado consumindo o reforço. Foram realizadas sessões diárias com esses indivíduos, sempre no fim da tarde, com 30 tentativas em cada sessão, conforme a folha de registros em anexo. A fase era considerada superada quando o animal atingia 90% de acertos em duas sessões consecutivas, nesse caso, cometer no máximo três erros em duas sessões consecutivas. A apresentação dos estímulos entre os lados foi feita de forma semi-aleatória, visando evitar que os animais utilizassem o local de apresentação como pista na realização dos testes (Gellerman, 1939). Durante a realização dos testes, quando não havia alternância do lado do SD+, enquanto o animal aguarda na



câmara inicial, era feita a simulação da troca dos estímulos, para que o ruído desse procedimento, quando houvesse a troca de lado do SD+ não atuasse como pista para o animal. A partir dessa fase, cada sessão era composta por 30 tentativas. No entanto, foi observado que alguns animais não conseguiam realizar tantos testes, pois adormeciam na câmara inicial. Diante desse fato, foi estabelecido 10 como número mínimo de tentativas para compor uma sessão, e o número máximo era 30. No caso de dez tentativas por sessão, para atingir o critério de aprendizagem o animal poderia cometer no máximo 1 erro em duas sessões consecutivas.

### **Fase de Testes**

Os sujeitos foram submetidos a duas fases de testes, cada uma delas composta por tarefas de discriminação entre dois estímulos, sendo cada estímulo um padrão de contraste. A dificuldade de discriminação aumentava a cada nova tarefa, até a apresentação do par que testaria o efeito de contraste simultâneo. A utilização de diferentes pares, nesse caso, foi de suma importância para assegurar que os animais aprendessem a generalizar que o alvo mais claro era onde havia o reforço, para que diante da tarefa 04 não houvesse confusão entre escolher o alvo ou o fundo.

#### **Fase I – Investigação do efeito de contraste simultâneo.**

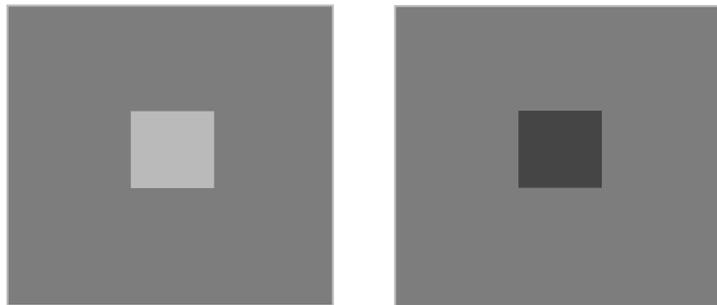
O estímulo era composto por um fundo, chamado também de pedestal, que exercia a função de compor o contexto da escolha e um quadrado central, chamado alvo. Foram utilizados 05 pares nos testes, conforme são apresentados abaixo.



Tarefa 01: O SD+ é a composição com o alvo branco. O pedestal é idêntico em ambos os lados, um cinza a 50%.



Tarefa 02: O SD+ é a composição com o alvo mais claro, um cinza 25%, contra um alvo cinza 75%. O pedestal é idêntico em ambos os lados, um cinza a 50%.



Tarefa 03: O SD+ é a composição com o alvo mais claro, um cinza 25% em um pedestal cinza 50% e o estímulo sem reforço é composto por um alvo preto e um pedestal cinza 25%.





Tarefa 04: O SD+ é a composição de um pedestal cinza 50% e um alvo branco e o estímulo sem reforço é composto por um alvo cinza 75% e um pedestal cinza 50%.



Tarefa “Contraste Simultâneo”: Nessa tarefa, os alvos são idênticos, cinzas 35%, com a diferença do pedestal, um cinza 50% e o outro cinza 25%. O efeito de contraste simultâneo torna a composição que apresenta o pedestal mais escuro o SD+, porque o alvo fica mais claro.

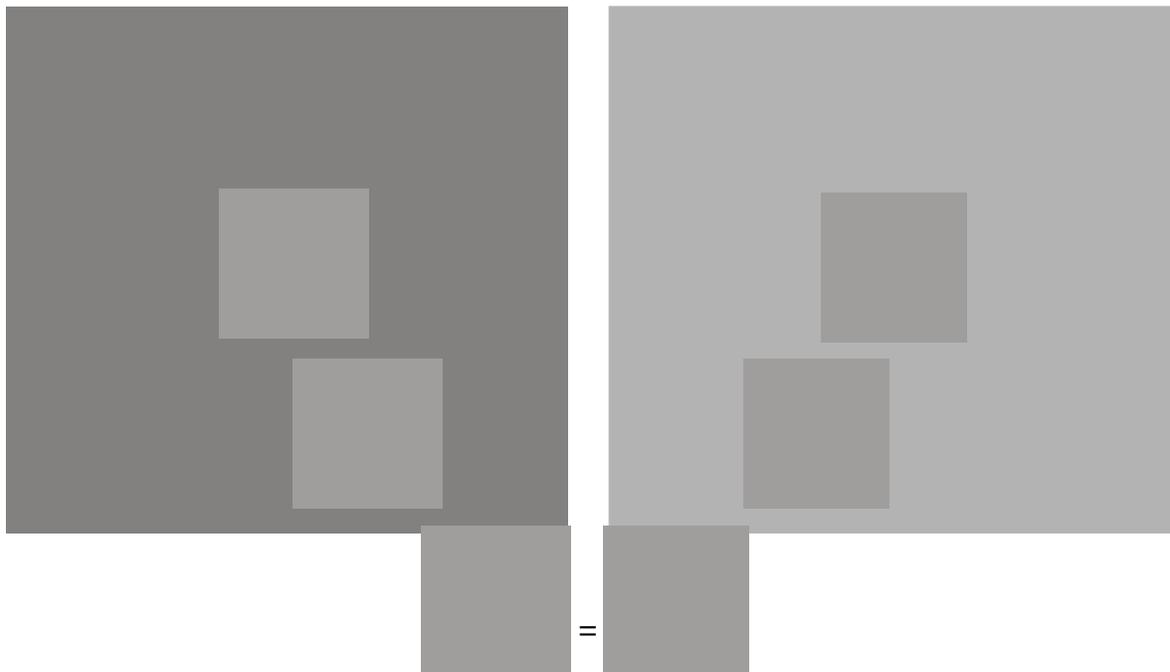


Figura 10. Par de estímulos utilizado nas tarefas de contraste simultâneo e de constância de brilho. Pode se observar, quando os pedestais são removidos, que os alvos são idênticos.



## Fase II – Investigação da Constância de Brilhos.

Nessa tarefa, para aumentar a incidência de luz sobre o SD-, foi utilizado um espelho para direcionar mais iluminação ao alvo desse estímulo, de forma que ele parecesse mais claro do que o anteriormente conhecido como SD +. (Figura 11)



Figura 11. Representação do par de estímulos utilizado nas tarefas de constância de brilho. Pode se observar, quando os pedestais são removidos, que os alvos não são idênticos. Nesse caso, fisicamente são idênticos, mas são aqui representados como aparecem quando a luz é adicionada.

Embora os dois alvos sejam idênticos um deles recebe mais luz, apresentando-se fisicamente mais claro do que o outro, conforme mostraram as medidas realizadas (Tabela 3). No caso dos animais não alterarem o desempenho, a identidade do objeto será mantida, o que indica que as características do papel não serão sobrepostas pela característica inserida, a luminosidade.



TABELA 3. REFLETÂNCIA DO ALVO SD- DA TAREFA DE CONSTÂNCIA DE BRILHO.

<b>Condição</b>	<b>Lux</b>	<b>Cd<sup>2</sup></b>
Sem o espelho	90	8
Com o espelho	200	15,8

