UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA EXPERIMENTAL

MARIA JÚLIA VILANI NAMAN

**EXPRESSÃO DA MELANOPSINA NAS RETINAS DE CORUJAS
COM DIFERENTES PADRÕES DE ATIVIDADE DIÁRIA**

São Paulo

2021

MARIA JÚLIA VILANI NAMAN

**EXPRESSÃO DE MELANOPSINA NAS RETINAS DE CORUJAS COM
DIFERENTES PADRÕES DE ATIVIDADE DIÁRIA**

Versão corrigida

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

Área de Concentração: Psicologia Experimental.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Daniela Maria Oliveira Bonci
Departamento de Psicologia Experimental
Instituto de Psicologia
Universidade de São Paulo

São Paulo

2021

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

ASSINATURA:

Maria Julia Viloni

DATA: 27/09/2021

ASSINATURA:

Daniela M. Bonci

DATA: 27/09/2021

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

Vilani Naman, Maria Júlia

EXPRESSÃO DE MELANOPSINA NAS RETINAS DE CORUJAS COM
DIFERENTES PADRÕES DE ATIVIDADE DIÁRIA / Maria Júlia Vilani Naman;
orientadora Daniela Maria Oliveira Bonci. -- São Paulo, 2021.

96 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Psicologia Experimental)
- Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2021.

1. Corujas. 2. Expressão gênica. 3. Melanopsina. 4. Ritmo circadiano. 5.
Retina. I. Oliveira Bonci, Daniela Maria, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Maria Júlia Vilani Naman

Título: “Expressão de melanopsina nas retinas de corujas com diferentes padrões de atividade diária”.

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Psicologia Experimental.

Dissertação defendida e aprovada em: 27/09/2021

Banca Examinadora

Orientador (a) Profa. Dra. Daniela Maria Oliveira Bonci

Instituição: Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Examinador (a) Profa. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci

Instituição: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Examinador (a) Dra. Einat Hauzman

Instituição: Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Examinador (a) Dr. Leonardo Vinicius Monteiro de Assis

Instituição: Universidade de Lubeck

Julgamento: Aprovada

*À minha mãe que sempre foi uma inspiração
para lutar com todas as forças por aquilo que eu
acredito, e por todo apoio e incentivo.*

*Ao meu irmão pelo apoio, por sempre acreditar em mim e estar presente em todas as
minhas conquistas.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Professora Dra. Daniela Maria Oliveira Bonci, por ter me acolhido desde a Iniciação Científica, por todos os ensinamentos e por sempre me apoiar e acreditar no meu potencial.

À CAPES, por todo apoio financeiro.

À minha amiga, Dra. Einat Hauzman, por todas as discussões práticas e teóricas, por estar sempre ao meu lado não deixando eu desistir, por todo incentivo e momentos de descontração. Agradeço também por toda ajuda e ensinamento sobre as técnicas de filogenia molecular!

À Professora Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci, do Laboratório de Fisiologia da Pigmentação, do IBUSP, por me receber tão carinhosamente e ceder o espaço de seu laboratório para os experimentos deste estudo, por todo auxílio, orientação, ensinamentos e por ter contribuído imensamente para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Leonardo Vinícius Monteiro de Assis, que desde o início se disponibilizou para me auxiliar em todas as etapas práticas do trabalho, desde a criação dos protocolos até as análises estatísticas e sempre com um sorriso no rosto. Agradeço pelas broncas, pelas teimosias, por me incentivar em todos os momentos que eu pensava em desistir, pelo exemplo de pesquisador e por amor à ciência. Obrigada por acreditar em mim, Léo, sem você esse trabalho não estava finalizado!

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Professor Dr. Jerome Baron pelo fornecimento das corujas e aos seus alunos por me receberem tão bem em seu Laboratório, pelas risadas e pela disposição ao longo das duas semanas de coleta, pelo comprometimento e ajuda nos procedimentos com os animais.

À todas as corujas, que cederam sua vida para a realização deste trabalho.

Agradeço a todos os professores e colegas do Laboratório de Psicofisiologia Sensorial, pela companhia, por todos os ensinamentos, por ter contribuído com meu crescimento tanto profissional, quanto pessoal.

Agradeço especialmente aos meus amigos, Vitor Corredor e Juliana Tashiro, por aguentarem meus momentos de desespero, pela troca de risadas e discussões, pelos inúmeros finais de semana no Laboratório, pelas contribuições e sugestões para este trabalho e por estarem comigo sempre.

À minha família, Andréa Vilani e José Victor Vilani, por todo apoio e incentivo do começo ao fim do mestrado. Muito obrigada! Amo vocês!

Aos meus amigos, por toda paciência em me ouvir, por toda motivação e por estarem comigo nos momentos bons e ruins desta jornada.

Muito obrigada!

“Pesquisar é acordar para o mundo”

Marcelo Lamy

RESUMO

A melanopsina é um fotopigmento responsável por gerar uma série de respostas à luz nos organismos como a regulação do ritmo circadiano, reflexo pupilar e controle da temperatura corporal. Dois genes parálogos foram descritos, *Opn4x* e *Opn4m*, como responsáveis pela expressão da melanopsina. O papel de cada tipo de melanopsina na retina dos vertebrados ainda não está totalmente elucidado e observa-se uma diversidade de padrões de expressão deste fotopigmento em retinas de diferentes espécies de vertebrados. As corujas são um excelente modelo para o estudo do papel da melanopsina devido a diversidade de espécies e seus padrões de atividades diferenciados, com corujas de hábitos diurno, noturno e catemeral. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a expressão da melanopsina em diferentes espécies de corujas da família Strigidae e Tytonidae: *Athene cunicularia*, *Asio clamator*, *Glaucidium brasilianum*, *Megascops choliba* e *Tyto furcata*, através de análises genéticas, filogenéticas e morfológicas. Os animais foram obtidos junto ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais e sacrificados com o fármaco pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso) injetado por via intraperitoneal, seguido de guilhotina. As coletas foram realizadas no período de 11h30-12h30 no mês de agosto/2019. Os olhos foram enucleados e as retinas foram dissecadas para os estudos genéticos e morfológicos. Foi realizada a extração do RNA e a sua transcrição em cDNA. O cDNA foi utilizado na reação em cadeia da polimerase (PCR) com posterior sequenciamento para identificação dos genes de melanopsina expressos na retina das corujas. Para as análises quantitativas da expressão gênica foi realizada a técnica de PCR em tempo real. Os dados obtidos foram comparados por análise de variância (ANOVA ONE-WAY) seguida pelo teste de Tukey. A reconstrução filogenética foi obtida pela método de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*, ML), utilizando o programa GARLI v.0.96. O suporte estatístico para os ramos foi obtido por *bootstrap* não paramétrico. Nos estudos morfológicos, retinas íntegras das espécies *A. cunicularia*, *G. brasilianum* e *T. furcata* foram marcadas com anticorpos específicos para a melanopsina OPN4x e OPN4m, por imunohistoquímica e revelados com anticorpo secundário CY3. Os resultados genéticos mostraram que as corujas expressam os dois genes de melanopsina, *Opn4x* e *Opn4m* e as análises filogenéticas dos genes recuperou a filogenia das corujas, com separação de dois clados monofiléticos formados pelas famílias Strigidae e Tytonidae. Os resultados de PCR em tempo real mostraram uma variação no perfil de expressão dos genes entre as espécies

noturnas, diurnas e catemerais. Nos resultados morfológicos foi observado que a melanopsina pode estar expressa na camada dos fotorreceptores (CF), na camada nuclear interna (CNI), na camada de células ganglionares (CCG), e na camada de fibras nervosas. Com base em todos os resultados obtidos, observa-se que em espécies com diferentes hábitos o padrão de melanopsina se difere e é possível inferir que os genes de melanopsina podem apresentar funções diferentes na retina de corujas. Os resultados apontam para a necessidade de novas pesquisas sobre a expressão gênica da melanopsina em corujas em outros períodos do dia, a fim de entendermos melhor como é o padrão de expressão ao longo do dia nestas espécies e sua relação com os diferentes padrões de atividade diária.

Palavras-chave: Strigiformes, melanopsina, expressão gênica, ritmo circadiano.

ABSTRACT

Melanopsin is a photopigment responsible for generating a series of responses to light in organisms, such as circadian rhythm regulation, pupillary reflex and body temperature control. Two paralogous genes, *Opn4x* and *Opn4m*, were described as responsible for the expression of melanopsin. The role of each type of melanopsin in the vertebrate retina is still not fully elucidated and a diversity of expression patterns of this photopigment can be observed in retinas of different vertebrate species. Owls are an excellent model for studying the role of melanopsin due to the diversity of species and their different activity patterns, with owls with diurnal, nocturnal and cathemeral habits. The purpose of the study was to characterize the expression of melanopsin in different species of owls of the Strigidae and Tytonidae family: *Athene cunicularia*, *Asio clamator*, *Glaucidium brasilianum*, *Megascops choliba*, and *Tyto furcata*, through genetic, phylogenetic and morphological analyses. The animals were obtained from the Institute of Biological Sciences of the Federal University of Minas Gerais and sacrificed with the sodium pentobarbital (50 mg/kg of weight) injected intraperitoneally, followed by a guillotine. Collections were carried out from 11:30 am to 12:30 am in August/2019. The eyes were enucleated, and the retinas were dissected for genetic and morphological studies. RNA extraction and transcription cDNA were performed. The melanopsin cDNA was used in the polymerase chain reaction (PCR) with subsequent sequencing to identify melanopsin genes expressed in the retina of owls. For the quantitative analysis of gene expression, the real-time PCR was performed. Data were compared by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey test. The phylogenetic reconstruction was obtained by the maximum likelihood method (Maximum Likelihood, ML) using the program Garli v.0.96. Statistical support for the branches was obtained by non-parametric bootstrap. In morphological studies, retinas of the species *A. cunicularia*, *G. brasilianum* and *T. furcata* were labeled with specific antibodies for melanopsin OPN4x and OPN4m, by immunohistochemistry and revealed with secondary antibody CY3. The results showed that the genetic owls express both genes of melanopsin, *Opn4x* *Opn4m*, and phylogenetic analysis of the gene recovered phylogeny of owls, with separation of two monophyletic clades formed by Strigidae and Tytonidae families. Real-time PCR showed a variation in expression pattern between nocturnal, diurnal and catameral species. In the morphological results, it was observed that melanopsin can be expressed in the photoreceptor layer (PL), in the inner nuclear layer (INL), in the ganglion cell layer (GCL), and in the nerve fiber layer (NFL). Based on all the results obtained, it is observed

that in species with different habits the melanopsin pattern differs and it is possible to infer that melanopsin genes may have different functions in the retina of owls. The results point to the need for further research on the gene expression of melanopsin in owls at other times of the day, to better understand the pattern of expression throughout the day in these species and its relationship with different patterns of activity daily.

Keywords: Strigiformes, melanopsin, gene expression, circadian rhythms.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Comparação do tempo gasto na superfície pelo tuco-tuco *Ctenomys cf. knighti* durante as horas de claro do dia, em cada uma das estações (Tomotani, 2011)22
- Figura 2.** Representação esquemática da via de sinalização Retina-NSQ-Glândula pineal. O estímulo luminoso é inicialmente enviado da retina para o Núcleo Supraquiasmático (NSQ) por meio do trato retino-hipotalâmico (TRH). O NSQ exerce uma modulação sobre a via que é formada pelo núcleo paraventricular (PVN) e o sinal percorre este núcleo até o núcleo intermédio lateral, passando para o gânglio cervical superior que transmite o sinal para a glândula pineal (Tavares, 2015)24
- Figura 3.** Corte histológico com coloração Hematoxilina-Eosina (HE) da retina da espécie de coruja *Athene cunicularia*. As camadas da retina que estão identificadas são: EP epitélio pigmentado; CF, camada de fotorreceptores; CNE, camada nuclear externa; CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CCG, camada de células ganglionares (Modificado de Pinto et al., 2016)25
- Figura 4.** Representação do corte transversal de fotorreceptores (cones e bastonetes) da retina de vertebrados. Na figura está identificado o segmento externo e seus discos membranosos, o elipsoide onde contém as mitocôndrias, o núcleo, o segmento interno e o terminal sináptico em forma de pedículo, nos cones e em forma de bastão, nos bastonetes (Modificado de Burns & Lamb, 2003)26
- Figura 5.** Expressão do mRNA da melanopsina com hibridização *in situ*. (A) Histoquímica de hibridização *in situ* fluorescente de OPN4 e (B) Hibridização *in situ* na retina de galinha *Gallus gallus* com maior intensidade na INL, Camada nuclear interna; na PL, Camada de fotorreceptores e na GCL, Camada de células ganglionares. Barra de escala: 50µm (Modificado de Chaurasia et al., 2005; Bailey & Cassone, 2004)28
- Figura 6.** Diversificação dos tipos de células na retina dos vertebrados. Os fotorreceptores (cones e bastonetes) evoluíram a partir de fotorreceptores ciliares. A evolução das células bipolares ainda está incerta. As células horizontais, amácrinas e ganglioares evoluíram de um fotorreceptor ancestral rabdomérico. As setas representam a evolução de cada tipo celular (Modificado de Arendt, 2003)30
- Figura 7.** Representação da sequência de aminoácidos que compõem a melanopsina do anfíbio *X. laevis*. Os domínios transmembranares estão representados pelos retângulos em cinza (I-VII). Os resíduos circulos são idênticos aos das opsinas de vertebrados e invertebrados. Os resíduos quadrados correspondem ao aminoácido lisina no sítio 294 (K294), que liga o cromóforo à proteína, e a tirosina no sítio 103 (Y103) indica um local conservado em todos os invertebrados e possivelmente envolvido na estabilização do cromóforo. Nas extremidades estão os terminais carboxila (HOOC) e amina (NH₂) (Modificado de Provencio et al., 1998)31
- Figura 8.** (a) Molécula do cromóforo na sua conformação 11-cis-retinal (direita) antes da sua isomerização e all-trans-retinal (esquerda) após a isomerização sofrida em função da absorção de fótons de luz. (b) Cascata de fototransdução da melanopsina (OPN4). A fotoestimulação do cromóforo retinal (laranja) dentro do pigmento de melanopsina (amarelo) resulta em uma mudança na conformação de alguns dos sete domínios transmembrânicos (TMI-VII) para permitir a ligação e ativação de um tipo de proteína G (Gq/11), que consiste em 3 subunidades (alfa – vermelho; beta – verde e gama – azul).

Esta mudança, leva à atividade da fosfolipase C-beta 4 (PLC) (laranja claro), que catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) (complexo roxo e marrom) em Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) (roxo) e 1,2 diacilglicerol (DAG) (marrom escuro). Com isso, os níveis de PIP2 é reduzida e consequentemente ocorre uma modulação de dois canais do receptor de membrana (TRPC6 e TRPC7 – azul marinho). Como resultado, um influxo de íons Ca^{2+} e Na^{+} ativa uma série de outras proteínas do canal iônico, incluindo os canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (L-VDCCs – rosa), causando um potencial despolarizante. Modificado de Hunt, et al. 2014.....32

Figura 9. Estrutura tridimensional dos genes de melanopsina, *Opn4m* e *Opn4x* mostrando os locais sob seleção positiva desestabilizadora (círculos vermelhos) (Modificado de Borges et al., 2012)33

Figura 10. Estrutura das isoformas de melanopsina *Opn4x* e *Opn4m* de *G. gallus*. Domínios transmembranares (hélices I a VII) são indicados por caixas abertas. As isoformas de *Opn4-1* (cOPN4-1L e cOPN4-1S), compartilham uma região de 414 aminoácidos (aa) incluindo os sete domínios, mas com a região do C-terminal divergente. Da mesma forma, as três isoformas de *Opn4-2* (cOPN4-2L; cOPN4-2S e cOPN4-2SS) compartilham uma região comum de 378aa e com caudas diferentes (Modificado de Torii et al., 2007)34

Figura 11. Expressão de cinco genes da melanopsina (*opn4m-1*, *opn4m-2*, *opn4m-3*, *opn4x-1*, *opn4x-2*) na retina de peixe-zebra (*Danio rerio*) por hibridização *in situ*. RPE, Epitélio pigmentar da retina; OS, Segmento externo; IS, Segmento interno; OPL, Camada plexiforme externa; HC, célula horizontal; BC, Célula bipolar; AC, Célula amácrina; IPL, Camada plexiforme interna; RGC, Camada de células ganglionares (Davies et al., 2011)36

Figura 12. Expressão circadiana do mRNA de melanopsina. (A) Expressão da melanopsina em retina do teleosteo *A. burtoni* em regime de claro:escuro, com maiores níveis na fase clara. (B) Expressão gênica na mesma espécie, porém em um regime de escuro constante. Modificado de Grone et al., 2007. (C) Expressão gênica da melanopsina de rato, em regime de claro:escuro, mostrando o mesmo padrão que o peixe, com maiores níveis de expressão durante a fase clara (Park & Kang, 2006)37

Figura 13. Expressão gênica de melanopsina durante escuro constante. (a) Retinas de ratos albinos. Cinco dias de DD (escuro constante) aumentam o nível de mRNA da melanopsina de maneira dependente do tempo (Hannibal et al., 2005). (b) Retinas de ratos pigmentados em escuro constante. Observa-se uma mudança significativa no nível de mRNA de melanopsina em função do tempo (Hannibal et al., 2013)38

Figura 14. Alterações temporais nos níveis de mRNA de melanopsina de galinha. (A) Glândula pineal. (B) Retina. Ciclo de claro:escuro por 2 semanas e depois transferido para escuro: escuro. Cada ponto indica uma coleta. Pineal: mRNA de melanopsina flutua diariamente com níveis mais altos a noite. Retina: o nível de mRNA foi maior no início do dia (Modificado de Chaurasia et al., 2005)39

Figura 15. Expressão de mRNA das células mantidas em um regime de claro:escuro (12:12) (Modificado de Lima et al., 2011)40

Figura 16. Espécies de corujas da família Strigidae estudadas neste projeto. *Athene cunicularia* (A), *Glaucidium brasilianum* (B), *Asio clamator* (C), *Megascops choliba* (MC). Fonte: Wikiaves.....42

Figura 17. Aviário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e gaiolas onde são mantidas as corujas, com iluminação natural e câmeras para filmagens dos experimentos. Na foto à direita, um indivíduo da espécie *Glaucidium brasilianum*47

