

Entre cobras, lagartos e genomas: o uso de sequências de DNA na reconstrução de filogenias para rastreamento de atributos funcionais

RESUMO

A Evolução é o princípio unificador das ciências naturais e sua compreensão é essencial para a organização do conhecimento biológico adquirido por estudantes. Entretanto, este assunto é frequentemente ensinado de forma ineficaz e diversos alunos tem problemas em compreender conceitos evolutivos e, por sua vez, em interpretar cladogramas. Uma vez que a genética molecular se tornou uma rica fonte de informações evolutivas e é a principal ferramenta para a reconstrução de filogenias na Biologia, este trabalho utilizou sequências de DNA disponíveis em bancos de dados públicos e ferramentas de bioinformática de livre acesso para a reconstrução de um cladograma para se rastrear atributos ecofisiológicos na história evolutiva de espécies de lagartos e serpentes da fauna brasileira. As análises filogenéticas empregadas foram baseadas em um fragmento de 530 pares de bases do gene mitocondrial Citocromo B (CytB). Em seguida, os atributos ecológicos compartilhados (ou exclusivos) às espécies investigadas foram rastreados, como estratégia reprodutiva (viviparidade/oviparidade) e presença ou ausência de veneno. Os resultados gerados fornecem alicerces teóricos para enfatizar a aplicação prática do significado e importância de se interpretar uma árvore filogenética, pavimentando discussões para suprir falhas no ensino de Biologia, que em geral não dedica muito tempo a tópicos de macroevolução (e.g., sistemática filogenética), o que gera barreiras para o entendimento dos mecanismos evolutivos. Neste trabalho, discute-se a importância de assimilar e entender os processos e mecanismos de evolução que sustentam a biodiversidade, que depende direta ou indiretamente do conhecimento sobre as relações de parentesco entre as espécies. Por fim, são sugeridas ações pedagógicas para desmembrar a complexa rede de interações entre espécies, ambientes e atributos ecológicos que compõe a imensa biodiversidade brasileira.

PALAVRAS-CHAVE: Evolução. Cladogramas. Squamata.

Rodrigo de Mello
[0000-0001-8367-3769](tel:0000-0001-8367-3769)
rdemellobr@gmail.com
Universidade Estadual de Maringá,
Maringá, Paraná, Brasil.

Bruno Reis de Almeida Rodrigues
[0000-0003-4062-4603](tel:0000-0003-4062-4603)
reisbruno.bio@gmail.com
Universidade Católica de Brasília, Brasília,
Brasil.

INTRODUÇÃO

Qualquer pessoa, ao ser solicitada que descreva uma serpente, provavelmente dirá que estes animais têm o corpo alongado, coberto de escamas e que não possuem membros locomotores. Mas essas informações são suficientes para caracterizar uma serpente? A resposta é um não zoológicamente categórico, pois existe um grande número de lagartos ápodes (i.e., sem membros locomotores). No Brasil, por exemplo, pode-se citar a cobra-de-vidro (*Ophiodes striatus*) como um animal com estas características, que apesar do nome e da aparente semelhança com uma serpente, é um lagarto da família Diploglossidae. Já em serpentes é possível verificar em algumas espécies, como na sucuri (gênero *Eunectes*), a presença de esporões, que são membros vestigiais. Ainda, há diversos lagartos de corpos serpentiformes e membros locomotores reduzidos, como muitas espécies agrupadas nas famílias Gymnophthalmidae e Scincidae. Da mesma forma, mesmo compartilhando semelhanças morfológicas como a cauda arredondada com o mesmo formato da cabeça, as cecílias e as anfisbenas, que são popularmente chamados no Brasil, respectivamente, como cobras-cegas e cobras-de-duas-cabeças, pertencem a grupos taxonômicos muito distintos. Enquanto as anfisbenas são répteis escamados da classe Reptilia (ordem Squamata), as cecílias são pertencentes à classe Amphibia (ordem Gymnophiona). Estes animais, portanto, são exemplos de linhagens que sofreram evolução convergente em relação ao formato corporal, um processo que foi moldado pelos seus respectivos habitats e seus modos de vida.

Todos os lagartos, anfisbenas e serpentes que existem atualmente são répteis escamados designados taxonomicamente como Squamata, e suas similaridades morfológicas automaticamente podem apontar uma relação evolutiva muito próxima. Quanto à origem destes animais, as serpentes evoluíram a partir de um ancestral semelhante a um lagarto, e não o contrário. Tal constatação é possível devido a inúmeras evidências paleontológicas, morfológicas e filogenéticas (PIANKA; VITT, 2003). Infelizmente, este contexto evolutivo de histórias de vida e o compartilhamento (ou exclusividade) de características não são intuitivos para a maioria das pessoas, o que gera percepções limitadas sobre a origem e a diversificação da biodiversidade. É um indício claro de como a educação básica trabalha de forma superficial (ou mesmo errônea) com muitos conteúdos relevantes da grade curricular. Como atestado por Mendes, Rizzo e Mayrinck (2022), que avaliaram o tema Sistemática Filogenética nas coleções de livros aprovadas para o Programa Nacional do Livro Didático (PNLD) de 2021, grande parte dos livros didáticos avaliados não trata o conteúdo de Sistemática Filogenética de forma robusta, e nem trabalha razoavelmente os contextos históricos e filosóficos desta ciência.

Apesar da evolução ser o princípio unificador de toda a Biologia, a maioria dos estudantes falha em compreender conceitos relacionados a este tema (BAUM; SMITH; DONOVAN, 2005). De fato, conceitos errôneos sobre evolução são comuns até mesmo entre alunos já formados em Biologia (GREGORY; ELLIS, 2009), e mesmo entre biólogos, há um grande esforço para interpretar acuradamente relações evolutivas (KRELL; CRANSTON, 2004). Isso sugere que o 'pensamento em árvore' (*tree thinking*) não vem naturalmente para a maioria das pessoas. Alcançar o entendimento de evolução, de forma intuitiva, não é trivial. Porém, o ideal seja que não especialistas e estudantes de Biologia aprendam a ler árvores evolutivas modernas, tal como alunos de geografia leem mapas. A compreensão de conceitos

evolutivos e ecológicos em diversos ramos da sociedade é essencial, por exemplo, para qualquer nação que queira progredir por meio de um desenvolvimento sustentável e ambientalmente ético.