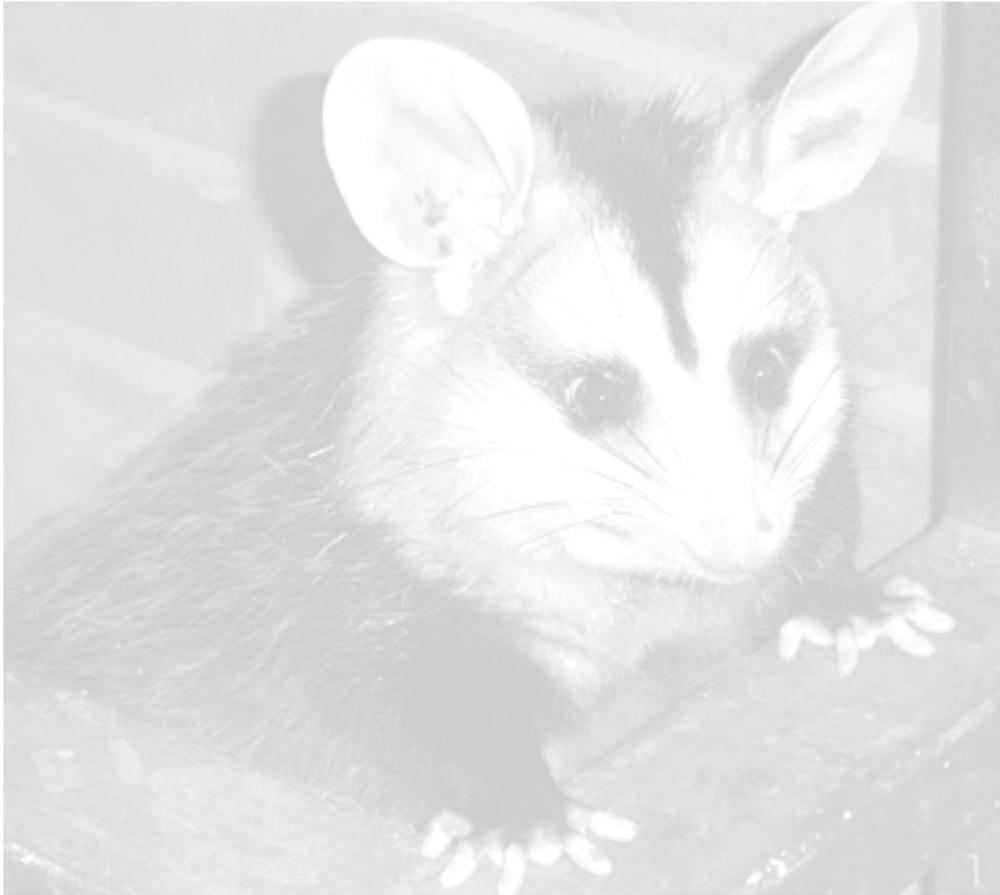
### **Análise dos dados**

O desempenho em cada tarefa foi comparado individualmente ao desempenho apresentado nas outras tarefas (Matos, 1990) e inter-sujeito, considerando-se o grupo de indivíduos e todas as tarefas.

Foram calculados os percentuais de acerto em cada sessão e então foi utilizado o teste binomial para construir os limites de confiança de 95% sobre o desempenho aleatório, baseado no número de tentativas do teste (Savage *et al*, 1987), o que quer dizer que, quando o animal cometia até 3 erros em duas sessões consecutivas de 30 tentativas cada, ele não estava mais realizando escolhas ao acaso, mas sim respondendo corretamente aos estímulos apresentados, o que o tornava apto a iniciar a próxima tarefa.

Os dados obtidos nas fases modelagem inicial e modelagem experimental foram comparados estatisticamente com objetivo de verificar se a forma de criação, ou seja, a proximidade diária com humanos desde filhotes ou uma criação com menos contato exerceria algum efeito na forma com que o animal respondeu aos testes.

Os dados obtidos em todas as tarefas foram comparados entre os sujeitos, com a finalidade de observar se o desempenho dos mesmos foi semelhante ou não.



## RESULTADOS



### **III. RESULTADOS**

Os testes foram iniciados com 08 animais, dos quais apenas 03 concluíram todas as etapas previstas no projeto. Dois indivíduos vieram a óbito no decorrer do período de coleta de dados, sendo uma fêmea e um macho (denominados Ratazana e Merry). Uma fêmea (chamada Miúda) precisou ser submetida a uma cirurgia e não teve condições de continuar e dois indivíduos não atingiram os critérios de aprendizagem dentro do período estipulado para tal, sendo que um deles superou a fase de modelagem experimental, mas não concluiu todas as etapas desse estudo.

Os dados obtidos na fase de Modelagem, especialmente em sua primeira etapa, mostram uma diferença entre os indivíduos que foram criados desde filhotes no zoológico de Brasília, quando comparados com os que foram recebidos já adultos para realização do experimento. Esses dois grupos foram analisados para verificar a existência de possíveis diferenças.

#### **3.1 Fase de Modelagem**

Os dados obtidos nas duas etapas dessa fase, nas quais participaram 08 indivíduos, são sumarizados na Tabela 04.



TABELA 04: NÚMERO DE SESSÕES E DE TENTATIVAS NECESSÁRIAS PARA QUE AS PRIMEIRAS FASES FOSSEM SUPERADAS DE ACORDO COM OS CRITÉRIOS DE APRENDIZAGEM.

Indivíduo	Número de Sessões para Concluir a tarefa.		
	Modelagem Inicial Nº de sessões	Modelagem experimental Sessões Tentativas	
Baleia*	1	10	290
Miúda*	2	18	289
Pereba*	2	10	235
Ratazana*	1	12	300
Dimmy*	2	12	300
Prima	+ 10**	--	--
Bull	5	15	319
Merry	4	10	292

\* Animais criados no zoológico de Brasília, \*\* Esse indivíduo não concluiu essa fase.

A fase de modelagem inicial foi concluída por 07 indivíduos, com no máximo 07 sessões compostas por dez tentativas cada. Um oitavo indivíduo, fêmea adulta (Prima), não chegou a participar dos testes seguintes uma vez que, após 10 sessões, não foi capaz de realizar essa fase, não saindo da câmara inicial mesmo após privação alimentar de 24 horas. (Figura 12).

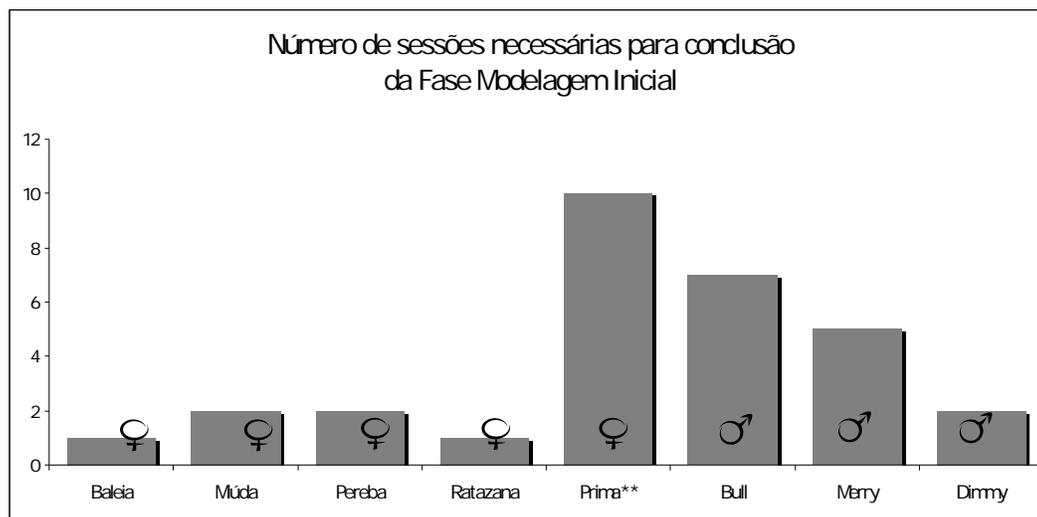


Figura 12. Representação gráfica do número de Sessões necessárias para que o animal atingisse o critério de aprendizagem na fase modelagem inicial.



A fase de modelagem experimental foi concluída por 6 indivíduos, com média de 12,4 sessões (290,8 tentativas) para os indivíduos criados no zoológico de Brasília e média de 14,5 sessões (337 tentativas) para os indivíduos recebidos já adultos para a realização dos testes (Figura 13).

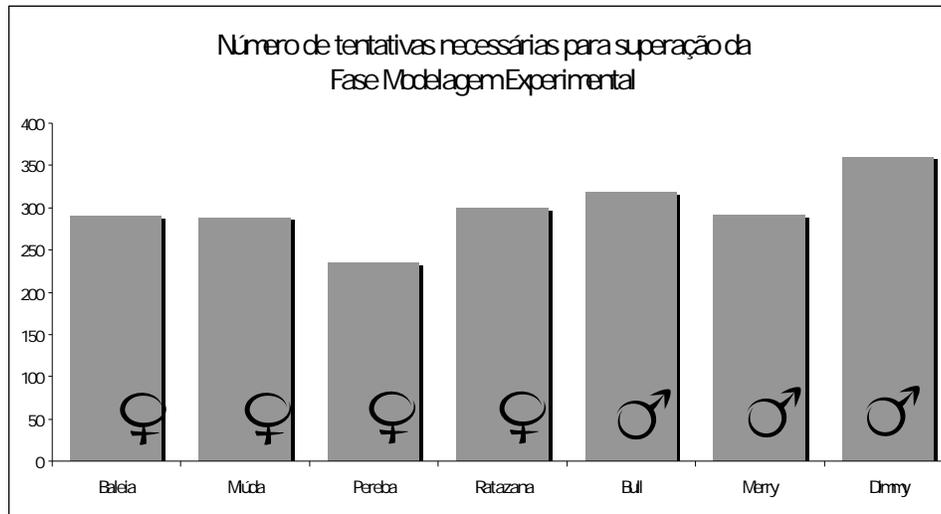


Figura 13. Número de tentativas necessárias para que o animal atingisse o critério de aprendizagem na fase modelagem experimental.