Figura 18. Gráfico de dispersão mostrando a variação da temperatura e umidade nos dias de coletas de todas as espécies de corujas. AC (), AS (), GB (), MC (). AC: <i>Athene cunicularia</i> ; GB: <i>Glaucidium brasilianum</i> ; MC: <i>Megascops choliba</i>	47
Figura 19. Parâmetros utilizados no equipamento QuantStudio 5, mostrando as temperaturas e o tempo de cada reação pelo método de Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$)	52
Figura 20. Exemplo de uma <i>melt curve</i> específica para o gene <i>Opn4x</i> da espécie <i>Athene cunicularia</i>	52
Figura 21. Alinhamento da sequência parcial de aminoácidos (287aa) da proteína OPN4x das espécies desse estudo: <i>Asio clamator</i> , <i>Glaucidium brasilianum</i> e <i>Megascops choliba</i> , com a sequência da <i>Athene cunicularia</i> (genbank: XM_026848001.1) e <i>Tyto alba</i> (genbank: XM_033004495.1). Os pontos determinam os aminoácidos comuns em todas as sequências. Os algarismos romanos com barras horizontais mostram a localização dos seis domínios transmembranares amplificados identificados na ferramenta TMPred (https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html). Os resíduos destacados em cinza são os aminoácidos conservados na melanopsina de diferentes grupos de vertebrados	56
Figura 22. Alinhamento da sequência parcial de aminoácidos (337aa) da proteína OPN4m das espécies desse estudo: <i>Megascops choliba</i> , <i>Glaucidium brasilianum</i> e <i>Asio clamator</i> , com a sequência da <i>Athene cunicularia</i> (genbank: XM_026851874.1) e <i>Tyto alba</i> (genbank: LOC104357003). Os pontos determinam os aminoácidos comuns em todas as sequências. Os algarismos romanos com barras horizontais mostram a localização dos sete domínios transmembranares identificados na ferramenta TMPred (https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html). Os resíduos destacados em cinza são os aminoácidos conservados na melanopsina de diferentes grupos de vertebrados	57
Figura 23. Análise filogenética dos genes <i>Opn4m</i> e <i>Opn4x</i> das melanopsinas de vertebrados, por máxima verossimilhança (ML). As sequências de melanopsinas das corujas estão destacadas em azul. A sequência da rodopsina de <i>Bos taurus</i> (genbank: NM_001014890.2) foi usada como grupo externo (<i>outgroup</i>). Os valores de suporte por <i>bootstrap</i> são indicados para cada nó resolvido. A barra de escala indica o número de substituições de nucleotídeo por sítio	59
Figura 24. Análise filogenética das sequências de nucleotídeos dos genes de melanopsina <i>Opn4x</i> e <i>Opn4m</i> no grupo das aves construída por meio do método de Máxima Verossimilhança. Os valores observados em cada nó correspondem aos suportes de <i>bootstrap</i> . Os ramos com valores menores que 50% não foram indicados. O grupo das corujas estudadas neste estudo está destacado em vermelho. As barras pretas identificam as famílias nas quais as corujas pertencem, sendo St: Strigidae e Ty: Tytonidae. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeo por posição	60
Figura 25. Eficiência dos <i>primers</i> de <i>Opn4x</i> para qPCR. Diluição seriada realizada para cada espécie de coruja. Eficiência de 82% ($R^2=0,9$) para <i>A. cunicularia</i> , 135% ($R^2=0,9$) para <i>A. clamator</i> , 90% ($R^2=0,9$) para <i>G. brasilianum</i> e 85% ($R^2=0,9$) para <i>M. choliba</i>	61
Figura 26. Eficiência dos <i>primers</i> de <i>Opn4m</i> para qPCR. Diluição seriada realizada para cada espécie de coruja. Eficiência de 174% ($R^2=0,7$) para <i>A. cunicularia</i> , 96% ($R^2=0,9$) para <i>A. clamator</i> , 98% ($R^2=0,9$) para <i>G. brasilianum</i> e 121% ($R^2=0,8$) para <i>M. choliba</i>	62

Figura 27. Eficiência dos *primers* do normalizador RNA18S para qPCR. Diluição seriada realizada para cada espécie de coruja. Eficiência de 174% ($R^2 = 0,7$) para *A. cunicularia*, 96% ($R^2 = 0,9$) para *A. clamator*, 98% ($R^2 = 0,9$) para *G. brasilianum* e 121% ($R^2 = 0,8$) para *M. choliba*63

Figura 28. Gráfico de dispersão da representação dos valores de expressão de *Opn4x* e *Opn4m* normalizados pelo RNA 18S. A análise estatística pelo teste Anova One Way estabeleceu diferenças significativas nas amostras e o teste de Tukey apontou maiores valores de expressão de *Opn4x* para AS (▼) em relação as demais espécies de corujas: AC (●), GB (◆) e MC (●) ($p < 0.0001$) e uma maior expressão de *Opn4m* nas espécies AS (▼), GB (◆) e MC (●) em relação com a AC (●) ($p < 0.05$). AC: *Athene cunicularia*; AS: *Asio clamator*; GB: *Glaucidium brasilianum*; MC: *Megascops choliba*. Os símbolos em preto indicam o padrão de atividade de cada espécie, sendo diurna ou noturna64

Figura 29. Cortes transversais de retinas de corujas com marcação para melanopsina OPN4m por técnica de Imunohistoquímica. Imunorreatividade das fibras nervosas na retina das espécies catemeral *A. cunicularia* (A) e diurna *G. brasilianum* (B), com anticorpo UF018 (vermelho). Imunorreatividade na camada de fotorreceptores (CF), na retina das espécies *A. cunicularia* (C), *G. brasilianum* (D) e noturna *T. furcata* (E) com anticorpo UF019 (vermelho). Imunorreatividade da CCG de *G. brasilianum* (F) e *T. furcata* (G), com anticorpo UF017 (vermelho). Marcação dos núcleos celulares em azul, com DAPI. CF, Camada de Fotorreceptores; CNE, Camada Nuclear Externa; CNI, Camada nuclear interna; CCG, Camada de Células Ganglionares. Barras de escala: 40µm66

Figura 30. Cortes transversais de retinas de corujas marcando a melanopsina OPN4x por técnica de Imunohistoquímica. Marcação da CNI e CCG em vermelho, das espécies *A. cunicularia* (A) e *T. furcata* (B) e da CFN da espécie *G. brasilianum* (C), com o anticorpo OPN4x1. Marcação da CF em vermelho na espécie *G. brasilianum* (D), e na CF, uma pequena marcação na CNE e na CCG da retina de *T. furcata* (E), com o anticorpo OPN4x2 (região C-terminal). Controle negativo não identificando marcação inespecífica do anticorpo secundário (F). Marcação dos núcleos celulares em azul, com DAPI. CF, Camada de Fotorreceptores; CNE, Camada Nuclear Externa; CNI, Camada nuclear interna; CCG, Camada de Células Ganglionares. Barras de escala: 40µm68

Figura 31. Expressão de *Opn4x* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em fotoperíodo 12C:12E. Cada barra representa os valores de transcrição do gene *Opn4x* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor de escuro constante, que corresponde a 100%. (a) indica que $p < 0.05$ em relação a (b) ($n=6$ culturas primárias). A flecha em preto identifica o ZT3, que corresponde à 12h (Lima, et al. 2011)75

Figura 32. Expressão de *Opn4m* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em fotoperíodo 12C:12E. Cada barra representa os valores de transcrição do gene *Opn4x* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor escuro constante, que corresponde a 100%. (a) indica que $p < 0.05$ em relação a (b) ($n=6$ culturas primárias) (Lima, et al. 2011)76

Lista de Tabelas

Tabela 1. Informações sobre as espécies de corujas obtidas para estudo.

Tabela 2. Descrição dos *primers* utilizados para amplificar os genes expressos em retinas de corujas.

Tabela 3. Descrição dos *primers* utilizados para a quantificação da expressão gênica das melanopsinas em retinas de corujas.

Tabela 4. Anticorpos primários e secundário utilizados na marcação de OPN4x e OPN4m (*Bethyl Laboratories*).

Tabela 5. Descrição das homologias apresentadas entre a sequência peptídica de OPN4m com a melanopsina e demais proteínas das espécies *A. cunicularia* e *T. alba*.

Tabela 6. Resultados da imunohistoquímica para a melanopsina OPN4m nas retinas das corujas do presente trabalho.

Tabela 7. Descrição das homologias apresentadas entre a sequência peptídica de OPN4x de *G. gallus* com a melanopsina das espécies *A. cunicularia* e *T. alba*.

Tabela 8. Resultados da imunohistoquímica para a melanopsina OPN4x nas retinas das corujas do presente trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	18
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Ritmos biológicos e o Sistema de Temporização Circadiano.....	20
1.2. Organização retiniana e células fotossensíveis de vertebrados	23
1.3. Fotopigmento melanopsina e o ritmo circadiano	26
1.3.1. Estrutura da melanopsina e o processo de fototransdução	29
1.3.2. Evolução e genética da melanopsina.....	32
1.3.3. Expressão gênica da melanopsina na retina	34
1.4. Strigiformes: Caracterização e diversidade ecológica	40
2. JUSTIFICATIVA.....	42
3. OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1. Coleta do material	44
4.2. Genética das melanopsinas	45
4.2.1. Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA)	45
4.2.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	46
4.2.3. Purificação e sequenciamento de cDNA	47
4.2.4 Análises Filogenéticas.....	48
4.2.5 PCR quantitativa (qPCR)	48
4.3. Morfologia: Imunohistoquímica	51
5. RESULTADOS	54
5.1. Identificação dos genes das melanopsinas de corujas.....	54
5.2. Análises filogenéticas	56
5.3. Quantificação gênica das melanopsinas	58
5.4. Análises morfológicas.....	62
5.4.1. OPN4m	62
5.4.2. OPN4x	65
6. DISCUSSÃO.....	68
6.1. Caracterização dos genes de melanopsina em corujas.....	69
6.2. Níveis de expressão gênica da melanopsina em corujas.....	71
6.3. Localização das melanopsinas nas retinas de corujas.....	75

6.3.1. OPN4m.....	76
6.3.2. OPN4x.....	77
7. CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXO 1.....	87
ANEXO 2.....	88
ANEXO 3.....	90
APÊNDICE 1.	94
APÊNDICE 2.	95
APÊNDICE 3.	97

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ritmos biológicos e o Sistema de Temporização Circadiano

Os vertebrados apresentam padrões de atividades que estão associados com fatores ecológicos bióticos e abióticos (Wood; Loudon, 2014). Variações destes fatores, como período do dia, luminosidade, temperatura, umidade, predação ou distúrbios antrópicos podem resultar em mudanças nos parâmetros fisiológicos, comportamentais e/ou bioquímicos exibidos pelos seres vivos (Lima, 2011; Díaz et al., 2014). Estes padrões de variação intrínsecos dos organismos são definidos como ritmos biológicos e, de acordo com seu intervalo, podem ser denominados como ultradiano, circadiano ou infradiano (Herrero et al., 2003). O ritmo ultradiano é aquele que ocorre em intervalos de até 20 horas, o circadiano se repete entre 20 a 28 horas e o infradiano é o ciclo que varia em intervalos maiores que 28 horas (Herrero et al., 2003; Veras et al., 2013; Schulz; Leuchtenberger, 2006).

Os diferentes ritmos circadianos exercem uma importância evolutiva para os organismos, auxiliando-os fisiologicamente para as possíveis mudanças ambientais (Enright, 1970), e também podem atuar como um *zeitgeber* no organismo dos seres vivos. Este termo tem origem alemã (*zeit*: tempo e *geber*: doador), e é utilizado cientificamente para se referir a elementos ambientais ou sociais sincronizadores, ou seja, capazes de interferir nos ciclos endógenos. Dentre esses sincronizadores, temos o ciclo de alternância de claro e escuro (claro:escuro), temperatura, estresse, alimentação e interação social (Ehlers, et al., 1988; Grandin et al., 2006).

Dentre estes sincronizadores, o ciclo claro:escuro é o principal sinal ambiental utilizado pelos seres vivos (Wood; Loudon, 2014). Estudos realizados em peixes mostraram a influência deste ciclo na atividade locomotora dos animais. O peixinho-dourado *Carassius auratus* e o peixe-zebra *Danio rerio*, se locomovem com uma maior frequência durante o período de luz sendo, portanto, classificados como diurnos (Lopez-Olmeda et al., 2006; Blanco-Vives & Sánchez-Vázquez, 2009). Em outro estudo realizado por Bayarri e colaboradores (2004) com o peixe linguado *Solea senegalensis*, os pesquisadores observaram uma acentuação da atividade locomotora em períodos de baixa luminosidade e, por essa razão, o peixe linguado foi classificado como noturno.

É comum a presunção errônea de que mamíferos, especificamente roedores subterrâneos, que habitam tocas com pouca ou nenhuma iluminação e com baixa variação de temperatura, não apresentam um ritmo cíclico que acompanha as mudanças ambientais. Valentinuzzi e colaboradores (2009) investigaram o padrão de ritmo

circadiano no roedor tuco-tuco *Ctenomys cf. knighti*, o qual vive em galerias subterrâneas superficiais, sob luminosidade e temperatura controlados, e foi revelado um padrão rítmico evidente e preciso de sono e vigília. Quando submetido aos regimes de claro:escuro e escuro constante, o animal apresentou uma maior atividade nos períodos de ausência de luz, característico de animais noturnos.

Entretanto, a despeito das constatações laboratoriais, observações *in situ* conduzidas pelo mesmo grupo de estudos identificaram divergências sazonais no padrão de atividades apresentado pela espécie. As observações ao longo do verão, nos anos de 2010 e 2011, identificaram um aumento do padrão de atividade da espécie no início da manhã. Embora este mesmo comportamento tenha sido observado em ambos os verões, durante o ano de 2010 as saídas se estenderam, ao longo do dia, em sua maior parte. Já no inverno, os animais saíam de suas tocas preferencialmente no período da tarde, com saídas mais frequentes em relação ao observado no verão (Figura 1) (Tomotani, 2011). Trabalhos realizados com outras espécies de tuco-tuco mostraram também que na natureza, os animais podem apresentar um ritmo diurno de atividade, mas também podem ser arrítmicos (Luna & Antinuchi, 2003; Cutrera et al., 2006). Esta possível divergência pode estar relacionada com os fatores ambientais que em campo não são possíveis de se controlar e, conseqüentemente, influenciam o ritmo diário do animal.

Figura 1. Comparação do tempo gasto na superfície pelo tuco-tuco *Ctenomys cf. knighti* durante as horas de claro do dia, em cada uma das estações (Tomotani, 2011).

De modo geral, estes padrões de organização circadiana dependem da interação entre três estruturas que compõem o Sistema de Temporização Circadiano (STC): a retina; o núcleo supraquiasmático (NSQ) e a glândula pineal. A retina é um tecido localizado na camada mais interna do olho dos vertebrados e é responsável pela captação e início do processamento da informação luminosa proveniente do ambiente por meio das vias aferentes. Posteriormente, esta informação é enviada para o núcleo supraquiasmático

(NSQ), estrutura localizada no hipotálamo e conhecido como o relógio biológico dos mamíferos, e chega a glândula pineal, posicionada na parte central do cérebro que por sua vez é a última estrutura que participa no STC pelas vias de comunicação eferentes (Menaker et al., 1997; Bonmati-Carrion et al., 2016; Pfeffer et al., 2017).

Os mamíferos apresenta estas estruturas compondo o STC, com exceção do grupo das aves (Underwood et al., 2001). O sistema de organização temporal nas aves é composto por dois principais núcleos: o núcleo medial hipotalâmico (MNH), e o núcleo hipotalâmico retinocepiante lateral (LHRN), referente ao NSQ visual, sendo os possíveis homólogos do NSQ de humanos (Underwood et al., 2001). Até o momento, ainda não está claro como essa informação é integrada entre os diferentes componentes do sistema circadiano e qual seria o papel de cada um dos dois núcleos presentes em aves. Outro ponto, é que a comunicação entre o NSQ e os relógios periféricos é realizada através de uma combinação de sinais humorais e conexões neurais diretas, que são menos compreendidas em aves em relação aos estudos com mamíferos. Estes sinais humorais afetam diretamente funções hipotalâmicas, enquanto as projeções neurais se dirigem para o sistema nervoso central e periférico, impactando na modulação de uma série de funções fisiológicas periféricas, que incluem a glândula pineal (Cassone, 2014).

Diferente das aves, este sistema de conexão retina- hipotálamo- glândula pineal, em mamíferos, já está bem descrito na literatura. Ao atingir os olhos dos organismos, a informação luminosa é processada na retina, por meio da ativação de fotorreceptores, que transformam esse estímulo fótico em sinal neural. Essa informação é direcionada ao nervo óptico e, em seguida trafega para as vias visuais e não visuais, através do trato genículo-hipotalâmico (TGH) e do trato retino-hipotalâmico (TRH), respectivamente (Boden; Kennaway, 2006). Quando a informação luminosa chega no NSQ através do TRH, o núcleo promove a geração de um ritmo. O NSQ é ativado e libera o neurotransmissor GABA na via que é formada pelo núcleo paraventricular (PVN) e pela medula espinhal, levando estas informações para a glândula pineal, que libera noradrenalina durante a noite, modulando a síntese de melatonina (Figura2) (Sousa et al., 2008). A luz incidente ao longo do dia na retina, provoca um estímulo inibitório na glândula pineal e, consequentemente não ocorre a produção de melatonina. Dessa maneira, o animal permanece em estado de vigília. Quando anoitece, ocorre liberação de neurotransmissores que ocasionam um estímulo excitatório na glândula pineal e assim, a síntese de

melatonina é amplificada, fazendo com que o organismo entre em estado de sono (Mirick; Davis, 2008).

Figura 2: Representação esquemática da via de sinalização Retina-NSQ-Glândula pineal. O estímulo luminoso é inicialmente enviado da retina para o Núcleo Supraquiasmático (NSQ) por meio do trato retino-hipotalâmico (TRH). O NSQ exerce uma modulação sobre a via que é formada pelo núcleo paraventricular (PVN) e o sinal percorre este núcleo até o núcleo intermédio lateral, passando para o gânglio cervical superior que transmite o sinal para a glândula pineal. Fonte: Tavares, 2015.

1.2. Organização retiniana e células fotossensíveis de vertebrados

No STC o sinal luminoso do ambiente é processado primeiramente na retina, a qual está situada na parte posterior do globo ocular. A retina é uma complexa estrutura com organização laminar que permite o fluxo das informações visuais, e está organizada em dez camadas paralelas formadas por corpos celulares e plexos nervosos. Da camada mais externa para a mais interna no sentido do processamento visual, pode-se listar: epitélio pigmentado (EP), camada dos fotorreceptores (cones e bastonetes) (CF), membrana limitante externa (MLE), camada nuclear externa (CNE), camada plexiforme externa (CPE), camada nuclear interna (CNI), camada plexiforme interna (CPI), camada

de células ganglionares (CCG), camada de fibras nervosas (CFN) e membrana limitante interna (MLI) (Figura 3) (Ramón y Cajal, 1893).