Entender e conhecer a biodiversidade em um escopo filogenético é uma etapa primordial para qualquer país delinear e fomentar ações e esforços conservacionistas para preservar seu patrimônio genético e histórico. As filogenias produzem importantes percepções na taxonomia, nos padrões e dinâmicas de adaptação e divergência evolutiva das espécies. Atualmente, a sistemática molecular, que baseia seus dados em sequências de DNA, fornece uma rica fonte de informação para análises das relações evolutivas; mesmo dentro de alguns limites, pode indicar o tempo aproximado e as sequências dos eventos que mais influenciaram os padrões de divergência. Enquanto alguns poucos assuntos requerem um conhecimento sobre sistemática filogenética, a maioria requer algum conhecimento de biologia evolutiva e muitos cientistas e educadores concordam que é impossível entendê-la plenamente sem uma habilidade de acuradamente interpretar árvores filogenéticas. Como representações visuais que salientam a lógica da ancestralidade, elas ajudam a integrar conceitos evolutivos e fornecem um quadro organizacional para estruturar o conhecimento sobre diversidade biológica.

Assim, uma alfabetização filogenética (ver DE MELLO, 2021) requer algum tipo de exposição ao “pensamento em árvore” – que é a habilidade de conceituar a evolução em representações visuais, tais como cladogramas e árvores filogenéticas. Sabe-se que estratégias interativas de aprendizagem tem se mostrado efetivas no ensino de conceitos científicos quando comparadas às metodologias de ensino tradicional. Portanto, para que a aprendizagem seja eficaz, é essencial que haja engajamento dos estudantes na execução de tarefas práticas relacionadas ao conteúdo alvo. Nesse contexto, os répteis são um grupo de animais que fornecem vislumbres evolutivos importantes devido à rica diversidade de formas, comportamento e histórias de vida entre seus representantes (SITES; REEDER; WIENS, 2011).

A classe dos répteis, que abriga milhares de espécies conhecidas em todo o mundo, é dividida taxonomicamente em quatro ordens: Testudines (ou Chelonia - tartarugas, cágados e jabutis), Squamata (anfisbenas, cobras e lagartos), Rhynchocephalia (tuataras, presentes somente da Nova Zelândia) e Crocodylia (gavial, jacarés e crocodilos). Duas características fundamentais diferenciam os répteis de todos os outros animais na natureza: ectotermia (i.e., uso de fontes externas de calor para regular a temperatura corporal) e a pele recoberta por escamas. De acordo com a última lista de espécies da Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH), o Brasil conta atualmente com 856 espécies de répteis, sendo 39 Testudines, seis Crocodylia e 811 Squamata (81 anfisbenas, 295 lagartos e 435 serpentes). Considerando as subespécies, o número total de répteis no país sobe para 889. Com isso, o país segue no 3º lugar em riqueza de espécies de répteis do mundo, atrás somente da Austrália (1132) e do México (980) (GUEDES; ENTIAUSPE-NETO; COSTA, 2023).

Os representantes de Squamata são encontrados atualmente em todos os continentes, apresentando um amplo espectro de histórias de vida, ecologias e formatos corporais variados que se refletem uma das radiações adaptativas mais diversificadas entre os vertebrados terrestres, incluindo mais de 12.000 espécies catalogadas até outubro de 2023 (UETZ *et al.*, 2023). Além disso, a taxa de

descrição de novas espécies não para de crescer, com um recorde notável de 168 novas espécies descritas somente no ano de 2012 – uma taxa mais alta do que qualquer ano dos três últimos séculos (PYRON; BURBRINK; WIENS, 2013). Isso posto, o objetivo geral deste trabalho foi utilizar sequências de DNA que estão disponíveis em um banco de dados públicos e explorar ferramentas da biotecnologia para investigar parâmetros genéticos e a distribuição de atributos ecológicos na reconstrução da história evolutiva entre as espécies amostradas. Mais especificamente, atributos de história de vida de lagartos e serpentes (viviparidade, oviparidade e peçonha) foram rastreados na árvore filogenética gerada com dados reais de espécies brasileiras que já tiveram parte de seu genoma sequenciado.

METODOLOGIA

O primeiro passo da metodologia foi o levantamento de sequências de DNA de espécies de Squamata que ocorrem no Brasil depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), uma plataforma de livre acesso produzida e mantida pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). O *GenBank* é um banco de dados públicos de sequências de nucleotídeos para cerca de 260.000 espécies formalmente descritas e abriga mais de mais de 200 milhões e sequências nucleotídicas, sendo mais de 400 mil apenas de animais.

A coleta de sequências de DNA foi feita a partir de um mesmo gene mitocondrial denominado Citocromo B (CytB), uma região genômica que foi escolhida por ser abundantemente sequenciada para vertebrados e, por ser uma região integrante do DNA mitocondrial (e, portanto, de origem materna), ela permite que as histórias matrilineares de cada organismo sejam estimadas. Por essas e outras propriedades, como não sofrer recombinação, o DNA mitocondrial é amplamente utilizado em métodos filogenéticos explícitos para hipóteses evolutivas. Além disso, a literatura científica revela que as taxas de divergências das sequências de DNA mitocondrial parecem extraordinariamente adequada para explorar a genealogia da especiação em animais, já que ela é rápida o suficiente para mostrar diferenças populacionais ao longo da distribuição geográfica de uma espécie, e lenta o bastante para não se saturar com mutações recorrentes ao longo de alguns milhões de anos.

A partir da seleção de sequências do fragmento do DNA mitocondrial CytB de 27 espécies, representando 13 famílias dentro da ordem Squamata (Quadro 1), foi feito um alinhamento cujo comprimento final resultou em 530 pares de base. Em seguida foi construído um arquivo para as análises em formato FASTA (.fas), que é comumente usado em programas que fazem reconstruções filogenéticas a partir de dados moleculares. O alinhamento e todas as análises empregadas, que incluem o cálculo da distância genética entre espécies, foram feitas utilizando o *software* MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018). Embora na prática das pesquisas relacionadas à construção de árvores filogenéticas seja utilizada uma grande variedade de programas mais específicos para cada etapa das diferentes análises (i.e., alinhamento, escolha de modelos evolutivos, estatísticas distintas para reconstrução de filogenias, etc.), a escolha desse software se deu devido ao seu fácil manuseio e por apresentar um amplo espectro de funções.