Durante os testes, foi possível observar que alguns dos indivíduos saíam da câmara inicial e seguiam diretamente para um dos lados, sem, no entanto, ter olhado antes de fazer a escolha. Assim que se aproximavam, porém, eles visualizavam o estímulo (figura 14) e cerca de 02 cm antes de tocá-lo retornavam e escolhiam o outro lado. Nesse caso, era permitido ao animal acessar o reforço do outro lado, pois as circunstâncias demonstravam que o animal havia seguido para um dos lados sem antes ter olhado para o mesmo, mas ao aproximar-se, detectava o estímulo e recuava, o que significa que o indivíduo já estava aparentemente relacionando o estímulo correto ao reforço.



Figura 14. Indivíduo pára diante do estímulo e o observa, sem tocá-lo, recuando e se dirigindo para o outro lado, que contém o estímulo correto.

Os dados obtidos na fase de Modelagem inicial para o grupo de animais criados no zoológico de Brasília e para os que foram recebidos já adultos foram comparados entre si por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney, com utilização do programa de análises estatísticas SPSS, que demonstrou uma variação significativa entre os dois grupos de animais, representada na Figura 15. Na modelagem experimental, o grupo de animais criados no zoológico de Brasília atingiu o critério de aprendizado em um número menor de tentativas, de acordo com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Essa diferença não foi significativa como na fase anterior (Figura 16).

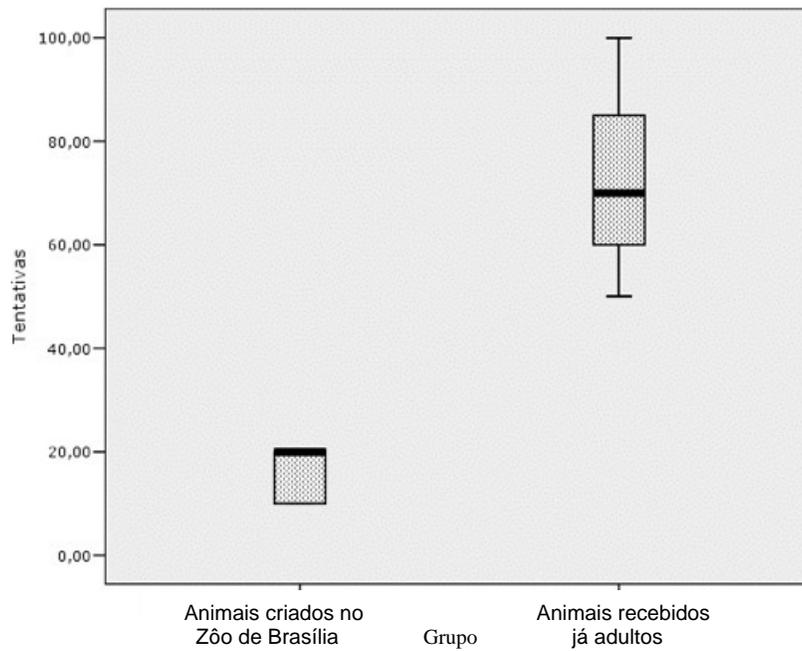


Figura 15. Desempenho dos indivíduos dos dois grupos no desenvolvimento da fase Modelagem Inicial com base no número de tentativas necessárias para conclusão da fase.

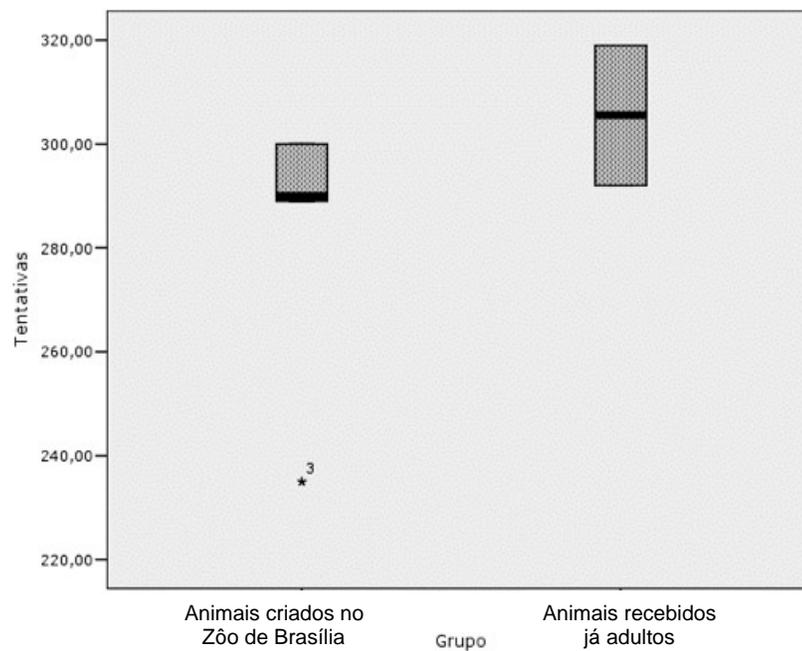


Figura 16. Desempenho dos indivíduos dos dois grupos no desenvolvimento da fase Modelagem Experimental com base no número de tentativas necessárias para conclusão da fase. (\*<sup>3</sup> Dados isolados dentro da amostra).



### 3.1 Fase de Testes

Esses testes foram realizados com três indivíduos, sendo duas fêmeas e um macho, cujos resultados são sumarizados na tabela 05 e apresentados na figuras 17, 18, 19 e 20.

Os indivíduos Pereba, Baleia e Bull foram capazes de distinguir os estímulos positivos e os resultados mostram uma similaridade no padrão de aprendizagem, evidenciada principalmente a partir da terceira tarefa, quando os animais passaram a generalizar o alvo mais claro como sendo o reforçador positivo, alcançando o critério de aprendizado em até 04 sessões. (Tabela 05).

Esse desempenho se manteve na tarefa em que os dois alvos eram idênticos, sobre pedestais diferentes, o que indica que esses animais apresentam o efeito de contraste simultâneo, pois embora os dois alvos fossem idênticos, a composição do mesmo com o fundo fez com que os três indivíduos mantivessem sua escolha no que lhes parecia mais claro. Da mesma forma, o desempenho se manteve quando a luminosidade sobre o SD- foi aumentada com a utilização de um espelho para direcionar mais luz e assim criar a situação física de um alvo mais claro do que o outro. Desta maneira, os resultados mostram que, mesmo com o aumento de brilho sobre um dos estímulos, não houve alteração na resposta dos animais. Nesta situação, ocorre incremento homogêneo da intensidade luminosa do conjunto alvo e máscara, mas a relação perceptual permanece, demonstrando assim que, nessas condições, os três indivíduos apresentaram constância de brilho.

Os resultados obtidos para esses três animais foram comparados estatisticamente pelo teste ANOVA de Kruskal-Wallis, com 95% de confiabilidade, que demonstrou não haver diferença significativa quando comparado o desempenho de cada animal nas tarefas.



TABELA 05. NÚMERO DE SESSÕES NECESSÁRIAS EM CADA TAREFA PARA QUE O CRITÉRIO DE APRENDIZADO FOSSE ATINGIDO PELOS INDIVÍDUOS BALEIA, PEREBA E BULL.

Número de sessões necessárias em cada tarefa						
	Tarefa 01	Tarefa 02	Tarefa 03	Tarefa 04	Contraste Simultâneo	Constância de Brilhos
Baleia	8	9	3	3	4	4
Pereba	21	3	3	2	4	4
Bull	6	3	3	2	3	3

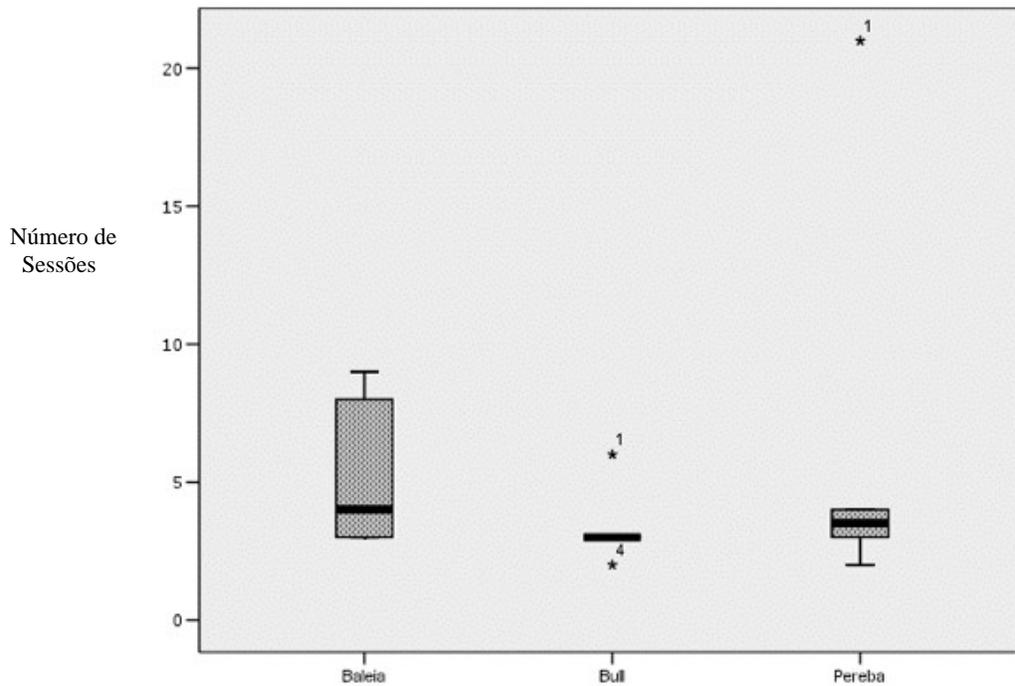


Figura 17. Desempenho dos três indivíduos nas 06 tarefas de discriminação visual para verificação dos efeitos de Contraste Simultâneo e Constância de Brilho. (\*,<sup>1,4</sup> Dados isolados na amostra)