Figura 3. Corte histológico com coloração Hematoxilina-Eosina (HE) da retina da espécie de coruja *Athene cunicularia*. As camadas da retina que estão identificadas são: EP epitélio pigmentado; CF, camada de fotorreceptores; CNE, camada nuclear externa; CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CCG, camada de células ganglionares. Modificado de Pinto et al., 2016.

Diferentes tipos de células fotossensíveis estão presentes na retina dos vertebrados. Na camada de fotorreceptores (CF), são encontrados os fotorreceptores clássicos, os cones e os bastonetes. Estas células são formadas por três estruturas: segmento externo, onde estão localizados as proteínas fotossensíveis denominadas opsinas, responsáveis pela absorção de luz; segmento interno, com organelas citoplasmáticas e o elipsoide, onde se encontram as mitocôndrias; e terminal sináptico, responsável pelas interações dos fotorreceptores na CPE com os neurônios de segunda ordem, localizados na CNI (Figura 4) (Bowmaker, 1998). Os cones possuem menor sensibilidade à luz, contribuindo para a visão fotópica; e os bastonetes, respondem à baixa intensidade de luz, ou seja, são mais sensíveis à luz e contribuem prioritariamente na visão escotópica.

Figura 4. Representação do corte transversal de fotorreceptores (cones e bastonetes) da retina de vertebrados. Na figura está identificado o segmento externo e seus discos membranosos, o elipsoide onde contém as mitocôndrias, o núcleo, o segmento interno e o terminal sináptico em forma de pedículo, nos cones e em forma de bastão, nos bastonetes. Modificado de Burns & Lamb, 2003.

Células fotossensíveis também podem ser encontradas na camada nuclear interna e na camada de células ganglionares. Estas células possuem propriedades diferentes daquelas encontradas nos fotorreceptores clássicos. Em aves, as células amácrinas e horizontais localizadas na camada nuclear interna respondem à luz (Morera et al., 2016) e, na camada de células ganglionares existe uma subpopulação fotossensível, denominada célula ganglionar retiniana intrinsecamente fotossensível (ipRGCs), que expressa o fotopigmento melanopsina e projeta seus axônios para o núcleo supraquiasmático (NSQ) (Provencio et al., 2000; Berson et al., 2002; Berson et al., 2010; Morera et al., 2016). Em mamíferos, destas células, 95% se encontram na camada de células ganglionares, e seus dendritos formam 2 plexos nas camadas plexiformes externa (CPE) e interna (CPI) da retina. Os outros 5% constituem células ganglionares deslocadas localizadas na camada nuclear interna (CNI) (Berson et al., 2010).

A propriedade fotossensível destas células (fotorreceptores clássicos e das ipRGCs) é mediada por diferentes fotopigmentos. Nos cones e bastonetes, os fotopigmentos são classificados em cinco grupos, sendo LWS, SWS1, SWS2 e RH2 geralmente expressos em cones e o RH1 geralmente expresso em bastonete. A expressão

destes fotopigmentos pode diferenciar entre as classes de vertebrados (Yokoyama, 2008, 1996, 2000; Ebrey & Takahashy, 2002). Estes pigmentos visuais são compostos por uma proteína de membrana, a opsina, e por um cromóforo, o retinal, derivado da vitamina A (Bowmaker, 1991). A opsina é um receptor de membrana pertencente à família dos receptores acoplados à proteína G e é formado por cerca de 360 aminoácidos com sete domínios transmembrânicos. O retinal se liga na proteína por meio de uma base Schiff e do aminoácido lisina, localizado na posição 296, no sétimo domínio transmembrânico (Shapley & Hawken, 2011; Cowing et al., 2002). O fotopigmento presente nas ipRGCs, denominado melanopsina, é da família das opsinas, é formado por cerca de 600 aminoácidos e também possui sete domínios transmembrânicos. A melanopsina medeia o sinal transmitido da retina para o oscilador central dos mamíferos (NSQ), enviando sinalização de claro e escuro, regulando assim, os ritmos circadianos (Provencio et al., 1998, 2000; Sousa et al., 2008).

1.3. Fotopigmento melanopsina e o ritmo circadiano

Desde a década de 1930, pesquisadores descreveram a resposta de células pigmentadas a estímulos luminosos (Bagnara, 1957, 1974, Bagnara; Obika, 1967; Hogben; Slome, 1931, Iga; Takabatake, 1983). A fim de identificar qual o fotopigmento responsável por essa fotossensibilidade, Provencio e colaboradores (1998) conduziram estudos genéticos nos melanóforos e encontraram uma nova sequência de aminoácidos de um pigmento fotossensível, reconhecido como melanopsina (OPN4). Estudos subsequentes identificaram sua presença em outros tecidos do anfíbio, como no cérebro, além de outras estruturas oculares, como na íris e na CNI da retina (Provencio et al., 1998; 2000).

Atualmente, sabe-se que a melanopsina é expressa em diferentes grupos de vertebrados (Bailey & Cassone, 2005; Chaurasia et al., 2005; Lima et al., 2006; Davies et al., 2011; Hauzman et al., 2019). Em mamíferos, foi identificada na retina de humanos e camundongos uma variante com homologia (identidade) de 57% em relação a proteína melanopsina descrita no anfíbio *Xenopus* (Berson et al., 2002, 2010). Na retina da galinha (*Gallus gallus*), foi observado um padrão de expressão diferente do encontrado em camundongos, com uma quantidade pequena de melanopsina na camada de células ganglionares e uma grande quantidade na camada nuclear interna (nas células bipolares e horizontais) e na camada de fotorreceptores, por meio das técnicas de hibridização *in situ*

(Bailey & Cassone, 2005; Chaurasia et al., 2005) e ensaio imunocitoquímico (Lima et al., 2006) (Figura 5). O mesmo padrão de expressão de RNA mensageiro (mRNA) da melanopsina encontrado nas aves foi observado também na cobra-espada (*Tomodon dorsatus*), em todas as camadas nucleares da retina e no nervo óptico, destacando um grande número de cones que expressam a melanopsina apenas na borda da retina (*ora serrata*), sugerindo uma co-expressão da melanopsina com as opsinas visuais (Hauzman et al., 2019). Em teleósteos também foi observada a expressão da melanopsina em todas as camadas nucleares, incluindo a camada de fotorreceptores (Davies et al., 2011).

Figura 5. Expressão do mRNA da melanopsina com hibridização *in situ*. (A) Histoquímica de hibridização *in situ* de OPN4 e (B) Hibridização *in situ* na retina de galinha *Gallus gallus* com maior intensidade na Camada nuclear interna (INL), Camada de fotorreceptores (PL) e na Camada de células ganglionares (GCL). Barra de escala: 50µm. Modificado de Chaurasia et al., 2005; Bailey & Cassone, 2004.

Diante da descoberta das ipRGCs e localização da melanopsina, uma das primeiras funções relatadas foi a de que, possivelmente, este fotopigmento que apresenta uma sensibilidade espectral com pico em 480nm, estaria envolvido no controle do reflexo pupilar e no ajuste do ritmo circadiano dos vertebrados (Provencio et al., 1998; 2000; Lucas et al., 2001). Em relação ao ajuste do ritmo circadiano, Panda e colaboradores (2003) estudaram esta função comparando grupos de camundongos selvagens e nocaute: alguns desprovidos de cones e bastonetes, outros de melanopsina e outros de cones, bastonetes e melanopsinas. Os resultados mostraram que a melanopsina expressa na retina é essencial para a sincronização do ritmo circadiano. Sob condições de escuro constante os animais apresentaram um período locomotor circadiano inferior a 24 horas. No entanto, em um ciclo de claro:escuro, a entrada para o oscilador faz um pequeno ajuste em cada ciclo e sincroniza o relógio para um período de 24 horas exatas. Ao anular somente o gene da melanopsina, ocorreu apenas um declínio na resposta dos animais aos

ciclos circadianos, revelando que a atividade dos fotorreceptores clássicos pode compensar relativamente a perda da fotossensibilidade das ipRGCs. Entretanto, ao anular tanto a atuação dos fotorreceptores clássicos, quanto da melanopsina o ciclo dos animais ficou totalmente descontrolado. Este resultado mostra que a atividade da melanopsina é essencial para a regulação dos ritmos circadianos (Panda et al., 2003).

Em trabalhos realizados com a codorna *Coturnix japonica* (Underwood & Siopes, 1984; Underwood et al., 1990), foi examinado o efeito da remoção da glândula pineal e dos olhos a fim de identificar o efeito da atividade circadiana. As aves foram expostas a ciclos de 24h (claro:escuro) ou escuro constante. A remoção apenas da pineal não influenciou o ritmo de atividade das codornas em regime de claro:escuro e escuro constante. Por outro lado, a remoção dos olhos teve um efeito importante em ambos os regimes de ciclo. Um terço das aves cegas apresentou um arrastamento sob claro:escuro, ou seja, sofreu um deslocamento na sua fase de atividade devido a atuação do ciclo ambiental no oscilador circadiano, enquanto, dois terços eram arrítmicas. Os efeitos da pinealectomia podem ser vistos apenas quando a pinealectomia é combinada com a cegueira. O fato de que a cegueira perturba a organização circadiana nos regimes de claro:escuro e escuro constante, indica que os olhos devem atuar como componentes principais do sistema circadiano da codorna (Underwood & Siopes, 1984; Underwood et al., 1990).

Embora os estudos sobre a melanopsina apresentados até o momento resultem em respostas que induzem a classificação dessa proteína como fotopigmento não visual, um estudo realizado por Barnard e colaboradores (2006) demonstrou pela primeira vez uma regulação dependente da melanopsina no processamento visual em retinas de camundongos. Nestes animais, as células que expressam melanopsina na camada de células ganglionares também apresentam comunicação com as células da camada nuclear interna e podem contribuir na codificação de imagens visuais, sob escalas espaciais moderadas além da percepção de cores e brilho (Allen et al., 2017; Lucas et al., 2020).

Em algumas espécies de vertebrados, a melanopsina também foi detectada em outros tecidos, como pulmão, rim, fígado e músculo (Dearworth et al., 2011; Frigato et al., 2006; Cheng; Tsunenari; Yau, 2009). A razão específica da expressão deste fotopigmento em diferentes órgãos ainda não foi totalmente esclarecida, entretanto, evidências apontam que a melanopsina pode atuar como um sensor para o controle da

temperatura corporal e indução do sono nos organismos (Moraes et al., 2017; Rupp et al., 2019). Assis e colaboradores (2016) mostraram, pela primeira vez a presença da melanopsina em células da pele de camundongos em que a estimulação de radiação ou luz branca ocasiona um aumento na expressão dos genes do relógio, e pode atuar também como um sensor de radiação de UVA (de Assis et al., 2018; 2020). A partir dos estudos realizados até o momento, foi possível observar que este fotopigmento exerce grande relevância nos processos fisiológicos e neurológicos dos vertebrados sendo, portanto, imprescindível o reconhecimento de sua fisiologia e das estruturas que medeiam a fototransdução.

1.3.1. Estrutura da melanopsina e o processo de fototransdução

De maneira geral, os fotorreceptores da retina podem ser classificados como rabdomérico ou ciliares (Arendt, 2003). De acordo com estudos filogenéticos, as melanopsinas apresentam homologia de 30% com as sequências de opsinas ciliares, presentes nos cones e bastonetes, entretanto, possuem maior similaridade com as opsinas rabdoméricas, cerca de 39% (Provencio et al., 1998). Esta semelhança discretamente maior se deve ao fato de que a melanopsina é geralmente expressa pelas células horizontais e células ganglionares da retina que por sua vez, evoluíram a partir de fotorreceptores rabdoméricos (Figura 6) (Arendt, 2003).

Mesmo com estruturas comuns, a fotosensibilidade da melanopsina é diferente das opsinas visuais, pelo fato de apresentar maior semelhança com a opsina dos invertebrados. A melanopsina é formada por sete domínios transmembranares, três alças intracelulares e três alças extracelulares, um terminal carboxila (C) e um terminal amina (N) (Figura 7) (Bellingham et al., 2006; Díaz et al., 2016).

Figura 6. Diversificação dos tipos de células na retina dos vertebrados. Os fotorreceptores (cones e bastonetes) são fotorreceptores ciliares. A evolução das células bipolares ainda está incerta. As células horizontais, amácrinas e ganglionares evoluíram de um fotorreceptor ancestral rabdomérico. As setas representam a evolução de cada tipo celular. Modificado de Arendt, 2003.

Figura 7. Representação da sequência de aminoácidos que compõem a melanopsina do anfíbio *X. laevis*. Os domínios transmembranares estão representados pelos retângulos em cinza (I-VII). Os resíduos circulados são idênticos aos das opsinas de vertebrados e invertebrados. Os resíduos quadrados correspondem ao aminoácido lisina no sítio 294 (K294), que liga o cromóforo à proteína, e a tirosina no sítio 130 (Y130) indica um local conservado em todos os invertebrados e possivelmente envolvido na estabilização do cromóforo. Nas extremidades estão os terminais carboxila (HOOC) e amina (NH₂). Modificado de Provencio et al., 1998.

No processo de fototransdução da melanopsina, quando o cromóforo retinal é exposto a ambientes ausentes de luz, sua conformação é a de 11-*cis*. Quando um feixe de luz incide sobre o cromóforo, ocorre o início do processo do fototransdução, a partir da transdução do sinal luminoso em sinal eletroquímico. A luz ocasiona a fotoisomerização do cromóforo, que muda sua conformação para *all-trans*-retinal (Figura 8a). As opsinas presentes nos fotorreceptores rabdoméricos ativam a proteína Gq que atua ativando a cascata de transdução do sinal mediada pela fosfolipase C-beta 4 (PLC). A PLC promove a divisão do fosfatidilinositol-4- -5-bisfosfato (PIP²) em dois mensageiros intracelulares, o trifosfato de inositol (IP³) e o diacilglicerol (DAG). Essas moléculas de sinalização ativam vias de transdução do sinal que levam a abertura de canais catiônicos não seletivos, os quais permitem a entrada de Ca²⁺ e Na⁺ na célula e a formação do potencial receptor despolarizante. Este potencial despolarizante induz acréscimo na liberação de

neurotransmissor pela célula fotorreceptora, enviando um sinal ao sistema nervoso que é posteriormente interpretado como luz (Figura 8b) (Moyes & Schulte, 2010).

Figura 8. (a) Molécula do cromóforo na sua conformação 11-cis-retinal (direita) antes da sua isomerização e *all-trans*-retinal (esquerda) após a isomerização sofrida em função da absorção de fótons de luz. **(b)** Cascata de fototransdução da melanopsina (OPN4). A fotoestimulação do cromóforo retinal (laranja) dentro do pigmento de melanopsina (amarelo) resulta em uma mudança na conformação de alguns dos sete domínios transmembrânicos (TMI-VII) para permitir a ligação e ativação de um tipo de proteína G (Gq/11), que consiste em 3 subunidades (alfa – vermelho; beta – verde e gama – azul). Esta mudança leva à atividade da fosfolipase C-beta 4 (PLC) (laranja claro), que catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2) (complexo roxo e marrom) em Inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) (roxo) e 1,2 diacilglicerol (DAG) (marrom escuro). Com isso, os níveis de PIP_2 são reduzidos e consequentemente ocorre uma modulação de dois canais do receptor de membrana (TRPC6 e TRPC7 – azul marinho). Como resultado, um influxo de íons Ca^{2+} e Na^+ ativa uma série de outras proteínas do canal iônico, incluindo os canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (L-VDCCs – rosa), causando um potencial despolarizante. Modificado de Hunt et al. 2014.

1.3.2. Evolução e genética da melanopsina

A partir da avaliação do genoma de diferentes classes de vertebrados, Bellingham e colaboradores (2006) encontraram dois genes parálogos que codificam a melanopsina (Figura 9). Os animais não mamíferos geralmente apresentam em seu genoma dois genes codificadores de melanopsina, um com sequência semelhante à encontrada em mamíferos, denominado *Opn4m* (*Mammalian-like*) e outro gene semelhante à sequência de *Xenopus*, denominado *Opn4x* (*Xenopus-like*). Análises filogenéticas revelaram uma semelhança de 66% entre as sequências dentro de cada grupo de genes *Opn4*, enquanto, uma semelhança baixa de cerca de 55% entre os grupos de genes *Opn4x* e *Opn4m* foi observada. As relações filogenéticas sugerem que o gene da melanopsina sofreu um evento de duplicação em cerca de 600 milhões de anos atrás e que eles são parálogos um ao outro na linhagem dos vertebrados, ou seja, são genes homólogos com funções diferentes que divergiram dentro de uma espécie (Torii et al., 2007; Borges et al., 2012).

Figura 9. Estrutura tridimensional das proteínas OPN4m e OPN4x mostrando os locais sob seleção positiva desestabilizadora (círculos vermelhos). Modificado de Borges et al., 2012.

Dentre os vertebrados, os mamíferos perderam o gene *Opn4x* e mantiveram apenas o gene *Opn4m* em um evento que ocorreu no início da história evolutiva deste grupo (Provencio et al., 2000). Na classe dos répteis, a expressão do gene *Opn4x* foi descrita em serpentes e lagartos (Frigato et al., 2006; Castoe et al., 2013; Schott et al., 2018; Hauzman et al., 2019). Estudos mostraram ainda que os genes da melanopsina podem apresentar diversas isoformas em camundongo (Pires et al., 2009), cefalocordados

(Koyanagi et al., 2005), teleósteo (Sandbakken et al., 2012) e aves (Torii et al., 2007, Tomonari et al., 2006, Hanna et al., 2017). No caso das aves, foi observada a expressão dos dois genes em diferentes tecidos. Torii e colaboradores (2007) realizaram estudos genéticos na glândula pineal de *Gallus gallus* e descobriram a presença de múltiplas variáveis de mRNA que codificam diferentes isoformas proteicas de cada um dos genes: cOPN4-1L (com uma cauda longa) e cOPN4-1S (com cauda curta) do gene *Opn4-1*, que corresponde ao *Opn4x*, e cOPN4-2L (longa), cOPN4-2S (curta) e cOPN4-2SS (super curta) do gene *Opn4-2*, que corresponde ao *Opn4m*. Como a cauda terminal de cOPN4-2SS é extremamente curta, os autores constataram que essa isoforma pode estar inativa (Figura 10).

Figura 10. Estrutura das isoformas de melanopsina *Opn4x* e *Opn4m* de *G. gallus*. Domínios transmembranares (hélices I a VII) são indicados por caixas abertas. As isoformas de *Opn4-1* (cOPN4-1L e cOPN4-1S), compartilham uma região de 414 aminoácidos (aa) incluindo os sete domínios, mas com a região do C-terminal divergente. Da mesma forma, as três isoformas de *Opn4-2* (cOPN4-2L; cOPN4-2S e cOPN4-2SS) compartilham uma região comum de 378aa e com caudas diferentes. Modificado de Torii et al., 2007.