Quadro 1 – Táxons utilizados nas análises com seus respectivos códigos de acesso do GenBank. 1 Lagartos, 2 Serpentes, 3 Anfisbena, 4 Anfioxo

Espécie	Família	Código no GenBank
<i>Tropidurus insulanus</i> ¹	Tropiduridae	EF616029.1
<i>Phyllopezus pollicaris</i> ¹	Phyllodactylidae	JQ827196.1
<i>Gonatodes humeralis</i> ¹	Sphaerodactylidae	JQ639603.1
<i>Colobodactylus taunayi</i> ¹	Gymnophthalmidae	JX079919.1
<i>Colobosaura modesta</i> ¹	Gymnophthalmidae	KT254367.1
<i>Heterodactylus imbricatus</i> ¹	<i>Gymnophthalmidae</i>	JX079921.1
<i>Polychrus marmoratus</i> ¹	Polychrotidae	AB266749.1
<i>Kentropyx calcarata</i> ¹	Teiidae	JQ639739.1
<i>Tupinambis quadrilineatus</i> ¹	Teiidae	AY217838.1
<i>Mabuya frenata</i> ¹	Scincidae	EU443111.1
<i>Trachylepis atlantica</i> ¹	Scincidae	AF020251.1
<i>Iguana iguana</i> ¹	Iguanidae	DQ239155.1
<i>Crotalus durissus terrificus</i> ²	Viperidae	AY937301.1
<i>Bothrops alternatus</i> ²	Viperidae	AF292579.1
<i>Bothrops itapetiningae</i> ²	Viperidae	AF292582.1
<i>Bothrops moojeni</i> ²	Viperidae	AF292606.1
<i>Lachesis muta</i> ²	Viperidae	AF039262.1
<i>Boa constrictor</i> ²	Boidae	AY575035.1
<i>Epicrates cenchria</i> ²	Boidae	U69779.1
<i>Eunectes murinus</i> ²	Boidae	U69808.1
<i>Oxyrhopus guibeii</i> ²	Colubridae	JQ598938.1
<i>Apostolepis dimidiata</i> ²	Colubridae	JQ598917.1
<i>Sibynomorphus mikanii</i> ²	Colubridae	JQ598954.1
<i>Leptomicrurus narducci</i> ²	Elapidae	EF137412.1
<i>Micrurus mipartitus</i> ²	Elapidae	EF137414.1
<i>Amphisbaena schmidtii</i> ³	Amphisbaenidae	AY605475.1
<i>Branchiostoma belcheri</i> ⁴	Branchiostomatidae	AY700107.1

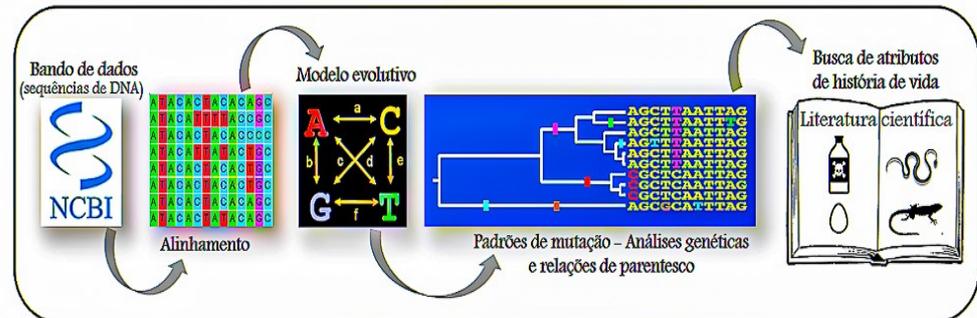
Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Em seguida foi realizada uma análise da composição de nucleotídeos e de sítios filogeneticamente informativos, e a distância genética foi calculada entre táxons amostrados. Também foi feita a escolha do melhor modelo evolutivo, que identifica o padrão das substituições nucleotídicas no banco de dados, e posteriormente a reconstrução da árvore filogenética foi realizada por meio do método de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*) com 500 replicações de *bootstrap* para determinar os índices de retenção de cada nó na árvore gerada.

O modelo evolutivo escolhido, que descreve os padrões mutacionais, foi o GTR+G+I, que considera diferentes taxas de substituições nucleotídicas. A espécie *Branchiostoma belcheri* (anfioxo) foi utilizada como grupo externo para enraizar a árvore, uma vez que é uma espécie basal na filogenia dos vertebrados, e assim polarizar adequadamente as relações de parentesco entre as espécies do banco de dados aqui utilizado. Por fim, foi feito um levantamento bibliográfico para

categorizar as espécies amostradas quanto à estratégia reprodutiva (ovípara ou ovovivípara), e quais serpentes são peçonhentas para rastrear estes atributos na filogenia. A Figura 1 ilustra como os padrões de mutação em sequências homólogas de DNA podem ser utilizadas na reconstrução da história evolutiva das espécies e resume graficamente a metodologia empregada neste estudo.