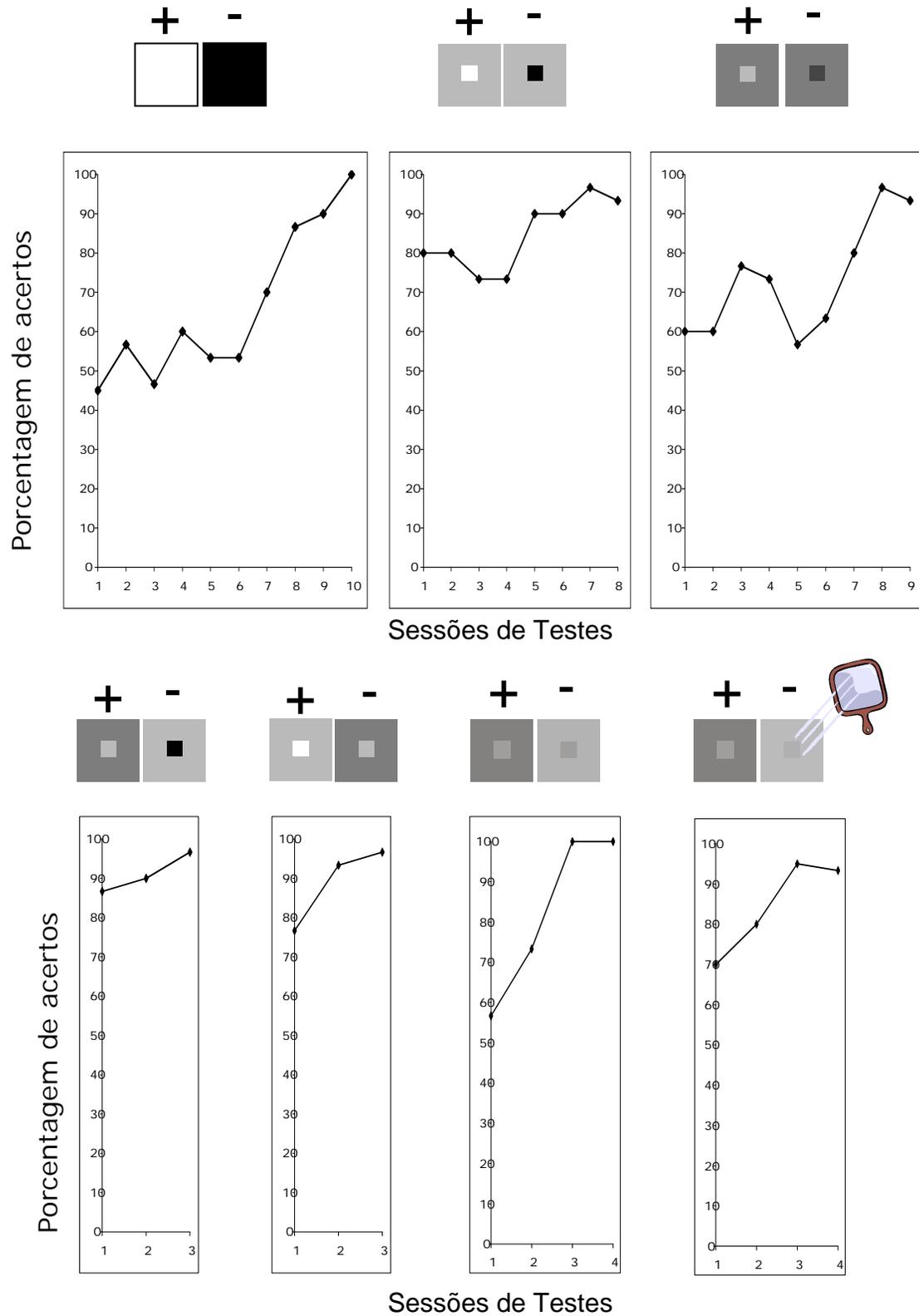


Figura 17. Desempenho da fêmea Baleia nos testes discriminativos para investigação do efeito de contraste simultâneo.

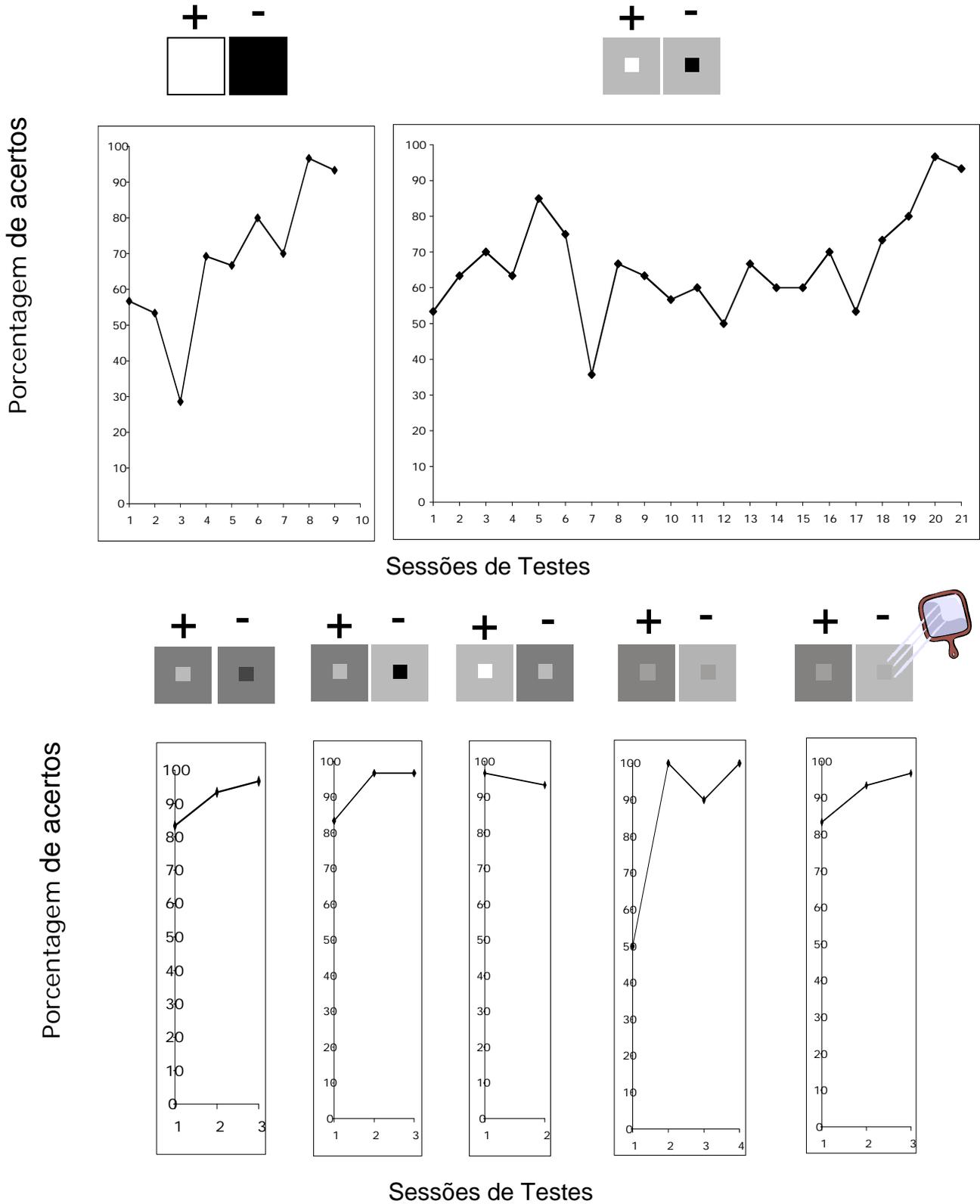


Figura 18. Desempenho da fêmea Pereba nos testes discriminativos para investigação do efeito de contraste simultâneo e da presença de constancia de Brilhos.