Na retina da galinha também foram descritas duas isoformas de *Opn4x*, uma curta (S) com 425 aminoácidos e uma longa (L) com 543 aminoácidos. A isoforma curta é formada devido a uma inserção de 86 pares de bases no éxon 8, levando a um *stop codon* prematuro, após o nucleotídeo 1242 (Tomonari et al., 2005). Da mesma forma do observado em aves, em camundongos também foram encontradas duas isoformas de *Opn4m*, a OPN4-S e a OPN4-L, resultantes de um *splicing* alternativo (Pires et al., 2009). A parte que difere as sequências destas melanopsinas uma da outra é o C-terminal que, nos camundongos, são expressas em diferentes tipos de células ganglionares (M1 e M2) (Hughes et al., 2012; Schmidt et al., 2011; Quattrochi et al., 2013).

Em aves noturnas, os genes codificantes da melanopsina também foram avaliados. A partir da análise do transcriptoma da coruja-do-norte (*Strix occidentalis caurina*), Hanna e colaboradores (2017) mostraram evidências de isoformas de *Opn4m* nas

sequências do transcriptoma e, algumas destas isoformas possuíam mutações de inativação, sugerindo a perda de algumas delas em outras aves, como por exemplo, na coruja *Tyto alba* onde não foram encontradas isoformas dos genes da melanopsina em seu genoma.

A fim de estudar a função da melanopsina nas células horizontais da retina, Morera e colaboradores (2016) analisaram culturas de células de *Gallus gallus* e observaram que existe um tipo de células horizontais classificadas como PROX1 que apresenta fotossensibilidade por meio da expressão do gene de melanopsina *Opn4x*. Os autores concluíram que o *Opn4x* é responsável por desencadear uma despolarização das células horizontais contendo melanopsina, com aumentos significativos de Ca^{2+} , além de regular o feedback negativo e contribuir para a regulação do potencial de membrana, modulando a função visual. Portanto, em retinas de aves, o *Opn4x* encontrado em células horizontais pode exercer uma função dupla: a de regular tarefas não visuais, como as ipRGCs e realizar interações laterais com os fotorreceptores clássicos, como as células horizontais típicas, aumentando significativamente a complexidade dos circuitos neurais da retina para a percepção de luz e processamento visual (Morera et al., 2016). No entanto, as funções de cada uma dessas isoformas nas diferentes classes dos vertebrados ainda permanecem incertas, e mais estudos precisam ser realizados para a compreensão sobre o papel deste fotopigmento nas atividades fisiológicas dos organismos.

1.3.3. Expressão gênica da melanopsina na retina

A expressão dos genes de melanopsina *Opn4x* e *Opn4m* na retina pode variar entre diferentes espécies de vertebrados. Davies e colaboradores (2011) demonstraram, através da técnica de hibridização *in situ*, a expressão de cinco genes de melanopsinas em retinas do peixe-zebra (*Danio rerio*): *Opn4m1*, *Opn4m2*, *Opn4m3*, *Opn4x1* e *Opn4x2* (Figura 11). Em répteis, Dearworth e colaboradores (2011) descreveram a expressão do gene *Opn4m* em retinas da tartaruga-de-orelha-vermelha (*Trachemys scripta elegans*) com a mesma imunohistoquímica. A sequência de aminoácidos encontrada foi semelhante à do *Opn4m* de *Gallus gallus* e a quantificação da expressão de melanopsina, em *T. s. elegans* foi maior na retina em comparação com sua expressão em outros órgãos (músculo, fígado

e pulmão). Em serpentes foi observada a expressão do gene *Opn4x* na retina, mas nenhuma expressão de melanopsinas em tecidos extraoculares (Hauzman et al., 2019).

Figura 11. Expressão de cinco genes parálogos da melanopsina (*opn4m-1*, *opn4m-2*, *opn4m-3*, *opn4x-1*, *opn4x-2*) na retina de peixe-zebra (*Danio rerio*) por hibridização *in situ*. RPE, Epitélio pigmentar da retina; OS, Segmento externo; IS, Segmento interno; OPL, Camada plexiforme externa; HC, célula horizontal; BC, Célula bipolar; AC, Célula amácrina; IPL, Camada plexiforme interna; RGC, Camada de células ganglionares. Davies et al., 2011.

Na retina do teleosteo *Astatotilapia burtoni*, foi investigada a influência da luz sobre a expressão do gene *Opn4x*. Durante uma semana, o animal foi mantido em escuro constante e neste período, os níveis de expressão gênica se mantiveram sem oscilação significativa entre os horários de coleta. Entretanto, quando uma espécie foi mantida em ciclo de claro:escuro, foi observado um padrão flutuante significativo de expressão do *Opn4x*, com pico no período da tarde, indicando que a iluminação ambiente de fato influencia no padrão de expressão dos genes de melanopsina (Grone et al., 2007).

Este ritmo encontrado no peixe foi o mesmo que o observado em retinas de rato, com maior expressão de *Opn4m* durante o dia em relação ao observado durante a noite (Figura 12) (Park & Kang, 2006). Em ratos albinos foi verificado que em escuro constante o nível de mRNA da melanopsina aumenta significativamente durante os 5 dias em que as retinas foram expostas nesta condição. Quando colocadas no regime de luz constante, o nível de expressão nas primeiras 24h não sofreu alteração, porém, no segundo dia a expressão começou a diminuir gradativamente, chegando a quase ser suprimida após os dias de exposição (Hannibal et al., 2005). Este padrão pode estar associado a pigmentação

da retina, uma vez que se diferencia quando comparado a ratos com retinas pigmentadas. Neste caso, quando os animais são submetidos a escuro constante, há uma oscilação da expressão da melanopsina, mostrando que essa mudança é causada por um relógio circadiano interno, e não pelo fator ambiental, diferente do encontrado em ratos albinos (Figura 13) (Hannibal et al., 2013).

Figura 12. Expressão circadiana do mRNA de melanopsina. (A) Expressão da melanopsina em retina do teleosteo *A. burtoni* em regime de claro:escuro, com maiores níveis na fase clara. (B) Expressão gênica na mesma espécie porém em um regime de escuro constante. Modificado de Grone et al., 2007. (C) Expressão gênica da melanopsina de rato, em regime de claro:escuro, mostrando o mesmo padrão que o peixe, com maiores níveis de expressão durante a fase clara (Park & Kang, 2006).

Figura 13. Expressão gênica de melanopsina durante escuro constante. (a) Retinas de ratos albinos. Cinco dias de DD (escuro constante) aumentam o nível de mRNA da melanopsina de maneira dependente do tempo (Hannibal et al., 2005). (b) Retinas de ratos pigmentados em escuro constante. Observa-se uma mudança significativa no nível de mRNA de melanopsina em função do tempo (Hannibal et al., 2013).

Estudos sobre a expressão gênica da melanopsina também foram realizados em aves. Chaurasia e colaboradores (2005) verificaram que a expressão gênica da melanopsina apresenta um padrão rítmico em retinas e na glândula pineal de *Gallus gallus*. Neste estudo, os animais foram mantidos em um ciclo claro:escuro por 2 semanas e depois transferidos para escuro constante por 2 dias. Os resultados revelaram uma variação de expressão de mRNA diário na glândula pineal com um aumento durante a noite, quando expostos no ciclo claro:escuro. Este ritmo persistiu no primeiro dia do escuro constante e apresentou redução na transcrição no segundo dia. Apesar do mRNA da melanopsina também ser expresso ritmicamente na retina, essa expressão acontece de forma oposta ao encontrado na glândula pineal, sendo que os níveis mais altos de expressão se dão no início do dia (*zeitgeber* - ZT) utilizado como pista ambiental é o tempo - ZT entre 0-4 e, em seguida, diminuem até atingir o limiar no ZT 16. Na retina, tanto no claro:escuro, quanto em escuro constante o padrão de expressão foi semelhante (Figura 14).

Figura 14. Alterações temporais nos níveis de mRNA de melanopsina de galinha. (A) Glândula pineal. (B) Retina. Ciclo de claro:escuro por 2 semanas e depois transferido para escuro: escuro. Cada ponto indica uma coleta. Pineal: mRNA de melanopsina flutua diariamente com níveis mais altos a noite. Retina: o nível de mRNA foi maior no início do dia. Modificado de Chaurasia et al., 2005.

A luz pode ser um fator importante na expressão de melanopsina. Em retinas de galinha quando expostas em dois períodos diferentes daqueles descritos anteriormente: 18h no ciclo claro e 6h em escuro (18L:6D) e 6h em ciclo claro e 18h em escuro (6L:18D), observa-se que o nível de mRNA no primeiro regime diminuiu significativamente quando comparado ao regime de maior tempo no escuro. Apesar de não ter sido observada a expressão ao longo do dia, este resultado aponta que a luz é influenciada a inibição o nível de transcrição da melanopsina (Lima et al., 2006). Para investigar o perfil de expressão dos genes *Opn4x* e *Opn4m* ao longo do dia, células embrionárias da retina de galinha foram coletadas em diferentes ZTs (períodos do dia): claro:escuro, escuro constante, 3 dias em claro:escuro e 3 dias em escuro constante. A expressão de *OPN4x* em escuro constante não apresentou diferenças estatísticas significativas durante os ZTs. Contudo, o gene *Opn4m* apresenta um pico elevado pouco antes do dia subjetivo, indicando que o perfil de expressão deste gene sugere a existência de um padrão de variação circadiano. Já no regime de claro:escuro, tanto o gene *Opn4x* quanto o *Opn4m* tiveram um valor baixo de expressão na fase clara. Na fase escura, a expressão dos genes *Opn4x* e *Opn4m* aumentou cerca de 3 e 5 vezes, respectivamente. Porém, apenas foi possível observar uma variação circadiana para *Opn4m* (Figura 15). O ritmo observado para *Opn4m* poderia significar que essa opsina estaria mais relacionada com a percepção circadiana dos estímulos ambientais em relação a *Opn4x* (Lima et al., 2011).

Figura 15. Expressão de mRNA das células mantidas em um regime de claro:escuro (12:12). Modificado de Lima et al., 2011.

Até o momento, foi possível observar como a melanopsina pode alterar sua expressão dependendo de fatores externos (luz e temperatura) ou condições constantes (claro ou escuro), indicando um possível papel como sinalizadora no controle do ritmo circadiano dos animais. As condições experimentais dos trabalhos realizados para avaliação do perfil de expressão foram controladas com ciclo claro:escuro, em escuro constante ou claro constante (Lima et al., 2006, 2011, Chaurasia et al., 2005). O monitoramento das condições ambientais é primordial para a caracterização dos ritmos biológicos, bem como para estabelecer relações detalhadas entre o padrão circadiano de expressão da melanopsina quanto o sistema dos osciladores endógenos (relógios periféricos e NSQ). Entretanto, para analisar detalhadamente os efeitos do padrão endógeno destes sistemas é necessário excluir pistas ambientais, ou seja, remover quaisquer sincronizadores que possam interferir na regulação destes ritmos. No entanto, esta condição é possível apenas em laboratório. Porém, como descrito anteriormente, foram verificadas divergências entre os resultados obtidos por experimentos com animais de laboratório e de ambiente de campo na determinação do ritmo diário dos animais, como por exemplo, o descrito em roedores. Diante disso, estudos em ambientes naturais ou seminaturais (como em viveiros, por exemplo) são de extrema importância para a compreensão da adaptação temporal do animal (quando este se encontra em seu contexto natural), mesmo que o controle rigoroso de todas as variáveis ambientais seja dificultado (Tomotani, 2011).

Ainda que apresentem alta relevância, são escassos os trabalhos realizados em condições naturais ou semi-naturais. Além disso, a maioria dos modelos estudados engloba a classe dos mamíferos, peixes e aves. Desta última classe, apenas aves com padrão de atividade diurno, como galinhas, codornas ou pombos, foram exploradas com relação ao nível de expressão de melanopsina em laboratório (Chaurasia, et al., 2005; Morera et al., 2016; Bailey & Cassone, 2005). Nenhum estudo aborda esta temática em ambientes naturais ou semi-naturais de forma comparativa em um mesmo grupo de aves, como as corujas que por sua vez, apresentam alta diversidade de padrão de atividade. Diante disso, considerando um ambiente seminatural, que sofre interferência de luz e temperatura ambiente, a expressão da melanopsina pode ser sincronizada com os fatores externos e semelhante entre as espécies. Analisando todas estas questões, as corujas se tornam um modelo interessante para testar hipóteses e compreender os aspectos da expressão dos genes de melanopsina em aves noturnas, principalmente por

proporcionarem uma análise de padrão intragrupo, pois apresentaram uma alta variedade de padrões diários de atividade (diurnas, noturnas e catemerais).

1.4. Strigiformes: Caracterização e diversidade ecológica

Os Strigiformes são uma ordem de aves que inclui aves de rapina como corujas, caburés, mochos e murucututus. Dentre o grupo das aves, as corujas se destacam por apresentarem padrões característicos de comportamento, morfologia e anatomia. Podem ser classificadas em duas famílias: Strigidae e Tytonidae. São encontradas 212 espécies de corujas em todos os continentes, exceto na Antártida. Desse total, 24 espécies foram registradas no Brasil, com nove gêneros da família Strigidae: *Megascops*, *Lophotrix*, *Pulsatrix*, *Bubo*, *Strix*, *Glaucidium*, *Athene*, *Aegolius* e *Asio* e apenas um representante de Tytonidae, a espécie *Tyto furcata*. A família Tytonidae é constituída por aves dos gêneros *Tyto* e *Phodilus*, e os demais gêneros das corujas estão englobados na família Strigidae (Motta-Junior; Bueno; Braga, 2004).

As famílias Tytonidae e Strigidae formam um grupo monofilético (Wink; Sauer-gürth; Gonzalez, 2009; Sick 1997 apud Arruda; Oliani; Varoli, 1997) sendo a família Tytonidae a mais ancestral (Randi et al, 1991). Considerando que as espécies da família Strigidae são as mais abundantes entre as aves da ordem Strigiforme, quatro espécies se destacam pela sua diversidade com relação ao ambiente ocupado, padrão de atividade e relações filogenéticas: *Athene cunicularia*, *Asio clamator*, *Glaucidium brasilianum* e *Megascops choliba* (Figura 16). De acordo com análises filogenéticas, o gênero *Athene* é o mais antigo na linhagem das corujas. As espécies *Athene cunicularia* e *Glaucidium brasilianum* são grupos monofiléticos pertencentes a subfamília Surniinae, divididas as duas tribos: Athenini e Surniini, respectivamente. Já as espécies *Asio clamator* e *Megascops choliba* pertencem a subfamília Striginae, formando um grupo monofilético (Wink; Sauer-gürth; Gonzalez, 2009).

Figura 16. Espécies de corujas da família Strigidae estudadas neste projeto. *Athene cunicularia* (A), *Glaucidium brasilianum* (B), *Asio clamator* (C), *Megascops choliba* (MC). Fonte: Wikiaves.

As corujas ocupam os mais diversos habitats como florestas, campos ou cerrados. A coruja *A. cunicularia* habita preferencialmente ambientes campestres, porém esta espécie pode ser encontrada com frequência em ambientes urbanos. As espécies *A. clamator*, *M. choliba* e *G. brasilianum* preferem ambientes com gramíneas, árvores baixas e arbustos espaçados, como os encontrados nos cerrados e savanas. A *G. brasilianum* pode ser encontrada em ambientes florestados que apresentam abundância de locais sombreados (Motta-Junior; Bueno; Braga, 2004).

Em relação aos ritmos diários, em geral as corujas são ativas durante a noite, porém, algumas espécies como a Caburé (*Glaucidium brasilianum*) podem estar ativas no início da manhã ou ao anoitecer. As Corujas-buraqueiras (*Athene cunicularia*) são ativas durante o dia, porém apresentam um padrão de atividade maior no crepúsculo, assim, podem ser caracterizadas como catemerais ou crepusculares. A Coruja-orelhuda (*Asio clamator*) e a Corujinha-do-mato (*Megascops choliba*) são mais ativas durante a noite, e costumam cochilar ao longo do dia em lugares com predominância de sombras (Sick, 1993 apud Motta-Junior; Alho; Belentani, 2004; Menq, 2013).

Devido a estes diferentes padrões de atividade e comportamento, as corujas são um modelo valioso para pesquisas relacionadas com a melanopsina. Os estudos relacionados à expressão, caracterização e localização das melanopsinas em aves geralmente são voltados para espécies diurnas (Chaurasia, et al., 2005; Morera et al., 2016; Bailey & Cassone, 2005). Está bem descrito na literatura que a melanopsina apresenta maiores níveis de expressão durante a noite, em animais diurnos (Chaurasia et al., 2005) e que o ciclo claro:escuro interfere na expressão gênica deste fotopigmento (Lima et al., 2006, 2011; Doyle & Menaker, 2007). Porém, o perfil de expressão em aves noturnas ainda não foi descrito. Os trabalhos que investigam os genes da melanopsina em corujas são escassos com estudos apenas nas espécies *Strix occidentalis caurina* e *Strix varia* (Hanna et al., 2017). No banco de dados Genbank foi depositado apenas os transcriptomas da *Tyto alba* (acesso genbank: ASM68720v1) e da *Athene cunicularia* (acesso genbank: GCA_003259725.1) (Mueller et al., 2018) onde podem ser encontrados os dois genes de melanopsina (*Opn4x* e *Opn4m*). Diante disso, este trabalho propôs caracterizar a expressão gênica da melanopsina em quatro espécies da família Strigidae e estabelecer suas relações com os diferentes hábitos destes animais.

2. JUSTIFICATIVA

Na retina existem diferentes classes de fotorreceptores responsáveis pela captação dos fótons de luz, os fotorreceptores clássicos: cones e bastonetes que expressam a rodopsina como fotopigmento visual, e um outro tipo de fotorreceptor, encontrado geralmente em uma subpopulação de células ganglionares que são intrinsicamente fotossensíveis (ipRGCs) que expressam o fotopigmento melanopsina. A melanopsina é um dos fotopigmentos responsáveis por diversas respostas fisiológicas à luz, como controle do reflexo pupilar, supressão de melatonina e regulação dos ritmos circadianos (com duração de aproximadamente 24h) nos organismos (Provencio et al., 1998; 2000; Lucas et al., 2001). Estudos demonstraram que a intensidade luminosa pode exercer uma pressão seletiva relacionada à regulação dos ritmos biológicos dos animais por meio da expressão da melanopsina, o que implica em diferenças morfológicas e funcionais relacionadas aos diferentes hábitos (Davies et al., 2011; Tomonari et al., 2005; Pires et al., 2009).