Figura 1 – Quadro esquemático da metodologia utilizada na investigação

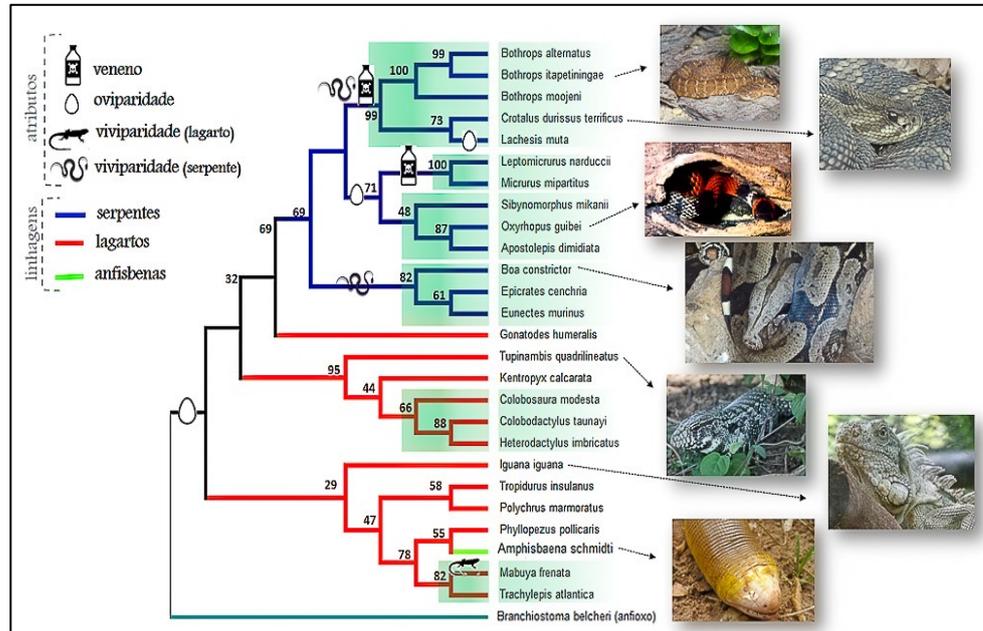


Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As relações de parentesco geradas na análise de Máxima Verossimilhança, evidenciam a formação de diversas ramificações evolutivas, sendo que todas as serpentes amostradas refletem uma origem monofilética (indicada por retângulos verdes), enquanto os lagartos apresentam diversas relações parafiléticas (Figura 2). A proporção média de bases nucleotídicas dos dados utilizados foi de 28,5% de Timina (T), 28,8% de Citosina (C), 28,1% Adenina (A) 14,6% de Guanina (G); e dos 530 pares de base (pb) analisados, 180 deles foram conservados (i.e., sem mutação) e 350 variáveis, dos quais 310 foram filogeneticamente informativos. Apesar de ser baseada em apenas um fragmento de 530 pb e nem todos os nós sejam bem suportados (i.e., altos valores de *bootstrap*), o cladograma evidencia que dados moleculares são uma fonte muito rica para a Sistemática Filogenética, visto que a maioria das relações de parentesco estão de acordo com trabalhos recentes que utilizaram diversos genes e milhares de pares de sequências nucleotídicas. Pyron, Burbrink e Wiens (2013) utilizaram 4.161 espécies de Squamata baseada em 12 genes, totalizando uma matriz de dados com 12.896 pb; enquanto Zheng e Wiens (2016), amostrando as mesmas 4.161 espécies, ampliaram a amostragem do genoma para 52 genes, totalizando uma matriz de dados com 43.593 pb.

Figura 2 – Árvore filogenética gerada dos répteis amostrados com números de bootstrap em cada nó. As imagens de alguns exemplares são mostradas para salientar as diferenças morfológicas das espécies. Fonte das figuras: Wikimedia Commons.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

As análises de parâmetros genéticos de diversidade ressaltam que os agrupamentos entre espécies mais aparentadas possuem distâncias genéticas menores (e.g., *Bothrops itapetiningae* x *Crotalus durissus* = 0,192), enquanto grupos taxonômicos mais distantes filogeneticamente apresentam valores de diversidade genética maiores (e.g., *Oxyrhopus guibei* x *Tupinambis quadrilineatus* = 0,585), como indicado em negrito na Tabela 1. Esse padrão reforça que a ancestralidade em comum se reflete no perfil (filo)genético das sequências de DNA dos táxons amostrados, mesmo em um fragmento gênico de 530 pb, que é extremamente pequeno se comparado ao tamanho total do genoma da mitocôndria dos animais, que tem cerca de 16.000 pb.

Tabela 1 – Valores de distância genética calculados para as espécies ilustradas na Figura 1.

Nome popular	Distâncias genéticas entre espécies						
	1	2	3	4	5	6	7
1. Jararaca	-						
2. Cascavel	0,192	-					
3. Falsa coral	0,285	0,267	-				
4. Jiboia	0,293	0,267	0,302	-			
5. Teiú	0,553	0,517	0,585	0,478	-		
6. Iguana	0,439	0,436	0,461	0,391	0,357	-	
7. Anfisbena (cobra-cega)	0,525	0,474	0,497	0,479	0,497	0,307	-

Fonte: Elaborada pelos autores (2023).

Quanto à reconstrução filogenética gerada, pode-se visualizar onde, no cladograma, alguns atributos são compartilhados por espécies de Squamata,

ênfatizando padrões encontrados em relação a estratégias reprodutivas (oviparidade e viviparidade), e à presença de peçonha dentro das linhagens das serpentes (Figura 2). As relações filogenéticas geradas fornecem as mesmas informações básicas que todas as árvores evolutivas: um padrão histórico de ancestralidade, divergência e descendência. Elas fazem isso retratando uma série de ramos que emergem em pontos (nós) os quais representam ancestrais em comum, que estão, por sua vez, conectados a ancestrais mais distantes. Estas representações visuais podem fornecer aos estudantes um senso de processos históricos que sustentam ambos os conjuntos de relações e agem como um ponto de partida para o desenvolvimento de novos questionamentos. Com essa abordagem os táxons não são apenas vistos como coleções de atributos (características), mas também como integrantes de uma história evolutiva, que determina como eles operam dentro de um sistema ecológico.

No caso de répteis escamados (Squamata), o compartilhamento de escamas entre lagartos, anfisbenas e serpentes foi essencial para estes vertebrados conquistarem em definitivo o ambiente terrestre, ao evitar a perda de água para o ambiente. Através dessa perspectiva, amplia-se a percepção de que as espécies que compõem os ambientes naturais se diversificaram ao longo de eras geológicas e, portanto, não são capazes de responder evolutiva e ecologicamente às rápidas mudanças que o ser humano tem causado ao meio ambiente. Apresentar uma árvore filogenética e demarcar a origem de um atributo em um ramo é uma maneira muito eficiente para mostrar que todo descendente de um nó deve ter este atributo. Qualquer característica biologicamente importante pode ser mapeada em um cladograma ou árvore filogenética e, em um contexto educacional, isto significa que as características mais relevantes podem estar presentes em um esquema organizacional unificado, como exemplificado aqui com as escamas, ovo amniótico e veneno.