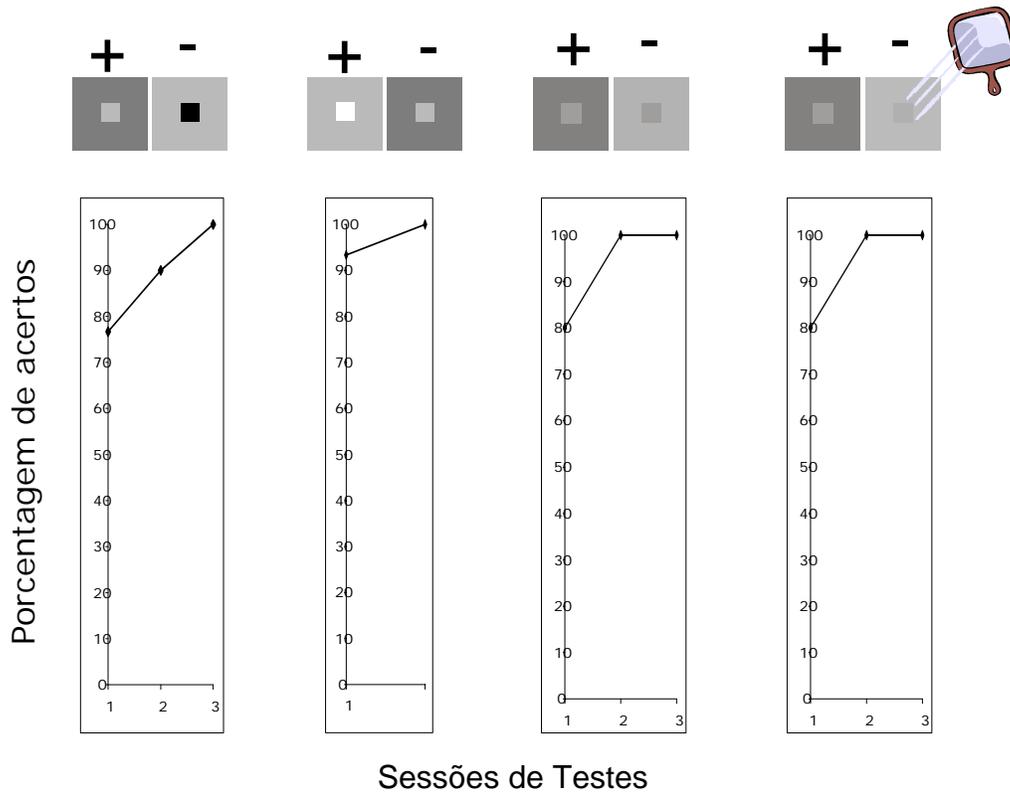
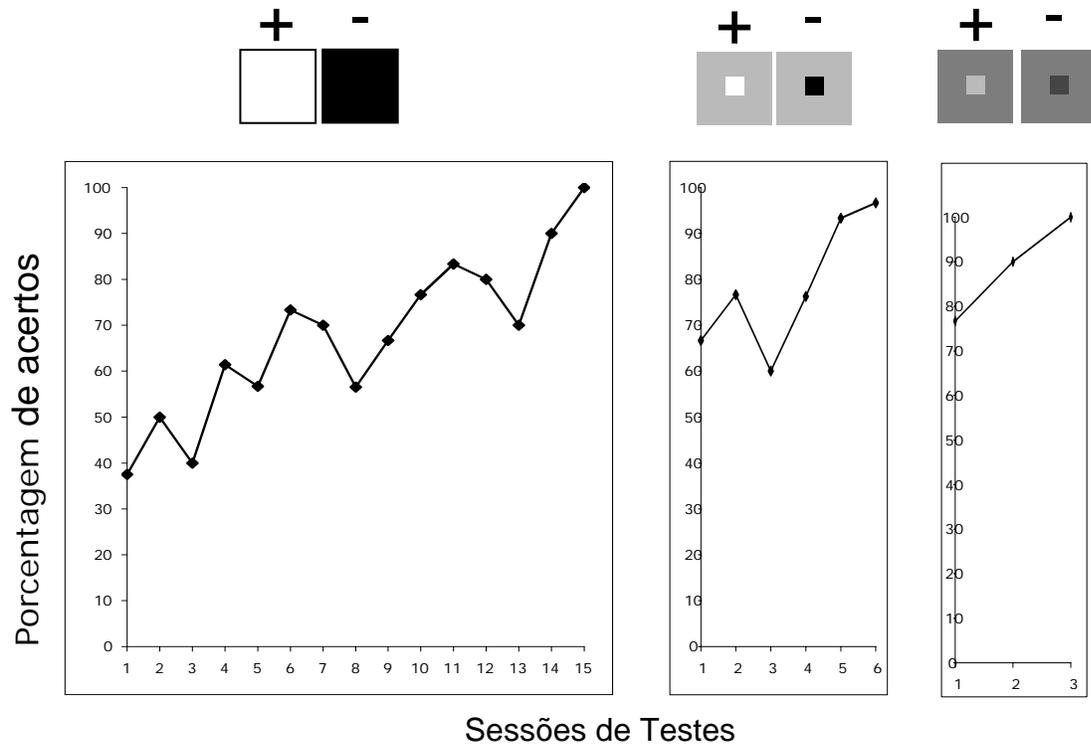
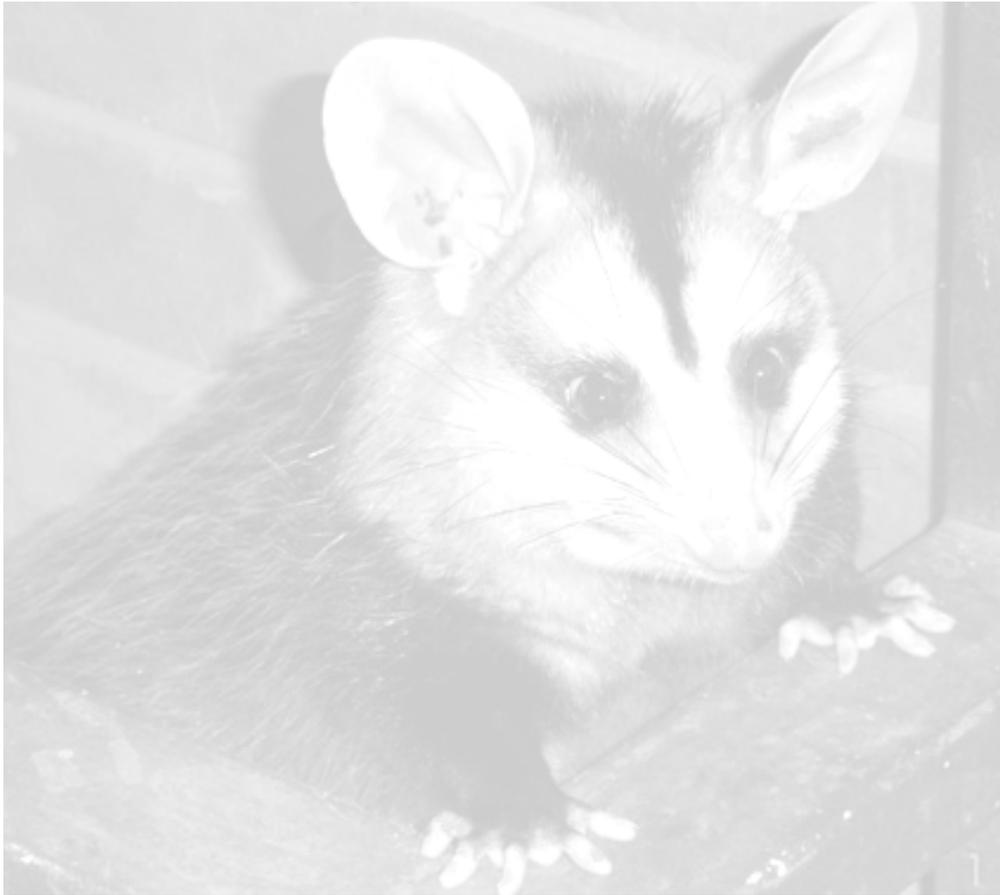


Figura 19. Desempenho do macho Bull nos testes discriminativos para investigação do efeito de contraste simultâneo e da presença de constância de Brilhos.



## DISCUSSÃO



#### IV. DISCUSSÃO

Um importante fator acerca da utilização dos gambás no desenvolvimento de projetos de pesquisa comportamental é o curto tempo de vida que a espécie apresenta. Dessa forma, os estudos com essa espécie devem, preferencialmente, ser iniciados com indivíduos jovens, com até um ano de idade, para que seja possível prosseguir com o mesmo animal o tempo necessário para a coleta de dados.

No caso do presente estudo, a idade dos animais que inicialmente compunham a amostra foi um fator limitante ao final, pois dois dos mesmos vieram a óbito no decorrer do projeto e um terceiro indivíduo foi retirado da pesquisa pela necessidade de uma intervenção cirúrgica.