As aves formam uma das mais diversas classes de vertebrados composta por animais que apresentam alta diversidade de padrões de atividade. Estudos que avaliaram o padrão de expressão da melanopsina com aves se restringe em modelos animais com hábitos diurnos, como em codornas, galinhas e pombos (Chaurasia, et al., 2005; Morera et al., 2016; Bailey & Cassone, 2005). Nestes animais, a expressão da melanopsina é maior durante a noite e, fatores externos, como a luminosidade podem inibir ou estimular sua expressão. As condições experimentais destes estudos foram controladas em ambiente artificial (laboratórios). Estudos em ambientes naturais ou semi-naturais são necessários para compreender a adaptação temporal dos animais, pois trazem novos questionamentos acerca dos padrões de ritmos apresentados pelos animais em ambientes controlados com aqueles que sofrem ação de pistas ambientais externas.

Dentre o grupo das aves, as corujas representam um sistema notável para investigar a evolução e as características da melanopsina e sua relação com os ritmos diários, uma vez que dentro deste mesmo grupo é possível encontrar espécies que adotam três diferentes padrões de atividade diária: hábitos diurnos, noturnos e crepusculares. Testes genéticos, filogenéticos e morfológicos trarão novos *insights* sobre a evolução e o perfil de expressão da melanopsina no grupo das aves.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterização das melanopsinas e sua expressão em retinas de diferentes espécies de corujas (Aves: Strigiformes).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar e sequenciar os genes de melanopsinas (*Opn4x* e *Opn4m*) de três espécies de corujas da família Strigidae: *Asio clamator*, *Glaucidium brasilianum* e *Megascops choliba*;
- Estabelecer as relações filogenéticas entre os genes de melanopsina expressos nas retinas das diferentes espécies de corujas.
- Localizar a melanopsina na retina de uma espécie de coruja diurna (*Glaucidium brasilianum*), noturna (*Tyto furcata*) e catemeral (*Athene cunicularia*).
- Quantificar e comparar a expressão dos genes de melanopsinas entre quatro espécies de corujas da família Strigidae (*Athene cunicularia*, *Asio clamator*, *Glaucidium brasilianum* e *Megascops choliba*);

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta do material

Foram coletados 5 indivíduos, com 1 ou 2 anos de idade, de cada espécie de coruja: *Athene cunicularia*, *Asio clamator*, *Glaucidium brasilianum* e *Megascops choliba*, com diferentes padrões de atividades (diurnos, noturnos e crepusculares) (Tabela 1). Os animais foram obtidos por doação do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e a manutenção e uso das corujas foram autorizados pelo mesmo instituto por intermédio do Centro de Triagem Animal de Belo Horizonte (CETAS/BH). As corujas foram mantidas em um aviário com iluminação natural, na Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG (Figura 17), sob cuidados do Prof. Dr. Jerome Baron do Departamento de Fisiologia e Biofísica, no Instituto de Ciências Biológicas. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (protocolo IPUSP nº 5691140818) (Anexo 1). Os animais foram eutanasiados com o fármaco pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso) injetado por via intraperitoneal, seguido de decaptação. Os indivíduos foram coletados no mês de agosto de 2019, época do inverno, no intervalo de 11h30min - 12h30min. Medidas de temperatura e umidade foram avaliadas (Figura 18), assim como a determinação do sexo das corujas (Apêndice 1). A temperatura e a umidade foram medidas com o aparelho *Climate data logger* (TROTEC). Para a coleta dos olhos, o material cirúrgico foi previamente higienizado (tesoura e pinça) com gaze embebida em água sanitária a 10%, bem como após a coleta de cada olho para evitar contaminação. Logo após a enucleação dos olhos, a câmara anterior (íris e cristalino) foi removida e os olhos foram mantidos em *RNAlater®* (Ambion), a 4°C, para preservação do RNA. O material foi mantido em gelo seco para o transporte até a USP em São Paulo, onde foram realizadas as análises genéticas.

Tabela 1.

Informações sobre as espécies de corujas obtidas para estudo.

Espécies	Período de atividade	Procedimentos	Número amostral
<i>Athene cunicularia</i>	Catemeral	Morfologia e Genética	6
<i>Asio clamator</i>	Noturna	Genética	5
<i>Glaucidium brasilianum</i>	Diurna	Morfologia e Genética	6
<i>Megascops choliba</i>	Noturna	Genética	5
<i>Tyto alba</i>	Noturna	Morfologia	1

Figura 17. Aviário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e gaiolas onde são mantidas as corujas, com iluminação natural e câmeras para filmagens dos experimentos. Na foto à direita, um indivíduo da espécie *Glaucidium brasilianum*.

Figura 18. Gráfico de dispersão mostrando a variação da temperatura e umidade nos dias de coletas de todas as espécies de corujas. AC (●), AS (▲), GB (■), MC (◆). AC: *Athene cunicularia*; AS: *Asio clamator*; GB: *Glaucidium brasilianum*; MC: *Megascops choliba*.

4.2. Genética das melanopsinas

4.2.1. Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA)

A extração de RNA total foi realizada no Laboratório de Fisiologia Comparativa da Pigmentação, no Instituto de Biociências da USP em São Paulo, com a utilização do reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), seguindo o protocolo do fabricante. Para remoção de eventual contaminação com DNA genômico, o RNA foi tratado com DNase conforme as instruções do fabricante (*turboDNA-free*TM, Ambion Inc., USA). A concentração de RNA foi determinada com o espectrofotômetro *NanoDrop*TM 1000 (Thermo Scientific, USA), sendo 1 µg ou 0,5 µg utilizados para a transcrição reversa, descrita a seguir.

A síntese de cDNA ou transcrição reversa (RT-PCR) foi realizada com o kit Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Em tubos de 0,2 mL identificados com o nome de cada amostra foram adicionados 1 µL de random primers, x µL para 1µg ou 0,5 µg de RNA (calculado a partir da concentração de RNA), 1 µL dNTP Mix com volume completado para 13ul de água DEPC. A primeira parte da reação de RT-PCR foi realizada com os seguintes parâmetros: 65°C por 5 min, 4°C por 1 min. Em seguida, foi preparado um mix e adicionado 7ul deste mix nos tubos de 0,2 mL, completando um volume final de 20ul. Os reagentes colocados para preparação do mix foram os seguintes: tampão (5x PCR buffer), Ditioneitol (DTT) (0,1M), como agente redutor, um inibidor de ribonuclease (40U/ul) e a enzima *Superscript III RT*. Os tubos com as amostras e os reagentes finais foram colocados novamente no termociclador a 25°C por 5min, 50°C por 50min e 70°C por 15min. O cDNA sintetizado foi utilizado nas reações subsequentes de PCR convencional e em tempo real (qPCR).

4.2.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada para amplificar as sequências de nucleotídeos que compõem o cDNA das melanopsinas (*Opn4x* e *Opn4m*), expressas nas retinas das corujas. Foram desenhados *primers* a partir da sequência de nucleotídeos dos genes de melanopsina de *Athene cunicularia* (*Opn4x* – acesso genbank: XM_026848001.1 e *Opn4m*- acesso genbank: XM_026851874.1) e *Tyto alba* (*Opn4m* - acesso genbank: LOC104357003), utilizando o programa *Primer Blast* (NCBI). Esses *primers* foram divididos em *forward* (Fw1), desenhado no início da sequência, o *reverse* (Rv1) feito no meio da sequência e um segundo *primer forward* (Fw2) na metade da sequência e um *reverse* (Rv2) alinhado no final da sequência de nucleotídeos. Após as análises dos produtos sequenciados, foi desenhado um *primer* mais específico para o gene *Opn4m* para as espécies deste estudo, a partir da sequência obtida da *Megascops choliba*. Foi desenhado apenas um *primer reverse* (Rv2), para ser utilizado com o *primer forward* (Fw2) da *Athene cunicularia*. A descrição dos primers utilizados na PCR pode ser observada na tabela 2. O produto final da PCR foi visualizado em gel de agarose (2%), após eletroforese, fotografado no sistema de fotodocumentação AlphaImager® mini e as amostras foram mantidas a -20 °C até o momento de purificação.

Para as reações de PCR, o kit utilizado foi o *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Life Technologies, California, USA), utilizando a enzima Platinum Taq Polimerase, 10x *high fidelity buffer*, 50mM de MgCl₂, 10 mM *GeneAmp dNTPs* e 20 µM de primers

diluídos em H₂O Rnase-Dnase free. Ao volume total da reação (49 µL) foi adicionado 1 µL da amostra de cDNA. Em seguida, as amostras foram colocadas no termociclador Veriti® Thermal cycle (Life Technologies, USA), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 37 ciclos a 94°C por 30 segundos, temperatura de *annealing*, por 30 segundos, temperatura de extensão a 72°C por 30 segundos, por fim, extensão final a 72°C por 10 minutos. A temperatura de *annealing* é específica para cada *primer*, podendo variar entre 50°C a 61°C.

Tabela 2.

Descrição dos *primers* utilizados para amplificar os genes expressos em retinas de corujas.

<i>Primer</i>	Sêquencia	Temp <i>annealing</i>	Concentração final dos <i>primers</i>
<i>Opn4x</i> _AC_Fw1	5'-ATGCTGGTGCTTTGGAAAAC-3'	61 °C	20nM
<i>Opn4x</i> _AC_Rv1	5'-GCAATAACTGCAGGCACAGAT-3'	60 °C	20nM
<i>Opn4m</i> _Tyto_Fw2	5'-GGTCACCATACTCTGTTGTTGCT-3'	60 °C	20nM
<i>Opn4m</i> _Tyto_Rv2	5'-CGGCTGTTGATCTTAGGGTACA-3'	61 °C	20nM
<i>Opn4m</i> _AC_Fw2	5'-AGGGTCTGATGACTTCCTGTTC-3'	59 °C	20nM
<i>Opn4m</i> _MC_Rv2	5'-ATGTTGCAATGGCTGTTCTG-3'	59 °C	20nM

Nota: AC – *Athene cunicularia*; MC – *Megascops choliba*. Fw – *forward*. Rv – *reverse*.

4.2.3. Purificação e sequenciamento de cDNA

A purificação das amostras foi realizada com o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band purification (GE Healthcare, USA). O sequenciamento foi feito com o kit *Big Dye Terminator* (Applied Biosystems, USA), utilizando o sequenciador 3500 xL (Applied Biosystems, USA) do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEPAE). As sequências de nucleotídeos obtidas foram analisadas com o programa BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999), juntamente com outras duas sequências de melanopsinas de corujas já descritas (*Athene cunicularia Opn4x* – acesso genbank: XM_026848001.1 e *Opn4m*- acesso genbank: XM_026851874.1 e *Tyto alba (Opn4m* - acesso genbank: LOC104357003 e *Opn4x* - acesso genbank: XM_033004495.1).

4.2.4 Análises Filogenéticas

Para a reconstrução filogenética foram utilizadas as sequências parciais de nucleotídeos dos genes de melanopsinas amplificados neste trabalho: *Asio clamator* (*Opn4x*: 798 pb e *Opn4m*: 426 pb), *Glaucium brasilianum* (*Opn4x*: 807 pb e *Opn4m*: 940 pb) e *Megascops choliba* (*Opn4x*: 816 pb e *Opn4m*: 935 pb). As sequências geradas foram alinhadas com as sequências dos genes *Opn4x* e *Opn4m* de outras duas espécies de corujas, *Athene cunicularia* e *Tyto alba*, além de outras 76 sequências de melanopsinas de outros vertebrados, obtidas no banco de dados NCBI (Anexo 2). A rodopsina de *Bos taurus* (acesso Genbank: NM_001014890.2) foi utilizada como grupo externo. As sequências foram alinhadas por ClustalW, utilizando o programa Bioedit v.7.2.5 (Hall, 1999).

O alinhamento final com 1.983 pares de base (pb) foi submetido ao programa Partition-Finder v.1.1.1 (Lanfear et al., 2012), para determinação dos melhores modelos de partição dos genes. Os modelos SYM+I+G para posição 1 e 3 do códon, e TVM+I+G para a posição 2 foram estabelecidos como os melhores modelos de partição e utilizados na reconstrução filogenética por método de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*, ML), utilizando o programa GARLI v.0.96 (Zwickl, 2006). O suporte estatístico para os ramos foi obtido por *bootstrap* não paramétrico (Felsenstein, 1985), com base em 1.000 repetições. As árvores resultantes foram visualizadas e editadas no programa FigTree v.1.4.4 (Rambaut, 2007).

4.2.5 PCR quantitativa (qPCR)

Para os ensaios de PCR em tempo real foi utilizado o kit *Fast SYBR Green Master Mix* (ThermoFisher, USA) e o equipamento *QuantStudio 5* (ThermoFisher, USA). Foram preparadas soluções independentes para cada gene (*Opn4x*, *Opn4m* e RNA 18S) com volume final de 22,5 µL contendo a mistura dos reagentes presentes no kit *SYBRgreen 2X* (5 µL para cada poço), os *primers forward* e *reverse* de cada gene (0,3 µL para cada poço) (Integrated DNA Technologies (IDT, USA, Tabela 4) e água livre de nuclease (3,4 µL para cada poço) (ThermoFisher, USA). Em cada alíquota de mix foi adicionado 2,5 µL de cDNA das corujas, com concentração de 25 ng/ul de cDNA por poço. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas. Para desenhar *primers* específicos em uma região comum para todas as corujas, foi realizado o alinhamento de todas as sequências amplificadas na PCR para comparação (Apêndice 2). Utilizou-se como referência a sequência da *Megascops choliba*, para ambos os genes de melanopsina, e para normalizar

os valores dos genes estudados, foi utilizado o RNA 18S. A especificação dos primers utilizados nas análises de qPCR está descrita na Tabela 3.

Tabela 3.

Descrição dos *primers* utilizados para a quantificação da expressão gênica das melanopsinas em retinas de corujas.

<i>Primer</i>	Sêquencia	Temp <i>annealing</i>	Concentração final dos <i>primers</i>
<i>Opn4x_MC_FW</i>	5'-CCCTCGCATCATCATTCCT-3'	60 °C	300nM
<i>Opn4x_MC_RV</i>	5'-ATTCTCCTCCTCTTCAAGTTCCT-3'	60 °C	300nM
<i>Opn4m_MC_FW</i>	5'-GCTATCAAGAAGGCCAACAAGT-3'	58 °C	300nM
<i>Opn4m_MC_RV1</i>	5'-GGGAATACCCAGCAAAGGCTA-3'	59 °C	300nM
18S_FW	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'	60 °C	50nM
18S_RV	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'	60 °C	50nM

Nota: MC – *Megascops choliba*. Fw – forward. Rv – reverse.

As reações foram realizadas em microplacas especiais, de 96 poços com volume de 0,2 mL cada (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate 0.2mL, ThermoFisher), e seladas com tampas transparentes específicas para a leitura óptica do sistema de detecção do *QuantStudio 5* (MicroAmp Optical 8-Cap Strip, ThermoFisher). O programa utilizado foi o *QuantStudio™ Design and Analysis Software v.1.5.1*, sendo o tipo de experimento o Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$). Os parâmetros utilizados neste programa foram os seguintes: fase de desnaturação a 95°C por 20 segundos, fase de extensão a 95°C por 1 segundo e anelamento a 60°C por 20 segundos durante 40 ciclos. Para a fase de *melt curve* os seguintes parâmetros foram utilizados: 95°C (desnaturação do DNA), por 1 segundo, 60°C (anelamento do primer) por 20 segundos e fase de dissociação com aumento da temperatura de 0,15°C/s até atingir 95 °C por 1 segundo (Figura 19). Esta fase de *melt curve* é necessária pois o fluoróforo usado no kit *Fast SYBR Green* intercala-se a qualquer fita dupla de cDNA que está sendo amplificado. Assim, se o *primer* utilizado na reação amplificar mais de uma sequência, ou seja, se ele não for específico para a sequência de interesse, o resultado observado após a leitura da fluorescência, será de curvas com picos em diferentes temperaturas, indicando a inespecificidade da reação. Neste caso, esta reação deve ser descartada das análises posteriores. Para as amostras cuja amplificação

for específica, as *melting curves* irão mostrar apenas um pico na fluorescência em cada poço (Figura 20).

Figura 19. Parâmetros utilizados no equipamento QuantStudio 5, mostrando as temperaturas e o tempo de cada reação pelo método de Ct comparativo ($\Delta\Delta C_t$).

Figura 20. Exemplo de uma *melt curve* específica para o gene *Opn4x* da espécie *Athene cunicularia*.

Adicionalmente foi calculada a eficiência de cada *primer* mediante a diluição seriada (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16). A partir dos *threshold cycles* (CTs – ciclo em que a fluorescência ultrapassa o *threshold*), obtidos na reação de qPCR, foi realizada uma regressão linear, atingindo a respectiva equação de primeiro grau: $y = ax + b$, sendo “a”

o coeficiente angular e “b” o coeficiente linear. O valor de “a” foi usado na seguinte equação $((10^{(1/a)} - 1) \times 100)$, obtendo-se a eficiência de cada *primer* por espécie (maiores detalhes ver Apêndice 3). Todas as reações foram realizadas em duplicatas.

Os dados foram analisados pelo método de curva padrão descrito no manual User Bulletin#2 (ABI PRISM 7700 Sequence Detection System). Neste método de quantificação relativa, os valores de CTs foram ajustados para todos genes de cada espécie. Cada valor de CT é subtraído de “b” e posteriormente dividido por “a”, ambos oriundos da curva de eficiência previamente obtida. Posteriormente, os valores de CTs de *Opn4m* e *Opn4x* foram divididos pelo CT do RNA18s (Gene de interesse/RNA18s), obtendo-se um índice que foi utilizado para análise estatística dos resultados. O valor de maior e menor expressão foram considerados como 100 e 0%, respectivamente. As análises estatísticas foram realizadas com os índices de expressão e comparados por análise de variância (ANOVA ONE-WAY) seguida pelo teste de Tukey utilizando o programa Graphpad Prism 7.0. O valor de $p < 0.05$ foi utilizado para a rejeição da hipótese nula.

4.3. Morfologia: Imunohistoquímica

Para localizar a melanopsina na retina das corujas foi utilizada a técnica de imunohistoquímica. Lâminas com cortes transversais das retinas das espécies *Athene cunicularia*, *Tyto furcata* e *Glaucidium brasilianum* foram obtidas em um projeto anterior intitulado “*Estudo morfológico da retina e genético do pigmento visual LWS de cinco espécies de corujas e sua relação com o ritmo circadiano*” realizado pelo aluno Felipe T. Vasconcelos. Para a obtenção dessas lâminas, os olhos de um animal de cada espécie foram enucleados logo após o procedimento de perfusão realizado, inicialmente, com solução salina 0,9%. Quando houve a cessão da circulação sanguínea, foi perfundida uma solução de paraformaldeído (PFA) a 4% diluída em tampão fosfato 0,1M (PBS), pH 7.4. A câmara anterior dos olhos enucleados foi removida e a cuia óptica foi imersa em PFA 4%, por 2 horas. Após este período, o material foi transferido para uma solução de PBS 0,1M com pH 7,2 – 7,4 a 4°C. O material passou por um processo de crioproteção, com imersão em uma solução de sacarose a 30% por 24h a 4 °C, antes de ser emblocado em OCT (*Optimum Cutting Temperature Formulation*) (Sakura Finetechnical Co. Tokyo, Japan), para obtenção dos cortes das retinas em criostato a -28°C. As lâminas foram mantidas em -20 °C.