O ‘pensamento em árvore’ nesse contexto é importante porque encarna um entendimento claro do princípio de ancestralidade comum, uma vez que auxilia estudantes a organizar seu conhecimento sobre diversidade biológica. Como o enfoque demonstrado aqui foi nas estratégias reprodutivas e na presença de peçonha, pode-se explicitar graficamente *onde* eles aparecem nos ramos da árvore filogenética, e assim abrir um campo fértil para discussões evolutivas e ecológicas dentro da sala de aula. Isso se alinha a propostas do ensino voltadas à alfabetização científica (SASSERON; CARVALHO, 2011), incentiva um ensino crítico de zoologia em base na sistemática filogenética e reforça que a biologia pode ser tratada em um enfoque histórico-filosófico, permitindo que o ensino de evolução seja um eixo norteador das ciências biológicas por meio de conceitos fundamentais da sistemática filogenética (SANTOS; KLASSA, 2012).

A oviparidade, por exemplo, é encontrada na maioria das linhagens (Figura 2), indicando que a viviparidade tem origens em linhagens independentes e tão distintas quanto as famílias Viperidae (*Lachesis muta*) e Scincidae (*Mabuya frenata*). A percepção de padrões de estratégias reprodutivas é importante para o entendimento de divergências intraespecíficas (dentro de uma mesma espécie) e interespecíficas (entre espécies distintas), resultante dos fatores aos quais uma espécie está sujeita, como por exemplo, disponibilidade de alimento, variação térmica e hídrica do ambiente e densidade de predadores, aptidão para a reprodução (SHINE, 2003). Já a viviparidade traz mais vantagens para as espécies que vivem em regiões de clima frio, uma vez que a baixa temperatura ambiental é

prejudicial para o desenvolvimento do embrião dentro do ovo. Em regiões com fitofisionomias abertas, como nos biomas brasileiros Cerrado e Caatinga, as temperaturas elevadas podem prejudicar o funcionamento de enzimas que atuam dentro do ovo no processo de desenvolvimento do embrião.

Em relação ao rastreamento de espécies peçonhentas, a árvore apresentada auxilia no entendimento sobre alguns dos complexos processos relacionados à origem e evolução do veneno nas linhagens dos répteis. Em serpentes e alguns lagartos, o veneno é uma forma de saliva modificada ao longo de sua história evolutiva e é uma inovação evolutiva chave entre linhagens filogeneticamente diferentes, sendo utilizado como um meio de defesa, predação (matar ou subjugar presas), realizar funções digestivas relacionadas à dieta e também como um meio de afirmar o domínio sobre membros da mesma espécie. A evolução do veneno provavelmente foi responsável pela enorme expansão das serpentes em todo o globo terrestre (FRY *et al.*, 2012).

Os venenos de serpentes representam um traço adaptativo e um exemplo de evolução convergente. Eles são produzidos em glândulas especializadas capazes de sintetizar e secretar grandes quantidades de substâncias biologicamente ativas, compostas principalmente de proteínas e polipeptídios. Os diversos tipos de venenos são constituídos por uma mistura complexa de substâncias orgânicas com efeitos tóxicos que podem atuar de forma isolada ou sinérgica, potencializando ainda mais os danos teciduais locais ou sistêmicos. A dieta desempenhou um papel central na radiação adaptativa das serpentes, e o veneno é uma adaptação importante na diversificação destes animais (CALVETE *et al.*, 2009). Como salientado por estes autores, o veneno representa um aperfeiçoamento fundamental na evolução das serpentes, pois permitiu uma transição de um meio mecânico (constricção) para um produto químico (veneno) como forma de conter e digerir presas maiores do que eles, e por isso suas proteínas têm múltiplas funções, que incluem imobilização, paralisação, morte e digestão das presas.

Todos os escamados peçonhentos (serpentes e lagartos venenosos) compartilham um ancestral venenoso comum e a evolução do veneno na história evolutiva das serpentes ainda é uma questão de debate no meio acadêmico. Acredita-se que a origem do veneno promoveu uma rápida diversificação das serpentes no período Cenozóico, particularmente para as espécies da família Colubridae e suas colonizações nas Américas (WÜSTER *et al.* 2008). Os cientistas sugerem que a razão para esta ampla expansão seja devido à mudança de métodos mecânicos para bioquímicos para subjugar suas presas. Em relação à sua origem, Fry *et al.* (2012) ressaltam que a proposta mais amplamente aceita é que o veneno se originou apenas uma vez há cerca de 170 milhões de anos, e então se diversificou na ampla gama de venenos existentes atualmente.

De acordo com esta hipótese, o veneno original era um conjunto simples de proteínas que era acoplado a um par de glândulas, e posteriormente este conjunto de proteínas se diversificou em várias linhagens, incluindo as serpentes e lagartos dos grupos Anguimorpha e Iguania (CASEWELL *et al.*, 2013). Diversas linhagens de serpentes subsequentemente perderam a habilidade de produzir veneno, geralmente por uma mudança na dieta (FRY *et al.*, 2012). A hipótese de origem única para o veneno sugere que o mecanismo de evolução na maioria dos casos se deu devido a duplicação de genes seguida pela seleção natural que favoreceu este atributo adaptativo. Algumas das várias adaptações produzidas por esse processo incluem venenos mais tóxicos para presas específicas em diversas linhagens,

proteínas que pré-digerem a presa, assim como estratégias para rastrear a presa após uma picada (e.g., BARLOW *et al.*, 2009).

Até o uso de sequenciamento de genes para reconstrução de árvores filogenéticas, as filogenias eram criadas apenas com base na morfologia e estas relações tradicionais sugeriam que o veneno se originou em múltiplas linhagens dentro dos Squamata há aproximadamente 100 milhões de anos, e desde então se diversificaram e evoluíram independentemente (FRY *et al.*, 2012; CASEWELL *et al.*, 2013). Embora Pyron e Burbrink (2014) tenham investigado atributos ecológicos de lagartos e serpentes a nível global, o uso desta abordagem em escala mais restrita é inédita com espécies presentes nos diferentes biomas brasileiros, e lança luz sobre como as filogenias podem ser utilizadas para evidenciar a evolução de atributos de história de vida em escala regional.