De maneira geral, os animais mantidos em cativeiro com a finalidade do desenvolvimento de estudos, são tratados como partes de uma amostra, cujo tratamento deve ser o mais neutro possível, especialmente em estudos de análise experimental do comportamento e naqueles que trabalham com medidas puramente fisiológicas. Nesse caso, no entanto, foi observado que os animais criados com maior proximidade com as pessoas responsáveis pelos mesmos (Indivíduos: Miúda, Pereba, Ratazana, Dimmy e Baleia) apresentaram melhor desempenho na fase de adaptação ao aparato e modelagem inicial. Aqueles animais que não receberam cuidados tão intensos desde filhotes (Indivíduos: Bull, Prima e Merry) demoraram mais para superar a referida fase. Nas fases subsequentes, a diferença entre o desempenho de todos animais não foi significativamente diferente, no entanto, não se pode afirmar que a mesma diferença não teria sido observada se todos os animais tivessem concluído todas as tarefas. Foi possível observar, então, o reflexo da maneira como os animais foram criados, desde filhotes, embora essa análise não fosse



inicialmente objetivo do estudo. Esses resultados demonstram que a utilização de testes de discriminação visual podem ser realizados não apenas para o conhecimento do sistema visual, mas também na investigação de estratégias comportamentais, como o aprendizado. Em análise experimental do comportamento, grande parte dos estudos é realizada com tarefas de discriminação visual, que podem ser mais ou menos complexas, de acordo com o que se pretende estudar. Tais estudos não medem a funcionalidade do sistema visual, mas dependem do mesmo como ferramenta na mensuração de padrões de comportamento. Booney & Wynne (2002) estudaram estratégias de aprendizagem no *Sminthopsis crassicaudata*, um pequeno marsupial australiano, observando que o mesmo apresenta estratégias que implicam na sua adaptação ao ambiente, onde atua como presa e predador, sendo assim, necessita de uma capacidade de aprendizado que o permita responder adequadamente a diferentes estímulos e situações. Esse importante aspecto biológico e comportamental pôde ser esclarecido com a utilização de testes de discriminação visual, demonstrando assim o quanto tais testes podem revelar acerca da biologia de alguns animais.

O efeito de contraste simultâneo está relacionado, possivelmente, à identificação de objetos inseridos em um contexto, que no caso desses animais pode ser um facilitador para que os mesmos encontrem alguns de seus itens alimentares, como insetos que ficam geralmente em meio às folhas no substrato e na vegetação. Já a constância de brilho, é importante para a identificação precisa do ambiente e de suas particularidades nas diferentes condições de luminosidade nas quais esses animais desenvolvem suas atividades vitais, já que o mesmo apresenta hábitos crepusculares e noturnos, períodos em que há oscilação na luminosidade de acordo com o horário, com as condições climáticas e com a presença ou não da lua. Um pequeno marsupial australiano de hábitos crepusculares, o



*Tarsipes rostratus*, apresentou diferença na capacidade de distinguir estímulos acromáticos de diferentes frequências espaciais em situações cuja luminosidade natural variava, apresentando os melhores resultados quando na luz do dia e menor desempenho, no entanto semelhantes quando comparados entre si, para noites de lua cheia e noites sem luar (Arrese et al, 2001).

O período de maior atividade para o gambá *Didelphis marsupialis* está justamente na faixa de horário em que a iluminação é restrita à presença da lua e às estrelas, entre 22:00h. e 8:00h. (Rocco, 1969). Sendo assim, é importante que o mesmo apresente capacidade de discriminação visual em situações de diferente luminosidade, contrariando a suposição de que o sistema visual de animais de hábitos noturnos e crepusculares apresente menor contribuição na percepção do ambiente. Estudos com espécies de hábitos noturnos mostram que as informações visuais não são apenas complementares ao sistema sensorial, representando uma ferramenta fundamental para o reconhecimento do ambiente. A análise de células ganglionares na retina de lobos (*Canis lupus*) demonstra que esses animais possuem boa acuidade visual (Peichl, 1992), assim como morcegos (Pettigrew, 1988) e suindaras (Wathey & Pettigrew, 1989), todos de hábitos noturnos.

A sensibilidade ao contraste foi medida comportamentalmente em gatos domésticos com a utilização de estímulos acromáticos compostos por grades sinusoidais, que consistem em um conjunto de traços de contraste variável e que podem ser apresentados em diferentes orientações (Campbell et al, 1973). Os resultados foram comparados aos obtidos em testes semelhantes com humanos, demonstrando diferenças entre os mesmos, o que não indica que o sistema visual do gato seja inferior ao do humano, mas sim diferente. O gato apresentou melhor desempenho para baixas frequências espaciais, mas quando se analisa a sensibilidade ao contraste o homem apresentou melhores resultados. (Bisti & Maffei,



1973). Muitos são os fatores que podem estar relacionados à essa variação, entre eles o período de maior atividade, diurno no caso do ser humano e noturno no caso do gato.

Muitas espécies apresentam diferenças nas características visuais entre os machos e as fêmeas, como é o caso de alguns primatas do Novo Mundo, que apresentam dimorfismo sexual quanto à presença de tricromatismo (Jacobs, 2007) . Essas diferenças ocorrem também entre os invertebrados, os machos de *Eristalis tenax*, uma espécie de mosca, apresentam uma zona brilhante nos olhos que não é presente nas fêmeas. Tal área está relacionada à maior sensibilidade ao contraste que esse gênero apresenta em relação às fêmeas, conforme pôde ser observado em estudo comportamental que utilizou estímulos acromáticos. Padrões distintos no voo de machos e fêmeas são indícios de que a variação visual está relacionada ao comportamento específico de cada sexo no caso dessa espécie. (Straw et al, 2006).

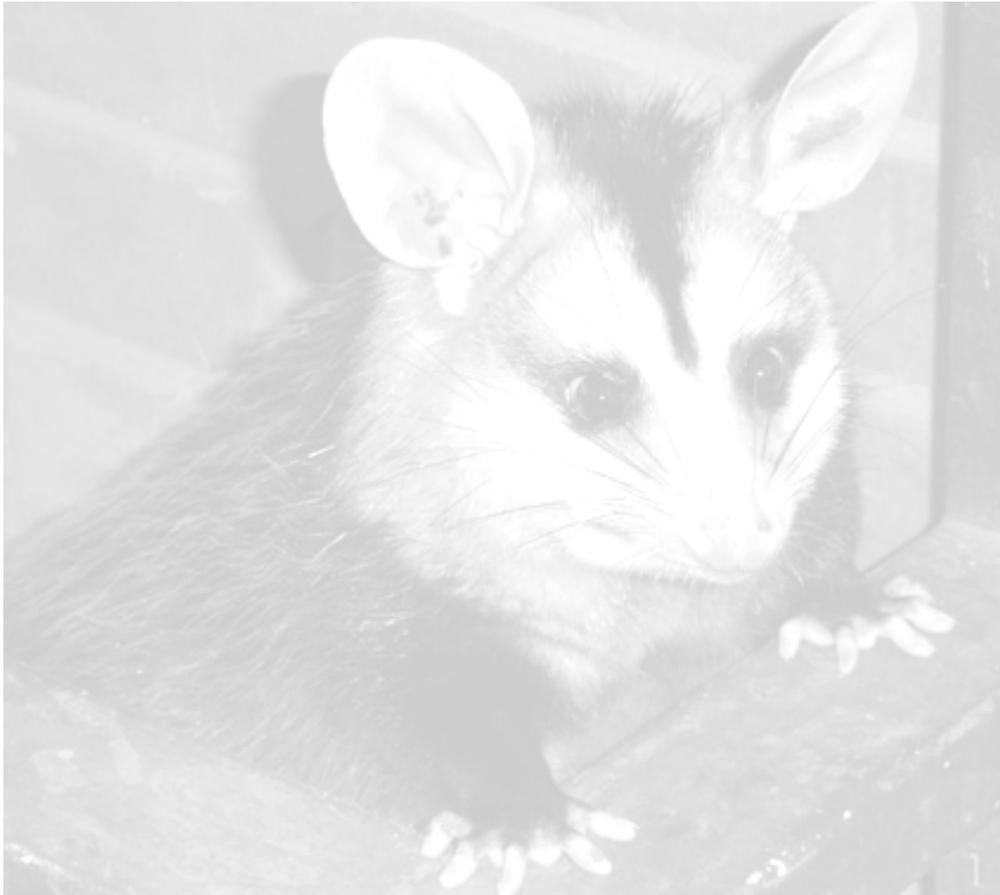
O presente estudo não apresentou diferença entre os resultados apresentados pelos três indivíduos, o que sugere que esse fenômeno possa ser comum aos dois sexos, no entanto são necessários mais estudos que investiguem se há dimorfismo sexual quanto à presença desses aspectos.