Para a técnica de imunohistoquímica, utilizou-se uma solução de tampão PB 0,1M + TRITON X-100 a 0,3% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para fazer 3 lavagens de 10 minutos em cada corte de retina. Posteriormente o tecido foi incubado com soro normal de cabra a 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) + 22.52 mg/mL de glicina durante 1 hora, a fim de bloquear os sítios inespecíficos. Os anticorpos primários de melanopsina OPN4x e OPN4m utilizados nos ensaios foram fornecidos pela Prof^a. Dr^a. Ana Maria de Lauro Castrucci do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IBUSP). Os anticorpos para a melanopsina OPN4m foram produzidos em coelhos diferentes contra a melanopsina de galo, na região de *loop* entre os domínios transmembrânicos IV e V. Três antígenos para esta proteína foram testados nas retinas das corujas (UF017, UF018 e UF019). Foram utilizados dois anticorpos para marcação de OPN4x produzidos a partir de sequências peptídicas de duas regiões diferentes. As especificações de ambos os anticorpos e as concentrações utilizadas estão descritas na Tabela 3. Os anticorpos foram testados nos cortes com 24 horas de incubação, mantidos em câmara úmida. Em um dos cortes o anticorpo primário foi omitido para o controle negativo da reação.

Após este período, foram realizadas 3 lavagens com solução PB 0,1M + TRITON X-100 a 0,3% por 10 minutos, e posteriormente, os cortes foram incubados por 2 horas com anticorpo secundário produzido em cabra contra soro de coelho (*Goat anti Rabbit*) conjugado à molécula fluorescente de CY3 (Jackson Laboratories, USA), mantidos em câmara úmida e escura a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em PB 0,1M (3 vezes de 10 minutos cada), e foram montadas com meio de montagem Vectashield + DAPI (2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6- carboxamidine) (Vector Laboratories Inc, California, USA), cobertos com lamínula e selados com esmalte. As especificações e concentrações dos anticorpos estão descritas na Tabela 4. Os cortes foram observados com microscópio LEICA DM5500B (Leica Microsystems, Germany) com um conjunto de filtros específicos para CY3 (excitação verde, emissão vermelho) e fotografados com câmera digital (Nikon digital sight DS-U3), com o software de imagem Las-X (Leica Microsystems, Germany).

Tabela 4.

Anticorpos primários e secundário utilizados na marcação de OPN4x e OPN4m (*Bethyl Laboratories*).

Anticorpo primário	Especificação	Sequência peptídica	Diluição primário	Diluição secundário (gt α rb CY3)
OPN4m				
UF017	Produzido em coelho contra melanopsina de camundongo (região IV-V <i>loop</i>)	GWSAYVPEGLLTS	1:500	1:200
UF018			1:500	1:200
UF019			1:500	1:200
OPN4x				
OPN4x1	Produzido em coelho contra melanopsina de galo	SSSLRQKRDLLPDSYSCSEE	1:500	1:500
OPN4x2	Coelho α galo OPN4x2 (C-terminal)	LSSSTEFLEAVEKFLS	1:500	

5. RESULTADOS

5.1. Identificação dos genes das melanopsinas de corujas

Foram amplificadas e sequenciadas com sucesso as sequências parciais dos dois genes das melanopsinas (*Opn4x* e *Opn4m*) expressos nas retinas das corujas *Asio clamator* (*Opn4x*: 798 pb e *Opn4m*: 426 pb), *Glaucidium brasilianum* (*Opn4x*: 807 pb e *Opn4m*: 940 pb) e *Megascops choliba* (*Opn4x*: 816 pb e *Opn4m*: 935 pb). Posteriormente, a sequência de aminoácidos resultante de cada gene foi analisada.

Os fragmentos possuem características gerais das melanopsinas e da família de receptores acoplados à proteína G e as posições dos sítios descritos correspondem à sequência da *Athene cunicularia*. As propriedades da melanopsina observadas nas sequências parciais (287 aminoácidos) do gene *Opn4x* são dois resíduos de cisteína (C) nos sítios 97 e 185, para a formação de ligações dissulfeto. No terceiro domínio transmembranar encontra-se os resíduos aspartato na posição 131, arginina na posição 132 e uma tirosina na 133 (D131 / R132/ Y133) essenciais para a ligação da transducina. Também observa-se uma tirosina localizada na posição 110 (Y110) e um glutamato na posição 179 (E179), que servem como contraíons à carga positiva da base protonada de Schiff (Borges et al., 2012) (Figura 21).

Figura 21. Alinhamento da sequência parcial de aminoácidos (287aa) da proteína OPN4x das espécies desse estudo: *Asio clamator*, *Glaucidium brasilianum* e *Megascops choliba*, com a sequência da *Athene cunicularia* (genbank: XM_026848001.1) e *Tyto alba* (genbank: XM_033004495.1). Os pontos determinam os aminoácidos comuns em todas as sequências. Os algarismos romanos com barras horizontais mostram a localização dos seis domínios transmembranares amplificados identificados na ferramenta TMPred (https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html). Os resíduos destacados em cinza são os aminoácidos conservados na melanopsina de diferentes grupos de vertebrados.

Com relação a proteína, foram amplificados cerca de 337 aminoácidos. No sequenciamento de todas as amostras não foi amplificada a região DRY, essenciais para a ligação da transducina, e uma das cisteínas. Porém, outros sítios foram observados, como o glutamato na posição 211 (E211), a cisteína na posição 217 (C217) e o resíduo lisina, que nas sequências de *Opn4x* não foi amplificado, mas para o *Opn4m* ela está localizada na posição 336 (K336) no sétimo domínio transmembranar, que atua como o local de ligação do retinal, por meio da base Schiff (Borges et al., 2012) (Figura 22).

Figura 22. Alinhamento da sequência parcial de aminoácidos (337aa) da proteína OPN4m das espécies desse estudo: *Megascops choliba*, *Glaucidium brasilianum* e *Asio clamator*, com a sequência da *Athene cunicularia* (genbank: XM_026851874.1) e *Tyto alba* (genbank: LOC104357003). Os pontos determinam os aminoácidos comuns em todas as sequências. Os algarismos romanos com barras horizontais mostram a localização dos sete domínios transmembranares identificados na ferramenta TMPred (https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html). Os resíduos destacados em cinza são os aminoácidos conservados na melanopsina de diferentes grupos de vertebrados.

5.2. Análises filogenéticas

A reconstrução filogenética demonstrou que os genes de melanopsinas das espécies de corujas *A. clamator*, *G. brasilianum* e *M. choliba* amplificados e sequenciados neste estudo de fato correspondem aos dois genes de melanopsinas dos vertebrados, *Opn4x* e *Opn4m*. A filogenia recuperou os clados dos dois genes parálogos de melanopsinas, com a separação de dois clados monofiléticos, com alto suporte de *bootstrap*: 87 para o gene *Opn4x* e 99 para o gene *Opn4m* (Figura 23). O resultado obtido, portanto, nos permitiu confirmar a identidade dos dois genes expressos nas retinas das três espécies de corujas estudadas.

Para ambos os genes, *Opn4x* e *Opn4m*, a reconstrução filogenética recuperou a filogenia conhecida para corujas (Wink et al., 2009), indicando que os genes de melanopsinas são conservados e evoluem de acordo com a própria filogenia das espécies investigadas. As sequências de *Tyto alba*, pertencente à família Tytonidae, foram posicionadas como grupo irmão das demais espécies de corujas, pertencentes à família Strigidae, de forma que a topologia da árvore recuperou as duas famílias amostradas neste estudo, Tytonidae e Strigidae, com alto suporte de *bootstrap* para o gene *Opn4m* (82), porém sem suporte de *bootstrap* para o gene *Opn4x*. Dentre a família Strigidae, as espécies incluídas nas análises pertencem a duas subfamílias, sendo que ambas foram recuperadas para os dois genes, porém com suporte de *bootstrap* (85) apenas para o *Opn4m*: a subfamília Striginae foi recuperada com as espécies *A. clamator* e *M. choliba* (*bootstrap* de 70 e 65 para os genes *Opn4x* e *Opn4m*, respectivamente) e a subfamília Surniinae foi recuperada com as espécies *A. cunicularia* e *G. brasilianum* (*bootstrap* de 66 e 100 para os genes *Opn4x* e *Opn4m*, respectivamente) (Figura 24).

Figura 23. Análise filogenética dos genes *Opn4m* e *Opn4x* das melanopsinas de vertebrados, por máxima verossimilhança (ML). As sequências de melanopsinas das corujas estão destacadas em azul. A sequência da rodopsina de *Bos taurus* (genbank: NM_001014890.2) foi usada como grupo externo (*outgroup*). Os valores de suporte por *bootstrap* são indicados para cada nó resolvido. A barra de escala indica o número de substituições de nucleotídeo por sítio.

Figura 24. Análise filogenética das sequências de nucleotídeos dos genes de melanopsina *Opn4x* e *Opn4m* no grupo das aves construída por meio do método de Máxima Verossimilhança. Os valores observados em cada nó correspondem aos suportes de *bootstrap*. Os ramos com valores menores que 50% não foram indicados. O grupo das corujas estudadas neste estudo está destacado em vermelho. As barras pretas identificam as famílias nas quais as corujas pertencem, sendo St: Strigidae e Ty: Tytonidae. A barra de escala representa o número de substituições de nucleotídeo por posição.

5.3. Quantificação gênica das melanopsinas

A especificidade dos *primers* utilizados na PCR em tempo real (qPCR) foi determinada pela análise das *melting curves*, demonstrando picos únicos. Em seguida, foi validada a eficiência de cada *primer*, através de uma diluição seriada, conforme descrito na seção dos Materiais e Métodos. Em relação ao gene *Opn4x* de todas as espécies a eficiência apresentou um intervalo de 82-135%, com bons coeficientes de determinação ($R^2 = 0,9$) (Figura 25). Para o *Opn4m* a eficiência apresentou um intervalo entre 96-174% e um R^2 entre 0,7 a 0,9 (Figura 26) e, por fim, para o normalizador RNA18S a eficiência variou de 70-134%, com $R^2 = 0,9$ (Figura 27). Esta variação das eficiências entre as espécies foi levada em consideração e devidamente ajustada para os cálculos da avaliação da expressão gênica.

Figura 25. Eficiência dos *primers* de *Opn4x* para qPCR. Diluição seriada realizada para cada espécie de coruja. Eficiência de 82% ($R^2=0,9$) para *A. cunicularia*, 135% ($R^2=0,9$) para *A. clamator*, 90% ($R^2=0,9$) para *G. brasilianum* e 85% ($R^2=0,9$) para *M. choliba*.

Figura 26. Eficiência dos *primers* de *Opn4m* para qPCR. Diluição seriada realizada para cada espécie de coruja. Eficiência de 174% ($R^2 = 0,7$) para *A. cunicularia*, 96% ($R^2 = 0,9$) para *A. clamator*, 98% ($R^2 = 0,9$) para *G. brasilianum* e 121% ($R^2 = 0,8$) para *M. choliba*.

Figura 27. Eficiência dos *primers* do normalizador RNA18S para qPCR. Diluição seriada realizada para cada espécie de coruja. Eficiência de 174% ($R^2 = 0,7$) para *A. cunicularia*, 96% ($R^2 = 0,9$) para *A. clamator*, 98% ($R^2 = 0,9$) para *G. brasilianum* e 121% ($R^2 = 0,8$) para *M. choliba*.

A expressão de *Opn4x* é significativamente maior na *A. clamator* em comparação com as demais corujas: *A. cunicularia* (AC), *G. brasilianum* (GB) e *M. choliba* (MC) ($p < 0.0001$). Não houve diferença estatística na expressão de *Opn4x* entre *A. cunicularia*, *G. brasilianum* e *M. choliba*. Referente a expressão de *Opn4m* foi observado que os níveis de expressão na espécie *A. cunicularia* foi significativamente menor ($p < 0.05$) do que nas espécies *A. clamator*, *G. brasilianum*, *M. choliba* e estas por sua vez, não tiveram diferença significativa nos níveis de expressão entre si (Figura 28).

Figura 28. Gráfico de dispersão da representação dos valores de expressão de *Opn4x* e *Opn4m* normalizados pelo RNA 18S. A análise estatística pelo teste Anova One Way estabeleceu diferenças significativas nas amostras e o teste de Tukey apontou maiores valores de expressão de *Opn4x* para AS (▼) em relação as demais espécies de corujas: AC (●), GB (◆) e MC (●) ($p < 0.0001$) e uma maior expressão de *Opn4m* nas espécies AS (▼), GB (◆) e MC (●) em relação com a AC (●) ($p < 0.05$). AC: *Athene cunicularia*; AS: *Asio clamator*; GB: *Glaucidium brasilianum*; MC: *Megascops choliba*. Os símbolos em preto indicam o padrão de atividade de cada espécie, sendo diurna ou noturna.

5.4. Análises morfológicas

A técnica de Imunohistoquímica foi realizada em cortes transversais de retinas de três espécies: *Athene cunicularia* (crepuscular/catemeral), *Glaucidium brasilianum* (diurna), *Tyto furcata* (noturna) para marcação das melanopsinas OPN4x e OPN4m. Foram testados três anticorpos para OPN4m produzidos em mamíferos e dois para OPN4x produzidos em aves. Foi realizado um alinhamento das sequências peptídicas dos antígenos com as sequências de melanopsina de *Athene cunicularia* e *Tyto alba*, já publicadas no banco de dados genbank (NCBI).

5.4.1. OPN4m

A sequência peptídica dos anticorpos para a melanopsina OPN4m, apresentou uma homologia de 92% quando alinhada com a melanopsina de *A. cunicularia* e 100% com a *Tyto alba*. Estas sequências apresentaram uma homologia menor, variando entre 60 e 70% com outras opsinas visuais, indicando, portanto, mais homologia com as melanopsinas das corujas e sua especificidade (Anexo 3). A tabela 5 resume os resultados de homologia.

Tabela 5.

Descrição das homologias apresentadas entre a sequência peptídica de OPN4m com a melanopsina e demais proteínas das espécies *A. cunicularia* e *T. alba*.

Espécies	Proteínas	Homologia
<i>Athene cunicularia</i>	Melanopsina	92%
	RH1	70%
	RH2	66%
	Peropsina pigmentar	60%
<i>Tyto alba</i>	Melanopsina	100%
	RH1/Pinopsina	70%
	Peropsina pigmentar	60%
	Opsina-3	67%

O mesmo peptídeo de OPN4m utilizado para imunizar diferentes coelhos, apresentou marcações diferentes nas retinas das corujas estudadas. O anticorpo UF017 marcou algumas células da camada de células ganglionares (CCG) nas espécies *T. furcata* e *G. brasilianum*, porém, não foi possível visualizar marcação na retina de *A. cunicularia*. Em relação ao UF018, os axônios das células ganglionares que formam o nervo óptico das espécies *A. cunicularia* e *G. brasilianum* foram imunopositivos para melanopsina OPN4m. Também não foi possível verificar uma marcação na retina da *T. furcata*. Por fim, para o UF019, a camada de fotorreceptores (CF) foi marcada nas retinas das três espécies (Figura 29). A Tabela 6 resume os resultados da imuhistoquímica para a melanopsina OPN4m em retinas de corujas.

Figura 29. Cortes transversais de retinas de corujas com marcação para melanopsina OPN4m por técnica de Imunohistoquímica. Imunorreatividade das fibras nervosas na retina das espécies catemeral *A. cunicularia* (A) e diurna *G. brasilianum* (B), com anticorpo UF018 (vermelho). Imunorreatividade na camada de fotorreceptores (CF), na retina das espécies *A. cunicularia* (C), *G. brasilianum* (D) e noturna *T. furcata* (E) com anticorpo UF019 (vermelho). Imunorreatividade da CCG de *G. brasilianum* (F) e *T. furcata* (G), com anticorpo UF017 (vermelho). Marcação dos núcleos celulares em azul, com DAPI. CF, Camada de Fotorreceptores; CNE, Camada Nuclear Externa; CNI, Camada nuclear interna; CCG, Camada de Células Ganglionares. Barras de escala: 40µm.

Tabela 6.

Resultados da imunohistoquímica para a melanopsina OPN4m nas retinas das corujas do presente trabalho.

Espécies	Anticorpos	Anticorpo primário	Anticorpo secundário (CY3)	Marcação
<i>Athene cunicularia</i>	UF017	1/500	1/200	-
	UF018	1/500	1/200	fibra óptica
	UF019	1/300	1/400	CF
<i>Tyto furcata</i>	UF017	1/500	1/200	CCG
	UF018	1/500	1/200	-
	UF019	1/500	1/200	CF
<i>Glaucidium brasilianum</i>	UF017	1/500	1/200	CCG
	UF018	1/500	1/200	fibra óptica
	UF019	1/300	1/400	CF

Nota: CF, Camada de Fotorreceptores; CCG, Camada de Células Ganglionares.

5.4.2. OPN4x

As células da retina que foram imunopositivas para o anticorpo OPN4x1 estão localizadas na camada nuclear interna (CNI) e na camada de células ganglionares (CCG) nas espécies *A. cunicularia* e *T. furcata* (Figura 30. A e B), e na *G. brasilianum* apenas a camada de fibra que forma o nervo óptico foi marcada com este anticorpo. Com o OPN4x2 foi obtida uma marcação na CF nas três espécies e, na CNE e CCG da *T. furcata* e CCG da *G. brasilianum* (Figura 30, B e C). No alinhamento realizado no *protein-BLAST* (NCBI), a sequência proteica predita a partir da sequência da melanopsina OPN4x1 produzido contra a sequência da melanopsina OPN4x de *Gallus* teve uma homologia de 66% com a sequência da melanopsina OPN4x de *A. cunicularia*, e de 72% com a melanopsina OPN4x da *T. alba*. Já a sequência do anticorpo OPN4x2, produzido contra a sequência C-terminal da melanopsina OPN4x de *Gallus*, apresentou uma identidade com as sequências de melanopsina OPN4x de *A. cunicularia* e *T. alba* de 100% e 94%, respectivamente. Diferente da OPN4m, o alinhamento com as demais sequências de OPN4x não apresentou homologia com nenhuma outra opsina (Tabela 7). A Tabela 8

resume os resultados da imunohistoquímica para a melanopsina OPN4x em retina de corujas.