A abordagem apresentada no presente artigo se alinha com a proposta de Catley (2006), que sugere uma mudança de paradigma no ensino de evolução para que estudantes passem a ter uma visão mais sistêmica dos processos evolutivos que realmente capturem a grandeza da teoria. Esta visão, por sua vez, pode encapsular uma ampla gama de conceitos evolutivos, desde variação no genoma de indivíduos, seleção natural até mecanismos de especiação, extinção e formação de grupos superiores (cladogênese).

No contexto do ensino de biologia evolutiva, observa-se que a maior parte das aulas dedicadas a esta matéria voltam-se para processos relacionados à microevolução, com grande foco para seleção natural, assim como tópicos voltados para a síntese moderna da teoria evolutiva (e.g. frequências alélicas, equilíbrio de Hardy-Weinberg). Desta maneira, os processos macroevolutivos, visíveis apenas em “escala filogenética”, se tornam obscuros e pouco intuitivos. Nessa abordagem, também existe a desvantagem de que é necessário possuir pré-requisitos mínimos em genética para estudar temas ligados à evolução molecular, o que leva muitos professores a dedicarem poucas aulas à matéria, sendo estas lecionadas no final do período letivo, quando os pré-requisitos já foram atendidos (TIDON; LEWONTING, 2004). Mas uma consequência disso não seria formar estudantes que não são capazes de enxergar a evolução como uma teoria unificadora que serve de arcabouço para a organização do conhecimento biológico, e assim passar a considerá-la apenas mais uma matéria na grade horária?

Sabe-se que a compreensão e aceitação da teoria evolutiva depende, além de técnicas pedagógicas em sala de aula, de uma série de fatores socioculturais como religião, posicionamento filosófico, nível educacional familiar, dentre outros (PENTEADO; KAVALCO; PAZZA, 2012). Já foi observado que estudantes de biologia que aprenderam evolução utilizando o “pensamento em árvore” demonstraram maior taxa de aceitação dos conceitos evolutivos (GIBSON; HOEFNAGELS, 2015). Dessa forma, o desenvolvimento de habilidades de “pensamento em árvore” é essencial e deve ser considerado como prioridade no ensino de biologia evolutiva (MEISEL, 2010).

Nesse contexto, um melhor entendimento sobre Biologia Evolutiva pode contribuir, por exemplo, com o ensino da Ecologia que, é um tópico vital para o entendimento da sociedade como um todo e que raramente tem uma abordagem a partir da perspectiva de que as interações e relações ecológicas são produtos da evolução. Mas trabalhar esta ideia não é algo simples e exige uma abordagem que

busque um pensamento ecossistêmico e transdisciplinar, como proposto por autores que sugerem a criação de elos com práticas educativas que rompam com o reducionismo e a fragmentação do paradigma tradicional, visto que a visão ecossistêmica e transdisciplinar nos espaços escolares e nas práticas pedagógicas possibilita edificar a educação a um novo patamar (e.g., PINHO; QUEIROZ; FREIRE, 2021).

Uma noção inovadora nessa transdisciplinaridade é que a classificação é melhor entendida em um contexto ecológico, tais como o conjunto de inter-relações na natureza serem manifestações da seleção natural por longos períodos de tempo. Como defendido e discutido por Santos e Piranha (2018), qualquer assunto relacionado à história da vida na Terra requer uma abordagem interdisciplinar que se integre ao sistema filogenético. Na mesma esteira, Chaves, Moraes e Lira-Da-Silva (2018) ressaltam que o tempo geológico e o processo evolutivo estão atrelados à própria Base Nacional Comum Curricular do ensino básico brasileiro (BRASIL, 2018). Portanto, as adaptações dentro do contexto evolutivo, ao invés de serem vistas isoladas como “necessidades dos organismos”, são melhor introduzidas como características ou comportamentos que foram selecionados pelo ambiente no passado e favoreceram aqueles organismos mais adequados para um habitat em particular.

Assim, a classificação apresentada em forma de cladograma se torna uma ferramenta pedagógica poderosa por estar baseada em caracteres observáveis que refletem a história de eventos que levaram a padrões evolutivos e ecológicos entre os táxons. Visualmente, é mais didático e prático observar os atributos aqui investigados (veneno e estratégias reprodutivas) ao longo das linhagens amostradas, salientando quais possuem múltiplas origens ou uma única origem em comum. Isso posto, constata-se que a metodologia adotada para evidenciar que a abordagem do ‘pensamento em árvore’ seja tão importante para a Biologia Evolutiva quanto o entendimento dos mecanismos de seleção natural. Assim, o raciocínio filogenético mostra ter um grande poder no ensino em todos os campos da Biologia, visto que o ‘pensamento em árvore’ (*tree thinking*) pode ser aplicado a qualquer nível taxonômico investigado para acalorar discussões relacionadas quanto a origem e diversificação das espécies.

O Brasil é o país mais intimamente associado à ideia de “megadiversidade” por ser a região de maior biodiversidade para muitos grupos taxonômicos, e quanto maior a biodiversidade de um país, maior é sua responsabilidade de conservar sua riqueza biológica. Dessa forma, o uso de espécies nativas da fauna é benéfico em uma abordagem prática de ensino de Evolução, pois destaca a vasta diversidade de formas de vida que o Brasil abriga em seus limites geográficos. Assim, quando se olha para lagartos e serpentes brasileiras sob o prisma evolutivo, entende-se que o Brasil é detentor de uma das faunas mais majestosas do planeta. Portanto, o “pensamento em árvore” além de ser uma ferramenta poderosa para proporcionar uma compreensão mais profunda em diversas áreas das Ciências Biológicas, é também de extremamente útil na conscientização sobre a necessidade de se conservar a biodiversidade brasileira.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entre os grupos animais, os répteis são usados extensivamente como modelos biológicos para estudos evolutivos e de especiação. São também considerados bons modelos em estudos ecológicos, inclusive no que diz respeito às características dos efeitos climáticos e ambientais sobre a distribuição das espécies. Portanto, são vertebrados que fornecem um amplo espectro de abordagens possíveis a serem investigadas em um escopo de ‘pensamento em árvore’, já que as árvores filogenéticas mostram as relações evolutivas de espécies ou grupos de espécies, e entendê-las é crucial para o entendimento da evolução. As relações evolutivas são únicas em comparação a outros agrupamentos baseados em similaridades porque as relações entre elas são o resultado de descendência por ancestralidade em comum.