O gambá apresenta coloração semelhante em machos e fêmeas, sendo o olfato o sentido mais envolvido no processo de corte e acasalamento (Rossi *et al*, 2006), o que leva a dedução de que não haveria diferença no sistema visual entre os sexos com a finalidade de auxiliar no processo de reconhecimento entre os animais para a reprodução. Além disso, ambos desempenham tarefas semelhantes, já que são animais solitários e que o macho não permanece com a fêmea para os cuidados com a prole. Sendo assim, tanto machos quanto fêmeas parecem necessitar da mesma capacidade visual para a sobrevivência, evidência



etológica que corrobora o fato de não ter havido diferença no desempenho entre os sexos nesse estudo.

O resultado obtido pelos três animais que concluíram todas as etapas mostra que o efeito de contraste simultâneo é presente nesses animais, assim como a constância de luminosidade. Embora os mecanismos e o funcionamento desses dois fenômenos visuais não estejam completamente esclarecidos, as teorias propõem que trata-se de um processo visual que envolve a retina e o cérebro. Dessa forma, a presença desses efeitos sugere que esses animais possuem um complexo sistema de percepção visual semelhante ao de outros mamíferos, como os primatas, inclusive os humanos. Tal dado torna ainda mais importante o estudo de mais aspectos da visão nesses animais, já que os mesmos apresentam particularidades que os torna uma espécie de elo entre os primeiros mamíferos e as espécies hoje viventes. Então, conhecer o funcionamento e as características do sistema visual do gambá pode auxiliar no entendimento de uma série de fenômenos ainda não esclarecidos da visão de mamíferos.

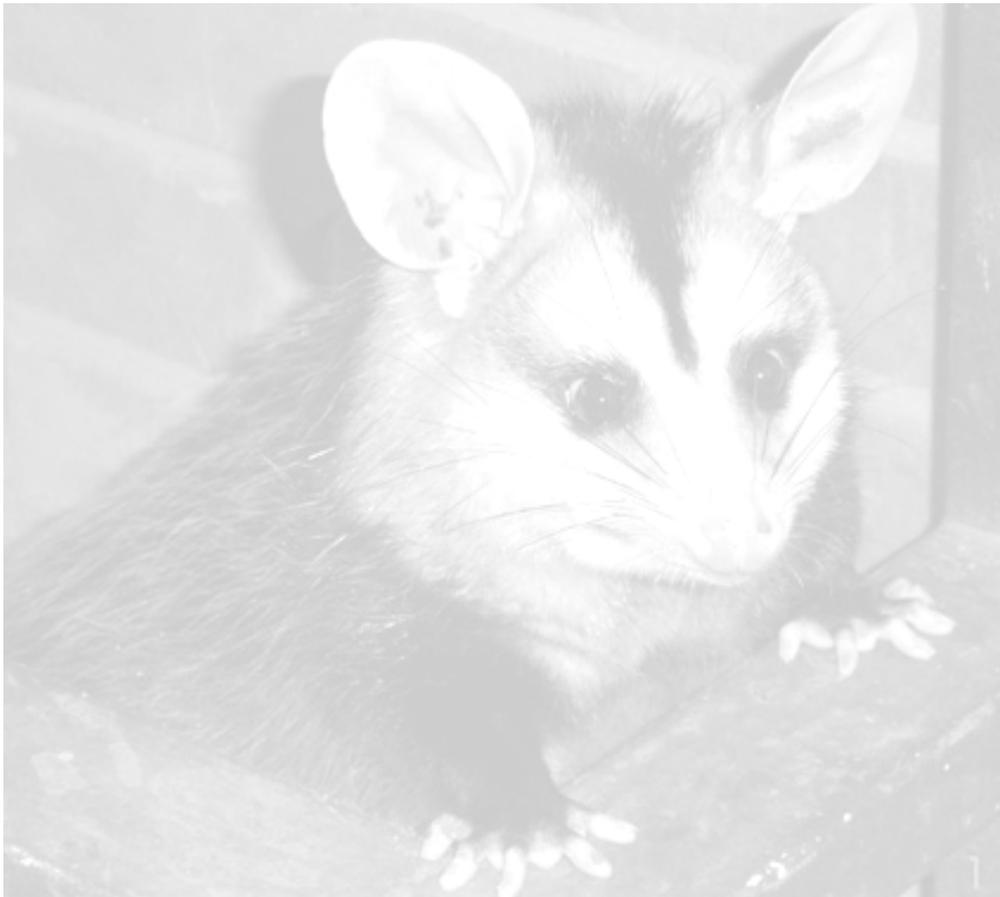


## CONCLUSÃO



## V. CONCLUSÕES

- Quanto maior a proximidade dos filhotes com humanos e a adaptação dos mesmos com a manipulação diária, mais rápido os mesmos aprendem a responder a tarefas simples dentro do aparato para discriminação visual.
- Frente a estímulos acromáticos e sob iluminação constante o gambá apresenta o efeito de contraste simultâneo e possui constância de brilhos.



## REFERÊNCIAS



## V.I REFERÊNCIAS

Ahnelt, P.; Hokoç, J.N. & Rohlich, P. (1995). Photoreceptors in a primitive mammal, the South American opossum, *Didelphis marsupialis aurita*: Characterization with anti-opsin immunolabeling. *Vis. Neurosci.*, 12: 793-804

Arrese, C.A.; Archer, M. & Beazley, L.D. (2002). Visual capabilities in a crepuscular marsupial, the honey possum (*Tarsipes rostratus*): a visual approach to ecology. *J. Zoo. Lond*, 256:151-158.

Arrese, C.A.; Hart N.S.; Thomas, N.; Beazley L.D. & Shand, J. (2002). Trichromacy in Australian Marsupials. *Curr. Biol.*, 12: 675-660.

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 (*Isodon obesulus*). *Proc. Biol. Sci.*, 272 (1565): 791-796.

Arrese, C.A.; Beazley, L.D. & Neumeyer, C. (2006). Behavioural evidence for marsupial trichromacy, *Curr. Biol.*, 16: 193-194.

Bisti, S. & Maffei, L. (1973). Behavioural contrast sensitivity of the cat in various visual meridians. *J. Physiol.* 241: 201-210.

Bonney, K.R. & Wynne, C.D.L. (2002). Visual discrimination learning and strategy behavior in the fat-tailed dunnart (*Sminthopsis crassicaudata*). *Journ. Comp. Psychol.*, 116:56-62.

Cáceres, N.C. & Monteiro Filho, E.L.A. (1990). Tamanho Corporal Em Populações Naturais de *Didelphis* (Mammalia: Marsupialia) do Sul do Brasil. *Rev. Bras. Biol.* 59: . 461-463.



Campbell, F.W., Maffei, L & Piccolino, M. (1973). The contrast sensitivity of the cat. *J. Physiol.*, 229: 719-131.

Couto, Carlos P. (1953). *Paleontologia Brasileira* (Mamíferos). Ministério da Educação e Saúde, Instituto Nacional do Livro, Rio de Janeiro. XIV. 516p.

Couto, Carlos P. (1979). Infraclasse Metatheria, in *Tratado de paleomastozoologia*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro. 79 -121. 590p.

Cunha, D.C.F; Hokoç, J.N.; Dantas, A.M.; Moraes Junior, H.V & Moraes, A.M.M. (2006). Estudo eletroretinográfico de visão cromática. *Arq. Bras. de Oftal.*, 69(6): 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. *Mol. Biol. Evol.*10: 1642-1649.

Delciello, A.; Loreto, D & Antunes, V. (2006). Marsupiais na mata atlântica. *Ciência Hoje*. 38: 66-69.

Eisenberg, J.F.; Redfort, K.H. (1999). *Mammals of the Neotropics* (Ecuador, Peru, Bolívia, Brazil). Chicago, London: The University of Chicago Press, 609p.

Emmons, Louise H.; Feer, François. (1990) *Neotropical Rainforest Mammals: A field Guide*. Chicago, London: The University of Chicago Press. 11-16.

Fonseca, G.A; Herrmann, G.; Leite, Y.L.; Mittermeier, R.A.; Rylands, A.B; Patton, J.L. (1996). Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil. *Ocas. Pap.: Conserv. Biology*, 4: 1-38.

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. *J. Genetic Psychol.* 42: 206-208.



Hemmi, J.M. (1999). Dichromatic colour vision in an Australian marsupial, the tammar wallaby. *J. Comp. Physiol.*, 185: 509-515.

Hering, E. (1964). Outlines of a theory of the light sense. Cambridge: Harvard University Press (Originalmente publicado em 1874).

Herman, K.G. & Steinberg, R.H. (1982). Phagosome movement and the diurnal pattern of phagocytosis in the tapetal retinal epithelium of the opossum. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 23:277-290.

Hokoç JN, Oswaldo-Cruz E. (1978) Quantitative analysis of the opossum's optic nerve: an electron microscope study. *J. Comp. Neurol.* 178:773-782.

Hokoç, J.N. & Oswaldo-Cruz, E. (1979) A regional specialization in the opossum's retina. A quantitative analysis of the ganglion cell layer. *J. Comp. Neurol.* 183:385-396.

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.