Figura 30. Cortes transversais de retinas de corujas marcando a melanopsina OPN4x por técnica de Imunohistoquímica. Marcação da CNI e CCG em vermelho, das espécies *A. cunicularia* (A) e *T. furcata* (B) e da CFN da espécie *G. brasilianum* (C), com o anticorpo OPN4x1. Marcação da CF em vermelho na espécie *G. brasilianum* (D), e na CF, uma pequena marcação na CNE e na CCG da retina de *T. furcata* (E), com o anticorpo OPN4x2 (região C-terminal). Controle negativo não identificando marcação inespecífica do anticorpo secundário (F). Marcação dos núcleos celulares em azul, com DAPI. CF, Camada de Fotorreceptores; CNE, Camada Nuclear Externa; CNI, Camada nuclear interna; CCG, Camada de Células Ganglionares. Barras de escala: 40µm.

Tabela 7.

Descrição das homologias apresentadas entre a sequência peptídica de OPN4x de *G. gallus* com a melanopsina das espécies *A. cunicularia* e *T. alba*.

Espécies	Proteínas	Homologia
<i>Athene cunicularia</i>	Melanopsina	100%
<i>Tyto alba</i>	Melanopsina	94%

Tabela 8.

Resultados da imunohistoquímica para a melanopsina OPN4x nas retinas das corujas do presente trabalho.

Espécies	Anticorpos	Anticorpo primário	Anticorpo secundário (CY3)	Marcação
<i>Athene cunicularia</i>	Opn4x1	1/400	1/500	CNI e CCG
	Opn4x2	1/500	1/500	CF
<i>Tyto furcata</i>	Opn4x1	1/500	1/200	CNI e CCG
	Opn4x2	1/500	1/200	CF e CCG
<i>Glaucidium brasilianum</i>	Opn4x1	1/500	1/200	Fibra óptica
	Opn4x2	1/500	1/200	CF e CCG

Nota: CNI, Camada Nuclear Interna; CF, Camada de Fotorreceptores; CCG, Camada de Células Ganglionares.

6. DISCUSSÃO

Este estudo é pioneiro na caracterização e identificação da expressão do fotopigmento melanopsina, importante na regulação do ritmo circadiano, em retinas de diferentes espécies de corujas: *Athene cunicularia*, *Asio clamator*, *Glaucidium brasilianum*, *Megascops choliba* e *Tyto furcata*. A hipótese do estudo era que a expressão dos genes de melanopsina poderia estar correlacionada com o padrão de atividade diária de corujas. Os resultados mostraram uma variação no perfil de expressão dos genes entre as espécies noturnas, diurnas e catemerais, mas não foi possível concluir se esta variação está de fato relacionada com o padrão de atividades das corujas.

As espécies *A. cunicularia*, *A. clamator*, *G. brasilianum* e *M. choliba* foram utilizadas para as análises genéticas, e as espécies *A. cunicularia*, *G. brasilianum* e *T. furcata* foram utilizadas para as análises morfológicas. Em cada uma das espécies estudadas os genes *Opn4x* e *Opn4m* foram amplificados e sequenciados com sucesso, sendo que sua identidade foi confirmada por meio de análises comparativas realizadas com o auxílio da ferramenta BLASTn e por filogenia molecular. As análises filogenéticas identificaram, para ambos os genes, clados monofiléticos com alto suporte de *bootstrap* (87 para *Opn4x* e 99 para *Opn4m*). Além disso, também foi recuperada a filogenia das corujas, com a separação de dois clados monofiléticos formados pelas duas famílias amostradas, Strigidae e Tytonidae.

Marcações imunohistoquímicas evidenciaram na retina de três espécies de corujas, *A. cunicularia*, *G. brasilianum* e *T. furcata*, a presença da melanopsina em pelo menos três camadas distintas: Camada do Segmento Externo dos Fotorreceptores (CF), Camada Nuclear Interna (CNI) e na Camada de Células Ganglionares (CCG), além de também terem sido observadas marcações na Camada de Fibras Nervosas (CFN). Por fim, foram realizadas análises de PCR em tempo real que apontam para possíveis diferenças na taxa de expressão de ambos os genes entre as espécies de corujas. Considerando que a melanopsina está envolvida em uma série de mecanismos associados ao controle do ritmo circadiano, reflexo pupilar e participação em processamentos de informações visuais, como percepção de brilho e contraste, a variação na sua taxa de expressão pode estar relacionada com a manutenção de inúmeros comportamentos vitais em diferentes espécies. Como será explanado a seguir, os resultados gerados por meio da combinação destas análises que utilizou aves com diferentes padrões de atividade como

modelo de estudo proporcionam novos questionamentos sobre o perfil de expressão da melanopsina neste grupo de aves.

6.1. Caracterização dos genes de melanopsina em corujas

Análises genéticas e de filogenia molecular identificaram que a expressão da melanopsina em retina de coruja ocorre pela transdução dos genes parálogos, *Opn4x* e *Opn4m*. Estes genes foram originados a partir de um evento de duplicação gênica (Borges et al., 2012, Bellingham et al., 2006). Os genes de melanopsina, *Opn4x* e *Opn4m* foram amplificados e sequenciados parcialmente, obtendo-se fragmentos de tamanhos variando cerca de 400 até quase 1000 pares de bases, em três espécies de corujas: *A. clamator*, *G. brasilianum* e *M. choliba*. Os fragmentos amplificados possuem aminoácidos conservados da melanopsina e da família de receptores acoplados à proteína G. As sequências obtidas das espécies utilizadas foram alinhadas com sequências de duas espécies de corujas, *A. cunicularia* e *T. alba*, já publicadas no GenBank.

Nas sequências parciais amplificadas dos genes *Opn4x* e *Opn4m* expressos nas retinas das corujas analisadas, foi possível verificar alguns dos sítios críticos, importantes para determinação funcional e estrutural destas proteínas (Figuras 21 e 22), o que condiz com as propriedades características das melanopsinas, sugerindo que estes sítios são conservados neste grupo em relação ao ancestral. Alguns dos aminoácidos importantes encontrados nas sequências analisadas que estão alinhados com a sequência do ancestral da melanopsina foram: aspartato (D), arginina (R) e tirosina (Y), compondo a sequência DRY essenciais para a ligação da proteína G (proteína Gt), uma tirosina (Y) e glutamato (E) que são contraiões à carga positiva da base protonada de Schiff, uma lisina (K) no sétimo domínio transmembranar que se liga covalentemente ao retinal, e a sequência NPxxY que confere integridade estrutural para ativação do pigmento (Borges, et al. 2012; Dearworth et al., 2011).

Diferentes grupos de vertebrados expressam os genes de melanopsina, sendo que sua expressão varia entre os grupos: mamíferos e algumas espécies de répteis expressam apenas uma classe de melanopsina, com mamíferos apresentando a perda do gene *Opn4x* (Bellingham et al., 2006), e répteis podendo expressar tanto o *Opn4m*, observado em tartarugas (Dearworth et al., 2011), quanto o *Opn4x*, expresso em serpentes (Hauzman et al., 2019), outros vertebrados, como peixes e aves, podem expressar ambos os genes simultaneamente, como visto com as corujas deste trabalho, e além disso, podem

apresentar isoformas diferentes (Chaurasia et al., 2005, Bayle; Cassone, 2005, Davies et al., 2011).

Além do sequenciamento de Sanger, foi realizada a reconstrução filogenética para demonstrar que os genes de melanopsinas das espécies de corujas *A. clamator*, *G. brasilianum* e *M. choliba* amplificados correspondem de fato aos dois genes de melanopsinas dos vertebrados, *Opn4x* e *Opn4m*. As análises filogenéticas recuperaram o padrão monofilético esperado para cada um dos genes de melanopsinas com alto suporte por *bootstrap* (87 para o gene *Opn4x* e 99 para o gene *Opn4m*) (Figura 23). Na árvore obtida, répteis e aves aparecem como grupo monofilético, com alto suporte (*Opn4m*: 99 e *Opn4x*: 95), o que corrobora a história evolutiva dos vertebrados (Pough et al., 2003). Na árvore filogenética obtida para o gene *Opn4x* no grupo das aves, a espécie *Gallus gallus* aparece como grupo monofilético das corujas, indicando uma certa semelhança deste gene entre os grupos. Por outro lado, na árvore obtida para o gene *Opn4m*, a espécie *G. gallus* aparece como grupo externo das demais aves, o que possivelmente pode indicar a existência de alguma divergência adaptativa entre os genes das espécies.

A espécie *Haliaeetus leucocephalus*, pertencente a ordem Accipitriformes, que engloba uma variedade de rapinantes diurnos, também aparece como grupo externo das demais espécies na árvore filogenética do *Opn4m*. A ordem Passeriforme e Falconiforme formam um grupo monofilético com o grupo das corujas, porém distantes filogeneticamente para ambos os genes. A espécie *Opisthocomus hoazin*, conhecida como jacu-cigano pertence a ordem Opisthocomiformes, que aparece como grupo externo das corujas, corroborando com demais análises filogenéticas encontradas para o grupo das aves (Espíndola-Hernández et al., 2020; Jarvis et al., 2014).

A filogenia obtida para ambos os genes, *Opn4x* e *Opn4m*, recuperou o padrão filogenético conhecido para as corujas (Wink et al., 2009). As corujas pertencem a ordem dos Strigiformes, que é subdividida em duas famílias, Tytonidae e Strigidae. A família Strigidae possui três subfamílias, Striginae, Asioninae e Surniinae, enquanto a família Tytonidae é constituída por duas subfamílias, Tytoninae e Phodilinae (Wink et al., 2009). As sequências de *Tyto alba*, pertencente à família Tytonidae, foram posicionadas como grupo irmão das demais espécies de corujas, pertencentes à família Strigidae, de forma que a topologia da árvore recuperou as duas famílias amostradas neste estudo, Tytonidae e Strigidae, para ambos os genes. Apesar do baixo número amostral, estes resultados corroboram a literatura uma vez que registros fósseis apontam que Tytonidae é mais ancestral que Strigidae (Wink et al., 2009). A árvore filogenética obtida também

recuperou o padrão monofilético formado por *Athene cunicularia* e *Glaucidium brasilianum*, espécies com padrões de atividades diurno e catemeral respectivamente, pertencentes às tribos Athenini e Surniini, com *bootstrap* de 66% para o gene *Opn4x* e 100% para *Opn4m*. Da mesma forma que *A. cunicularia* e *G. brasilianum*, as espécies *Megascops choliba* e *Asio clamator*, ambas com padrões de atividade noturno, formam um grupo monofilético, com suporte de *bootstrap* para *Opn4x* de 70% e para *Opn4m* de 65% (Figura 24) (Wink et al., 2009).

6.2. Níveis de expressão gênica da melanopsina em corujas

Em posse dos achados experimentais de sequenciamento das melanopsinas, o próximo passo deste estudo foi avaliar a expressão gênica de *Opn4m* e *Opn4x* nas espécies *A. clamator*, *M. choliba*, *A. cunicularia* e *G. brasilianum* que foram mantidas em um aviário espaçoso com condições ambientais não controladas. Os dois olhos de 5 indivíduos de cada espécie foram coletados entre 11h30min e 12h30min. Nossos resultados apontam para divergências consideráveis no padrão de expressão dos genes de melanopsina dentre as espécies amostradas (Figura 30).

Em relação ao gene *Opn4x* a espécie *A. clamator* apresentou o dobro da expressão em relação as demais espécies. Chama a atenção em especial o fato desta espécie apresentar uma expressão diferente de *M. choliba*, pois ambas são consideradas noturnas. Esta divergência pode estar relacionada com alguma variação fisiológica, ou algum fator ambiental, como a luminosidade nos diferentes locais nos quais as corujas ficavam no viveiro, que esteja estimulando a expressão de *Opn4x* em *A. clamator* naquele ponto de coleta. Os resultados morfológicos deste trabalho mostraram que a melanopsina OPN4x pode ser expressa na camada de fotorreceptores, o que indica uma função que esteja mais relacionada com o processamento visual do gene *Opn4x* do que com a regulação do ritmo circadiano, devido a expressão semelhante entre espécies de diferentes hábitos. A análise da expressão da melanopsina OPN4x nestas espécies ao longo do dia trará uma melhor compreensão sobre o papel da OPN4x na retina desses animais assim como os fatores que podem estar influenciando as diferenças observadas neste trabalho.

Medidas de temperatura e umidade foram realizadas ao longo das coletas, uma vez que a temperatura e a umidade relativa podem ser sincronizadores que influenciam o ritmo biológico dos animais, principalmente o seu pico de atividade (Tachinardi, 2012). A temperatura média do ambiente nas coletas variou de 20.9°C a 25°C e a umidade variou

de 43.9% a 62%. Uma hipótese levantada é a relação destas variáveis com a expressão da melanopsina. Da mesma forma que a temperatura pode influenciar no pico de atividade dos animais, também pode estar influenciando na expressão gênica da melanopsina que regula o ritmo circadiano do animal (Cespedes, 2020). A relação entre a variação da temperatura e umidade ao longo das coletas, com os diferentes indivíduos de cada espécie poderia ser uma inferência da diferença de expressão encontrada entre as corujas diurnas, noturnas e catemerais e consequentemente um fator ambiental que influencia a resposta do organismo de diferentes espécies de corujas. Porém, foi visto que a temperatura e a umidade não variaram entre as coletas, logo estes fatores não tenham influenciado os resultados obtidos na quantificação da expressão da melanopsina. Estudos mais detalhados são necessários com coletas em diferentes horários, ou ao longo do dia, e medidas de temperatura, umidade e luminosidade de cada ambiente do viveiro para sabermos a influência exata destes fatores na expressão da melanopsina.

Outra questão que pode ser discutida é em relação ao ambiente em que os animais estavam expostos. Estudos em laboratório e em ambientais naturais ou seminaturais mostram que a atividade do animal e seu ritmo podem variar (Tomotani, 2011, Chaurasia et al., 2005, Valentinuzzi et al., 2009, Veras et al., 2013). Os indivíduos de *A. clamator* se encontravam em um espaço do viveiro no qual a luminosidade no horário das coletas era maior que nos demais espaços nos quais ficavam as espécies *A. cunicularia*, *G. brasilianum* e *M. choliba*. Considerando que a *OPN4x* talvez tenha um papel mais importante na função visual em detrimento da função de regulação circadiana, uma maior exposição à luz solar causaria um aumento na expressão desta melanopsina nas corujas da espécie *A. clamator*.

Em um trabalho realizado com cultura de células de *Gallus gallus* em um regime de 12h claro e 12h escuro, os autores observaram que a expressão de *Opn4x* não identificou um padrão de expressão circadiano (Lima et al., 2011), e o pico de expressão no ZT3, o que corresponderia ao meio-dia de nossas coletas, apresentou um baixo índice de expressão (Figura 43), semelhante aos dados de expressão encontrados para as espécies *A. cunicularia*, *G. brasilianum* e *M. choliba* (Figura 31).

Figura 31. Expressão de *Opn4x* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em fotoperíodo 12C:12E. Cada barra representa os valores de transcrição do gene *Opn4x* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor de escuro constante, que corresponde a 100%. (a) indica que $p < 0.05$ em relação a (b) ($n=6$ culturas primárias). A flecha em preto identifica o ZT3, que corresponde à 12h (Lima, et al. 2011).

Por outro lado, pelos resultados observados na expressão da melanopsina *Opn4m*, podemos inferir que ela está mais relacionada com o controle do ritmo circadiano das corujas do que *Opn4x*. É visto nos trabalhos de expressão gênica que em animais diurnos a expressão da melanopsina é baixa nos regimes de fase clara (Chaurasia et al., 2005, Lima et al., 2011). Diante disso, nossa hipótese era que, em animais noturnos, na fase clara, a expressão gênica seria maior. Para o gene *Opn4m*, os resultados vão de acordo com nossa hipótese. A questão de que o gene *Opn4m* se refere com a regulação do ritmo circadiano é devido a diferença significativa entre as 3 espécies e a *A. cunicularia*. A expressão gênica menor na espécie *A. cunicularia*, pode estar relacionada com seu padrão catemeral, ou seja, como ela tem uma atividade tanto diurna quanto noturna, a expressão do *Opn4m* pode não apresentar um padrão circadiano bem definido como as demais espécies que possuem um padrão de atividade mais acentuado. Além disso, ainda sobre o trabalho realizado com culturas de células de *G. gallus*, no mesmo regime de 12h claro e 12h escuro, o gene *Opn4m* no ZT3 apresentou uma baixa expressão gênica (Figura 32), o que nos faz concluir que entre animais diurnos e noturnos existe uma diferença de expressão, mesmo em condições controladas e em ambientes seminaturais.

Figura 32. Expressão de *Opn4m* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em fotoperíodo 12C:12E. Cada barra representa os valores de transcrição do gene *Opn4x* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor de escuro constante, que corresponde a 100%. (a) indica que $p < 0.05$ em relação a (b) ($n=6$ culturas primárias) (Lima, et al. 2011).

De acordo com os resultados obtidos por Lima et al. (2011), em retina de galinha a luz parece modular a expressão da melanopsina, tanto de OPN4x quanto de OPN4m. Essa modulação se dá da seguinte forma: na fase clara, ocorre a redução da expressão da melanopsina e na fase escura ocorre um aumento na expressão da melanopsina. Uma hipótese a respeito dessa modulação é uma possível relação com o controle do ritmo circadiano. A via de controle do ritmo circadiano envolve: retina, Nucleo Supraquiasmático, glândula pineal, melatonina. A presença de luz inibe a liberação de melatonina e promove o estado de alerta. A ausência de luz sinaliza para a liberação de melatonina, induzindo o sono. O fato de um animal diurno como a galinha reduzir a expressão de melanopsina durante a fase clara e aumentar a expressão na fase escura não condiz com a modulação da produção de melatonina pela luz. Provavelmente, a modulação na expressão de melanopsina estaria mais relacionada a um mecanismo de modulação da sensibilidade da retina à luz e não ao controle do ritmo circadiano. Este controle se daria pela sinalização da célula que expressa a melanopsina e não estaria relacionado com a variação na expressão da proteína.

Se considerarmos o sistema de cones e bastonetes, o primeiro é especializado em ambientes com alta iluminação, ou seja, ele é menos sensível à luz. Por outro lado, os bastonetes são especializados em ambientes com baixa luminosidade, pois são mais sensíveis a luz. Essa sensibilidade diferencial se dá pela presença de dois tipos celulares

com diferentes características. No caso da melanopsina, até o presente momento, não se observou tipos celulares com diferentes sensibilidades a luz em aves, sendo portanto, a expressão diferencial um possível mecanismo que permite essa diferenciação na sensibilidade da mesma célula.