Uma importante consequência do processo evolutivo é que ele produz relações aninhadas hierarquicamente entre espécies e grupos de espécies. Se as pessoas entenderem e interpretarem isso corretamente, elas desenvolverão um entendimento intuitivo de relações evolutivas baseadas em hierarquias. No ensino de Biologia, infelizmente, não há muito tempo dedicado a tópicos de macroevolução, como a sistemática filogenética, o que gera barreiras para o entendimento dos mecanismos evolutivos. Assimilar e entender os processos e mecanismos de evolução que sustentam a nossa biodiversidade depende direta ou indiretamente do conhecimento que se tem sobre as relações de parentesco entre as espécies, e a Biotecnologia e os padrões de mutação a nível de DNA têm auxiliado muito nesse campo.

A metodologia aqui empregada visa instigar novas perspectivas de trabalhos futuros para dar continuidade em pesquisas que visam desmembrar a complexa rede de interações entre espécies, ambientes e atributos ecológicos. Este tipo de abordagem auxilia a Ciência não só a lançar luz sob a história da vida na Terra, mas também pode nos guiar para uma maior conscientização sobre o meio ambiente e aumentar os esforços conservacionistas para se preservar o patrimônio genético, o legado histórico e a riqueza biológica que nosso país abriga em seu território.

AMONG SNAKES, LIZARDS AND GENOMES: THE USE OF DNA SEQUENCES IN THE RECONSTRUCTION OF PHYLOGENIES TO TRACK FUNCTIONAL ATTRIBUTES

ABSTRACT

Evolution is the unifying principle of natural sciences and its understanding is essential for the organization of the biological knowledge acquired by students. Despite that, this subject is often taught in an ineffective way and many students have problems comprehending evolutionary concepts and, therefore, to interpret cladograms. Once molecular genetics has currently become the richest source of evolutionary information and is the main tool for reconstruct phylogenies, this work used DNA sequences available in public data sets, and free-access bioinformatics tools to reconstruct a cladogram to track some ecophysiological traits through the phylogeny of lizards and snakes species from Brazilian fauna. Phylogenetic analyses were based on a 530 base-pairs fragment of the mitochondrial gene Cytochrome B (CytB). Next, the ecological attributes shared (or exclusive) to the investigated species were tracked, such as reproductive strategy (viviparity / oviparity) and presence or absence of venom. The results provide theoretical foundations to emphasize the practical application of the meaning and importance of interpreting a phylogenetic tree, providing a background for discussions to fill gaps in Biology teaching, which in general does not devote much time to macroevolution topics (e.g., phylogenetics), which creates barriers to understanding the evolutionary mechanisms. The importance of assimilating and understanding the processes and mechanisms of evolution that sustain biodiversity is discussed, which depend directly or indirectly on the knowledge we have about the kinship relationships among species. Finally, pedagogical actions are suggested to dismantle the complex network of interactions between species, environments and ecological attributes that compose the immense Brazilian biodiversity.

KEYWORDS: Evolution. Cladograms. Squamata.

REFERÊNCIAS

- BARLOW, A.; POOK, C. E.; HARRISON, R. A.; WÜSTER, W. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1666, p. 2443-2449, 2009. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2009.0048>. Acesso em: 12 maio 2021.
- BAUM, D. A.; SMITH, S. D.; DONOVAN, S. S. The tree-thinking challenge. **Science**, v. 310, n. 5750, p. 979-980, 2005.
- BRASIL. Ministério da Educação. **Base Nacional Comum Curricular**. Brasília, 2018. Disponível em: <http://basenacionalcomum.mec.gov.br/>. Acesso em: 02 jul. 2023.
- CALVETE, J. J.; FASOLI, E.; SANZ, L.; BOSCHETTI, E.; RIGHETTI, P. G. Exploring the venom proteome of the western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*, via snake venomomics and combinatorial peptide ligand library approaches. **Journal of proteome research**, v. 8, n. 6, p. 3055-3067, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19371136/>. Acesso em: 8 jun. 2021.
- CASEWELL, N. R.; WÜSTER, W.; VONK, F. J.; HARRISON, R. A.; FRY, B. G. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. **Trends in ecology & evolution**, v. 28, n. 4, p. 219-229, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23219381/>. Acesso em: 15 maio 2023.
- CATLEY, K. M. Darwin's missing link—a novel paradigm for evolution education. **Science Education**, v. 90, n. 5, p. 767-783, 2006. Disponível em: https://www.academia.edu/83313820/Darwins_missing_link_a_novel_paradigm_for_evolution_education. Acesso em: 8 jun. 2021.
- CHAVES, R. S.; MORAES, S. S.; LIRA-DA-SILVA, R. M. Por que Ensinar Tempo Geológico na Educação Básica? **Terra e Didática**, v. 14, n. 3, p. 233-244, 2018. Disponível em: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/td/article/view/8652309>. Acesso em: 1 jun. 2021.
- DE MELLO, R. Nada em meio ambiente faz sentido exceto à luz da Ecologia e da Evolução. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 10, n. 1, 2021. Disponível em: <https://revistabrasileirademeioambiente.com/index.php/RVBMA/article/view/1008>. Acesso em: 12 abr. 2021.
- FRY, B. G.; SCHEIB, H.; AZEVEDO, I. L. M. J.; SILVA, D. A.; CASEWELL, N. R. Novel transcripts in the maxillary venom glands of advanced snakes. **Toxicon**, v. 59, n.

7-8, p. 696-708, 2012. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22465490/>. Acesso em: 5 maio 2021.

GIBSON, J.; HOEFNAGELS, M. H. Correlations between tree thinking and acceptance of evolution in introductory biology students. **Evolution: Education and Outreach**, v. 8, n. 1, p. 1-17, 2015. Disponível em: <https://evolution-outreach.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12052-015-0042-7>. Acesso em: 4 mar. 2021.