IUCN. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. (2006). IUCN Red List of Threatened species. Disponível em <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em 05 de Maio de 2007.

Jacobs, G. H.; Deegan, J. F. (1992). Cone photopigments in nocturnal and diurnal procyonids. *Journal of Comparative Physiology*, 171 (3): 351-358.

Jacobs, G.H. (1993) The distribution and nature of colour vision among the marsupials. *Biol. Rev.*, 12: 314-471.

Jacobs, G.H. (2007). New world monkeys and color. *Intern. J. of Primatol.* 28: 729-759



- Katz, D. (1935). *The world of colour*. Londres: Kegan Paul, Trench, Trubner & Co.
- Kelber, Almut & Roth, Lina. (2006) Nocturnal colour vision – not as rare as we might think. *The J. of Experim. Biol.*, 209: 781-788.
- 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*). *Vis. Res.*, 25: 1207-1221.
- Land, E. (1977) The retinex theory of color vision. *Scient. Amer.* 237:108-128.
- Lange, R.B.; Jablonski, E. (1998). Mammalia do Estado do Paraná, Marsupialia. *Est. de Biol.*, 43: 15-224.
- Lemos, B & Cerqueira, R. (2002) Morfological differentiation in the white-eared opossum group (Didelphidae:Didelphis). *J. of Mammal.*, 83: 354-369.
- Markus, R.P., Barbosa Junior, E.J.M & Ferreira, Z.S. (2003). Ritmos Biológicos: entendendo as horas, os dias e as estações do ano. *Einstein* 1:143-148.
- Matos, Maria Amélia. (1990) Controle experimental e controle estatístico: a filosofia do caso único na pesquisa comportamental. *Rev. da Soc. Bras. para o Prog. da Ciência: Ciência e Cultura.* 42: 585-592.
- Nowak, Ronald M. (1991). *Walker's mammals of the world*. 5th ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press. vol. I.
- Oswaldo-Cruz, E.; Hokoç, J.N. & Sousa, A.P.B. (1979). A schematic eye for the opossum. *Vis. Res.*, 19: 263-278.



Peichl, L. (1992). Topography of gânglio cells in the dog and wolf retina. *J. Comp. Neurol.* 324: 603-620.

Pettigrew, J.D., Dreher, B., Hopkins, C.S., McCall, M.J. & Brown, M. (1988). Peak density and distribution of ganglio cells in the retinae of microchiropteran bats: implications for visual acuity. *Brain Behav. Evol.*, 32: 39-56.

Rossi, Rogério Vieira; Bianconi, Gledson Vigiano; Pedro, Wagner André. (2006) Ordem Didelphimorphia (27-69). In: Reis, Nélio R.; Peracchi, Adriano L.; Pedro, Wagner A & LIMA, Isaac P. (eds) Mamíferos do Brasil. Londrina, Paraná: Universidade Estadual de Londrina. 437p.

Sabra, A. Sensation and inference in Alhazen's theory of visual perception. Em P. Machamer & R. Turnbull (Orgs.), *Studies in Perception: Interrelations in the history of Philosophy and Science*. 160-161.

Samoto, V.Y; Miglino, M.A.; Ambrósio, C.E; Pereira, F.T.; Lima, M.C. & Carvalho, A.F. Morfologia da Glândula Mamária de Gambás da espécie *Didelphis* sp associada ao modelo marsupial. *Biota Neotropica*. V.6, n.2. Disponível <[www.biotaneotropica.org.br/v6n2/pt/abstract?article+bn01306022006](http://www.biotaneotropica.org.br/v6n2/pt/abstract?article+bn01306022006)>. Acesso em 02 de Março de 2007.

Santos, N.A. & Simas, M.L.B. Função de Sensibilidade ao Contraste: Indicador da Percepção Visual da Forma e da Resolução Espacial. *Psicologia: Reflexão e Critica*, 14:03. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 589-597.

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 Primatol.*, 49: 57-69.



Silveira, L.C.T.; Piçano-Diniz, C.W. & Oswaldo-Cruz, E. (1982). Contrast sensitivity function and visual acuity of the opossum. *Vis. Res.*, 22: 1371-1377.

Spillmann, L. & Werner, J. (1996). Longe-range interactions in visual perception. *Trends in Neuroscience*, 19:428-434.

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. *Vis. Neurosc.*, 21: 223-229.

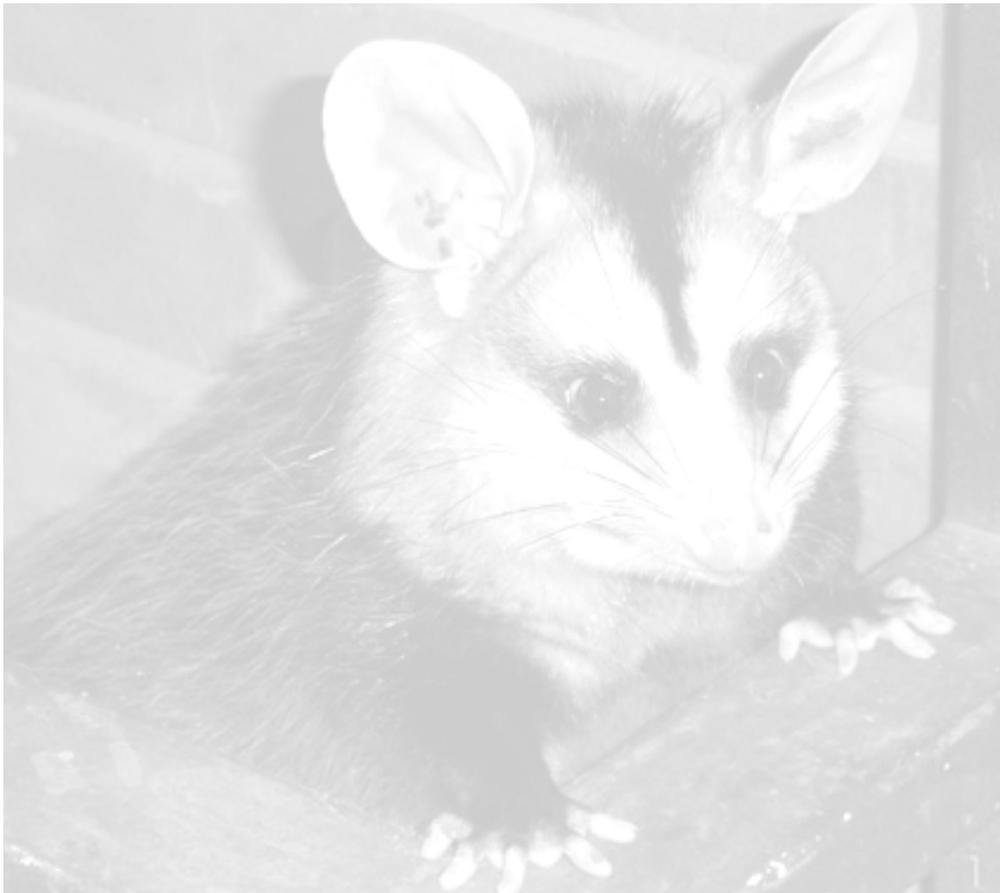
Straw, A.D., Warrant, E.J & O'Carroll, D.C. (2006). A 'bright zone' in male hoverfly (*Eristalis tenax*) eyes and associated faster motion detection and increased contrast sensitivity. *The J. of Exper. Biol.* 209: 4339-4354

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 J. of Experim. Biol.*, 208: 1803-1815.

Volchan, E., Hokoç, J.N., Bernardes, R.F & Rocha-Miranda, C.E. (1985). Retinal magnification factor. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 18:633.

Voss, R. S.; Jansa, S.A. (2003). Phylogenetic studies on didelphid marsupials II. Nonmolecular data and new IRBP sequences: separate and combined analyses of didelphine relationships with denser táxon sampling. *Bull. of the Amer. Mus. of Nat. Hist.*, 276: 1-82.

Wathey, J.C & Pettgrew, J.D. (1989). Quantitative analysis of the retinal ganglion cells layer of the barn owl *Tyto alba*. *Brain Behav. Evol.* 33(5): 279-292.



## ANEXOS



**ANEXO I**

Folha de Registros

Data: \_\_/\_\_/2007

Início: \_\_:\_\_

Término: \_\_:\_\_

Sujeito: \_\_\_\_\_

Tarefa: X

SD+ \_\_\_\_\_

Experimentador \_\_\_\_\_

Temperatura: \_\_\_\_\_

Nº T.	SD+	A	E	Observações
1	D			
2	E			
3	E			
4	D			
5	E			
6	D			
7	E			
8	E			
9	D			
10	D			
11	D			
12	E			
13	D			
14	E			
15	D			
16	E			
17	D			
18	E			
19	E			
20	D			
21	D			
22	D			
23	E			
24	E			
25	D			
26	E			
27	E			
28	D			
29	E			
30	D			



ANEXO II – Declaração do Comitê de Ética no Uso Animal.