GREGORY, T. R.; ELLIS, C. A. J. Conceptions of evolution among science graduate students. **BioScience**, v. 59, n. 9, p. 792-799, 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioscience/article/59/9/792/248601>. Acesso em: 25 fev. 2021.

GUEDES, T. B.; ENTIAUSPE-NETO, O. M.; COSTA, H. C. Lista de répteis do Brasil: atualização de 2022. **Herpetologia Brasileira**, v. 12 n. 1, p. 56-161, 2023. Disponível em: <https://zenodo.org/record/7829013>. Acesso em: 8 jun. 2021.

KRELL, F.; CRANSTON, P., S. Which side of the tree is more basal? **Systematic Entomology**, v. 29, n. 3, p. 279-281, 2004. Disponível em: <https://resjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0307-6970.2004.00262.x>. Acesso em: 4 jun. 2021.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29722887/>. Acesso em: 4 jun. 2021.

MEISEL, R. P. Teaching tree-thinking to undergraduate biology students. **Evolution: Education and Outreach**, v. 3, n. 4, p. 621-628, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21572571/>. Acesso em: 2 jun. 2021.

MENDES, S. L. D. S. D.; RIZZO, A. E.; MAYRINCK, D. A representação da Sistemática Filogenética nos livros didáticos do novo ensino médio: desafios e perspectivas. **Amazônia: Revista de Educação em Ciências e Matemáticas**, v. 18, n. 40, p. 209-224, 2022. Disponível em: <https://periodicos.ufpa.br/index.php/revistaamazonia/article/view/12742>. Acesso em: 8 jun. 2021.

PENTEADO, P. R.; KAVALCO, K. F.; PAZZA, R. Influence of sociocultural factors and acceptance of creationism in the comprehension of evolutionary biology in freshman Brazilian students. **Evolution: Education and Outreach**, v. 5, p. 589-594, 2012. Disponível em: <https://evolution->

outreach.biomedcentral.com/articles/10.1007/s12052-012-0456-4. Acesso em: 8 jun. 2021.

PIANKA, E. R.; VITT, L. J. **Lizards: windows to the evolution of diversity**. Univ of California Press, 2003.

PINHO, M. J. D.; QUEIROZ, M. C. D. C.; FREIRE, J. C. D. S. Pensamento ecossistêmico e transdisciplinar: trilhando caminhos na perspectiva da Ecologia dos Saberes. **Linhas Críticas**, v. 27, 2021. Disponível em: <https://periodicos.unb.br/index.php/linhascriticas/article/view/34338>. Acesso em: 1 jun. 2021.

PYRON, R. A.; BURBRINK, F. T. Early origin of viviparity and multiple reversions to oviparity in squamate reptiles. **Ecology letters**, v. 17, n. 1, p. 13-21, 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ele.12168>. Acesso em: 6 jun. 2021.

PYRON, R. A.; BURBRINK, F. T.; WIENS, J. J. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. **BMC evolutionary biology**, v. 13, n. 1, p. 1-54, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23627680/>. Acesso em: 8 jun. 2021.

SANTOS, C. M. D.; KLASSA, B. Despersonalizando o ensino de evolução: ênfase nos conceitos através da sistemática filogenética. **Educação: teoria e prática**, v. 22, n. 40, p. 62-80, 2012. Disponível em: <https://www.periodicos.rc.biblioteca.unesp.br/index.php/educacao/article/view/6271>. Acesso em: 15 maio 2021.

SANTOS, C. P. S.; PIRANHA, J. M. Earth history and evolution of life in the high school curriculum of the state of São Paulo. **Terra e Didática**, v. 14, n. 3, p. 296-303, 2018. Disponível em: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/td/article/view/8653529>. Acesso em: 15 maio 2021.

SASSERON, L. H.; CARVALHO, A. M. P. Alfabetização científica: uma revisão bibliográfica. **Investigações em Ensino de Ciências**, v. 16, n. 1, p. 59–77, 2011. Disponível em: <https://ienci.if.ufrgs.br/index.php/ienci/article/view/246>. Acesso em: 15 maio 2021.

SHINE, R. Reproductive strategies in snakes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1519, p. 995-1004, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1691341/>. Acesso em: 36 mar. 2021.

SITES, J. R.; J. W.; REEDER, T. W.; WIENS, J. J. Phylogenetic insights on evolutionary novelties in lizards and snakes: sex, birth, bodies, niches, and venom. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 42, p. 227-244, 2011. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-ecolsys-102710-145051>. Acesso em: 5 jun. 2021.

TIDON, R.; LEWONTIN, R. C. Teaching evolutionary biology. **Genetics and molecular biology**, v. 27, p. 124-131, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/gmb/a/8pwzKNbBJXHNNV9vF8zrdb/>. Acesso em: 6 jun. 2021.

UETZ, P.; FREED, P.; AGUILAR, R.; REYES, F.; HOSEK, J. (eds.) 2023. **The Reptile Database**. Disponível em: <http://www.reptile-database.org>. Acesso em: 28 nov 2023.

WÜSTER, W.; PEPPIN, L.; POOK, C. E.; WALKER, D. E. A nesting of vipers: phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 2, p. 445-459, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18804544/>. Acesso em: 3 mar. 2021.

ZHENG, Y.; WIENS, J. J. Combining phylogenomic and supermatrix approaches, and a time-calibrated phylogeny for squamate reptiles (lizards and snakes) based on 52 genes and 4162 species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 94, p. 537-547, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26475614>. Acesso em: 8 jun. 2021.

Recebido: 09 jun. 2021.

Aprovado: 03 dez. 2023.

DOI: 10.3895/rbect.v17n1.14708

Como citar: MELLO, R.; RODRIGUES, B. R. A. Entre cobras, lagartos e genomas: o uso de sequências de DNA na reconstrução de filogenias para rastreamento de atributos funcionais. **Revista Brasileira de Ensino de Ciência e Tecnologia**, Ponta Grossa, v.17, p. 1-17, 2024. Disponível em: <<https://periodicos.utfpr.edu.br/rbect/article/view/14708>>. Acesso em: XXX.

Correspondência: Rodrigo de Mello - rdemellobr@gmail.com

Direito autoral: Este artigo está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