Ao observar os resultados obtidos no presente estudo, se a expressão da melanopsina estivesse diretamente relacionada com o controle do ritmo circadiano dos animais, era de se esperar que animais noturnos tivessem um nível de expressão de melanopsina praticamente nulo durante o dia, pois assim não haveria possibilidade de inibir a liberação de melatonina e o animal poderia entrar na fase de sono na fase clara. Mas os resultados mostram que não há diferença na expressão da melanopsina entre animais diurnos e noturnos, o que indica uma possível ausência de correlação entre níveis de expressão da melanopsina e controle do ritmo circadiano. Essa hipótese precisa ser testada em outras espécies noturnas, pois as corujas não possuem a glândula pineal e provavelmente a sinalização da presença de luz modula o estado de vigília e sono do animal por outra via diferente da pineal (Hanna et al., 2017).

Além disso, novos experimentos precisam ser realizados para aprimorar os conhecimentos acerca do padrão de expressão gênica da melanopsina ao longo do dia, ou comparando com um horário na fase escura. Os estudos em ambientes naturais são essenciais para entender como o animal se comporta diante das variáveis ambientais, e assim, poder comparar com estudos em ambiente controlado no laboratório, obtendo, portanto, respostas tanto das condições fisiológicas do organismo perante as variáveis constantes, e como as variáveis ambientais podem influenciar a fisiologia do organismo, entendendo, assim, os dois lados da questão.

6.3. Localização das melanopsinas nas retinas de corujas

Análises morfológicas das retinas foram realizadas utilizando a técnica de imunohistoquímica em cortes histológicos de retinas das corujas *G. brasilianum*, *A. cunicularia* e *T. furcata*. Os anticorpos utilizados neste estudo para as marcações de imunohistoquímica foram desenvolvidos em coelhos contra a melanopsina de galinha (OPN4x) e contra a melanopsina de camundongo (OPN4m). Para verificar a especificidade dos anticorpos em relação às amostras analisadas, realizamos o alinhamento das sequências peptídicas utilizadas para a produção dos anticorpos com sequências de melanopsinas das corujas *T. alba* e *A. cunicularia*.

6.3.1. OPN4m

Os resultados da imunohistoquímica mostraram que a melanopsina OPN4m pode ser expressa na CFN nas espécies *G. brasiliannum* e *A. cunicularia*, na CF nas três espécies e na CCG nas espécies *T. furcata* e *G. brasiliannum* (Figura 39). Dentre as marcações obtidas, atenta-se para a marcação encontrada na espécie *G. brasiliannum* e *T. furcata*. A espécie *G. brasiliannum* possui um padrão de atividade diurno, e a marcação da melanopsina OPN4m na CCG apresentou uma maior expressão de células imunopositivas do que na espécie noturna *T. furcata* (Figura 39, F e G). A restrição da marcação de OPN4m nas camadas de fotorreceptores, ganglionares e fibra nervosa, pode estar relacionada com a função de controle apenas do ritmo circadiano, o mesmo perfil encontrado para a expressão do gene *Opn4m* em retinas de galinha *G. gallus* (Lima et al., 2011).

Os anticorpos para marcação da melanopsina OPN4m foram feitos na região transmembrânica no *loop* IV-V da estrutura da melanopsina de camundongo. Foram produzidos tres anticorpos em diferentes coelhos com a mesma sequência peptídica. A questão da especificidade para esta melanopsina é mais crítica. Quando alinhada no *protein-BLAST* com a sequência da *A. cunicularia* e *T. alba*, a homologia com a melanopsina foi de 92% e 100%, respectivamente. Porém, para OPN4m foi obtido alinhamento com outras opsinas: rodopsina (70% para ambas as espécies), 66% com RH2 (*A. cunicularia*), 60% com a peropsina (para ambas as espécies), 60% com opsina-5 e 67% com a opsina-3 na sequência da *T. alba*, e por isso experimentos de hibridização *in situ* ou a realização de competição dos anticorpos seriam necessários para confirmar estes resultados.

Na literatura é visto que o padrão de expressão da melanopsina varia entre as diversas classes de vertebrados. Dependendo da espécie, a melanopsina pode ser encontrada em diferentes camadas da retina, como nas células ganglionares, amácrinas, horizontais ou nos fotorreceptores clássicos (cones e bastonetes) (Hauzman et al., 2019, Cheng et al., 2009). Em relação a OPN4m, em mamíferos esta proteína é expressa apenas na subpopulação de células ganglionares intrinsecamente fotossensível (iPRGCs) da camada de células ganglionares. Dentre os vertebrados não mamíferos, a expressão da OPN4m não se restringe apenas nas iPRGCs. Em retinas de aves, como em *G. gallus*, esta proteína é encontra em quase todas as camadas de células nervosas, como camada de fotorreceptores (CF), camada nuclear interna (CNI) e camada de células ganglionares

(CCG), utilizando técnicas de hibridização *in situ* e imunocitoquímica (Chaurasia et al., 2005, Morera et al., 2016, Diaz et al., 2016). Apesar de nossos dados estarem de acordo com a literatura, ainda assim, se faz necessário mais experimentos como hibridização *in situ*, para localizar o RNA mensageiro da melanopsina, técnica de competição de anticorpos, ou a produção de anticorpos específicos para cada espécie de coruja, a fim de determinarmos se de fato estamos marcando a melanopsina, devido ao alinhamento do anticorpo com demais proteínas nas sequências das corujas.

6.3.2. OPN4x

Os ensaios realizados com diferentes anticorpos para a melanopsina OPN4x apontam para a expressão deste fotopigmento na CF, na CNI e na CCG das espécies *T. furcata* e *A. cunicularia* e na CF, CCG e CFN na espécie *G. brasilianum* (Figura 40).

Levando em consideração a ecologia das corujas com demais trabalhos realizados em aves, como galinha, podemos notar que, a melanopsina OPN4x apresenta um mesmo padrão de expressão em animais diurnos, noturnos e catemerais. Apesar disso, algumas diferenças podem ser destacadas: para o anticorpo produzido na região intramembrânica da melanopsina OPN4x, foi obtida uma marcação diferente na espécie diurna *G. brasilianum*, com uma expressão apenas na Camada de Fibras Nervosas, em comparação com a catemeral *A. cunicularia*, e noturna *T. furcata*. Para o anticorpo produzido na região C-terminal, foi encontrada uma semelhança entre as espécies diurna *G. brasilianum* e noturna *T. furcata*, com marcação dos fotorreceptores, porém, com uma exceção na CNE da *T. furcata*, na qual se observa uma pequena expressão nos núcleos dos fotorreceptores.

Resultados semelhantes foram obtidos por ensaios de imunohistoquímica conduzidos por Lima e colaboradores (2006), onde foi identificada a presença da melanopsina OPN4x em retinas de *G. gallus*, a partir da incubação de cortes histológicos com os mesmos anticorpos utilizados pelo presente estudo. Nossos resultados se assemelham a esses dados, pois, as retinas de *T. furcata* e *A. cunicularia* apresentaram intensa marcação em diferentes regiões da CNI, além de marcação na CCG com indicativo da presença da OPN4x em algumas células ganglionares. A intensa marcação na CNI também está de acordo com os resultados observados por Chaurasia e colaboradores (2005) e por Bailey e Cassone (2004) os quais utilizaram a técnica de hibridização *in situ* e imunocitoquímica na localização da melanopsina OPN4x em retina de *G. gallus*. Porém, na retina da espécie *G. brasilianum* a marcação foi restrita apenas na CF e CFN, divergindo dos dados da literatura.

Nossos resultados mostraram que, para o anticorpo OPN4x1, produzido na sequência intramembrânica, a porcentagem de homologia entre *A. cunicularia* e *G. gallus* foi de 66% e de 72% entre *T. alba* e *G. gallus*. Já a homologia apresentada para o anticorpo OPN4x2, produzido na região C-terminal com as sequências de *T. alba* e *A. cunicularia* contra *G. gallus* foi de 94% e 100%, respectivamente. Na literatura é visto que a região C-terminal da melanopsina pode se diferenciar entre os organismos, por exemplo, entre aves e mamíferos, ocasionando o surgimento de isoformas dos genes de melanopsina, e a região intramembrânica é mais conservada entre as espécies (Torii et al., 2007; Hughes et al., 2012; Schmidt et al., 2011; Quattrochi et al., 2013). Assim, observa-se que nas corujas, aparentemente, a região intramembrânica é mais diferenciada do grupo da galinha, fato não observado na região C-terminal, o qual teve uma homologia mais alta ao comparar os grupos de corujas e galinha, indicando uma maior homologia dentro do grupo das aves. Apesar das porcentagens de OPN4x1 serem baixas, não foi obtido um alinhamento com outras proteínas, logo podemos supor que embora os peptídeos tenham sido produzidos em outras espécies apresentaram boa especificidade para as sequências de melanopsinas de corujas. Porém, mais estudos são necessários, como a realização de hibridização *in situ*, confecção de anticorpos específicos para a melanopsina de corujas, para confirmar com maior grau de certeza o nível de especificidade destes anticorpos sobre as sequências amostradas.

Nossos resultados mostraram que a melanopsina em corujas pode estar localizada em diferentes camadas da retina: CF, CNI, CCG, além da CFN, assim como visto em retinas de aves (Chaurasia et al., 2005). Em relação a ecologia dos organismos estudados, a expressão da melanopsina em animais diurnos, noturnos e catemerais não se difere em relação a localização da melanopsina nas retinas, mas pode se diferenciar em relação a sua intensidade de expressão ao longo do dia, fato não avaliado neste estudo. Para tal, poderia-se observar a marcação por imunohistoquímica em retinas de diferentes espécies de corujas coletadas ao longo do dia para avaliar diferenças na expressão da melanopsina entre as camadas retinianas. A marcação nas várias camadas da retina nos permite interpretar que a melanopsina não está apenas relacionada com a regulação do ritmo circadiano, como por exemplo, em retinas de galinhas as células horizontais denominadas PROX1, expressam a melanopsina OPN4x e possuem a função de feedback nos processamentos visuais, contribuindo para a percepção de brilho e contraste (Lucas et al., 2020, Morera et al., 2016).

7. CONCLUSÃO

- A partir das análises genéticas foi possível concluir que os dois genes de melanopsina (*Opn4x* e *Op4m*) são expressos nas retinas das espécies de corujas *A. clamator*, *G. brasilianum* e *M. choliba*. Os resultados das análises filogenéticas apresentaram um clado monofilético de ambos os genes da melanopsina e a árvore filogenética encontrada no grupo das corujas recuperou a história evolutiva deste grupo, mostrando grupos monofiléticos formados pelas espécies *A. cunicularia* e *G. brasilianum* (catemeral e diurna) e *A. clamator* e *M. choliba* (noturnas).
- Análises morfológicas mostraram que a melanopsina OPN4m pode ser encontrada nas seguintes camadas da retina das corujas: camada de fotorreceptores, camada de células ganglionares, camada de fibras nervosas. A OPN4x pode ser expressa na camada de fotorreceptores, camada nuclear interna, camada de células ganglionares, camada de fibras nervosas. A diferença de expressão na camada nuclear interna da melanopsina OPN4x mostra, possivelmente, uma função diferente na retina das corujas, em comparação com a OPN4m.
- A quantificação gênica da melanopsina apontou uma variação no perfil de expressão entre as espécies noturna, diurna e catemeral. Para o gene *Opn4x*, foi observado uma expressão 2 vezes maior na espécie *A. clamator* (noturna) em comparação com *A. cunicularia* (catemeral), *G. brasilianum* (diurna) e *M. choliba* (noturna). Este fato indica que, a melanopsina *Opn4x* tenha um papel diferente da regulação do ritmo circadiano, podendo estar mais relacionada com processamento visual. Por outro lado, a expressão de *Opn4m* foi cerca de 2 vezes maior nas espécies *A. clamator*, *G. brasilianum* e *M. choliba* em relação com a *A. cunicularia*. Uma menor variação pode ser vista na espécie *G. brasilianum*, diurna, em relação as espécies noturnas. Estes dados podem sugerir que, a *Opn4m* pode estar mais relacionada com o controle do ritmo circadiano. Maiores estudos precisam ser realizados a fim de entendermos melhor a variação gênica da melanopsina ao longo do dia no grupo das corujas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, A. E., Storch, R., Martial, F. P., Bedford, R. A., & Lucas, R. J. (2017). Melanopsin contributions to the representation of images in the early visual system. *Current Biology*, 27(11), 1623-1632.
- Arendt, D. (2003). Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *International Journal of Developmental Biology*, 47(7-8), 563-571.
- Arruda, C. M., Oliani, S. R., & Varoli, F. M. F. (2007). Estudo do comportamento de *Athene cunicularia* (Strigiformes: Strigidae) na região de Araçoiaba da Serra-São Paulo, Brasil. In *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu-MG*.
- Assis, L. V. M., Moraes, M. N., da Silveira Cruz-Machado, S., & Castrucci, A. M. L. (2016). The effect of white light on normal and malignant murine melanocytes: a link between opsins, clock genes, and melanogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(6), 1119-1133.
- Assis, L. V. M., Moraes, M. N., Magalhães-Marques, K. K., & de Lauro Castrucci, A. M. (2018). Melanopsin and rhodopsin mediate UVA-induced immediate pigment darkening: Unravelling the photosensitive system of the skin. *European journal of cell biology*, 97(3), 150-162.
- Assis, L. V. M., Mendes, D., Silva, M. M., Kinker, G. S., Pereira-Lima, I., Moraes, M. N., ... & de Lauro Castrucci, A. M. (2020). Melanopsin mediates UVA-dependent modulation of proliferation, pigmentation, apoptosis, and molecular clock in normal and malignant melanocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1867(10), 118789.
- Bagnara, J.T. (1957) Hypophysectomy and the tail darkening reaction in *Xenopus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 94:572-575.
- Bagnara, J.T. (1974) The tail-darkening reaction of phyllomedusine tadpoles. *J. Exp. Zool.*, 187:149-154.
- Bagnara, J.T., and M. Obika (1967) Light sensitivity of melanophores in neural crest explants. *Experientia*, 23:155-157.
- Bailey, M. J., & Cassone, V. M. (2005). Melanopsin expression in the chick retina and pineal gland. *Molecular Brain Research*, 134(2), 345-348.
- Blanco-Vives, B. and Sánchez-Vázquez, F.J. 2009. Synchronisation to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish. *Physiol Behav*, 98: 268- 275.
- Barnard, A. R., Hattar, S., Hankins, M. W., & Lucas, R. J. (2006). Melanopsin regulates visual processing in the mouse retina. *Current biology*, 16(4), 389-395.
- Bayarri, M.J.; Muñoz-Cueto, J.A.; López-Olmeda, J.F.; Vera, L.M.; Rol de Lama, M.A.; Madrid, J.A. and Sánchez-Vázquez, F.J. 2004. Daily locomotor activity and melatonin rhythms in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Physiol Behav*, 81: 577-583.

- Bellingham, J., Chaurasia, S. S., Melyan, Z., Liu, C., Cameron, M. A., Tarttelin, E. E., Lucas, R. J. (2006). Evolution of melanopsin photoreceptors: discovery and characterization of a new melanopsin in nonmammalian vertebrates. *PLoS Biology*, 4(8), e254.
- Berson, D. M., Dunn, F. A., Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5557), 1070–3.
- Berson, D. M., Castrucci, A. M., Provencio, I. (2010). Morphology and mosaics of melanopsin-expressing retinal ganglion cell types in mice. *Journal of Comparative Neurology*, 518(13), 2405-2422.
- Boden, M. J.; Kennaway, D.J. Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction*, v. 132, p. 379-392, 2006.
- Bonmati-Carrion, M. A., Hild, K., Isherwood, C., Sweeney, S. J., Revell, V. L., Skene, D. J.; Madrid, J. A. (2016). Relationship between Human Pupillary Light Reflex and Circadian System Status. *PLOS ONE*, 11(9), e0162476.
- Borges, R., Johnson, W. E., O'Brien, S. J., Vasconcelos, V., Antunes, A. (2012). The role of gene duplication and unconstrained selective pressures in the melanopsin gene family evolution and vertebrate circadian rhythm regulation. *PLoS One*, 7(12), e52413.
- Bowmaker, J. K. Evolution of colour vision in vertebrates. *Eye*, v. 12, p. 541-547, 1998.
- Bowmaker, J. K. The evolution of Vertebrate Visual Pigments and Photoreceptors. In: Cronly-Dillon, J. & Gregory, R.L. (eds). 1991. *Vision and Visual Dysfunction vol 2: Evolution of the Eye and Visual System*. Macmillan Press.
- Cassone, V. M. (2014). Avian circadian organization: a chorus of clocks. *Frontiers in neuroendocrinology*, 35(1), 76-88.
- Castoe, T. A., de Koning, A. J., Hall, K. T., Card, D. C., Schield, D. R., Fujita, M. K., ... & Pollock, D. D. (2013). The Burmese python genome reveals the molecular basis for extreme adaptation in snakes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(51), 20645-20650.
- Cespedes, C. D. S. (2020). Efeito da temperatura sobre os sistemas endócrino e circadiano de *Danio rerio*. Uma abordagem in vivo (Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo).
- Chaurasia, S. S., Rollag, M. D., Jiang, G., Hayes, W. P., Haque, R., Natesan, A., et al. (2005). Molecular cloning, localization and circadian expression of chicken melanopsin (Opn4): differential regulation of expression in pineal and retinal types. *Journal of Neurochemistry*, 92, 158–170.
- Cheng, N., Tsunenari, T., & Yau, K. W. (2009). Intrinsic light response of retinal horizontal cells of teleosts. *Nature*, 460(7257), 899.
- Cowing, J. A., Poopalasundaram, S., Wilkie, S. E., Robinson, P. R., Bowmaker, J. K., & Hunt, D. M. (2002). The molecular mechanism for the spectral shifts between vertebrate ultraviolet- and violet-sensitive cone visual pigments. *The Biochemical Journal*, 367(Pt 1), 129–135.
- Cutrer, A.P.; Antinuchi, C. D.; Vasallo, A. I. 2006. Home range and activity patterns of the South American subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Journal of Mammalogy* 87(6):1183-1191.
- Davies, W.I., Zheng, L., Hughes, S., Tamai, T.K., Turton, M., Halford, R.G., Whitmore, D., Hankins, M.W. (2011). Functional diversity of melanopsins and their global expression in

- the teleost retina. *Cell Mol Life Sci*, 689240: 4115-4132.
- Dearworth, J. R., Selvarajah, B. P., Kalman, R. A., Lanzone, A. J., Goch, A. M., Boyd, A. B., Cooper, L. J. (2011). A mammalian melanopsin in the retina of a fresh water turtle, the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*). *Vision Research*, 51(2), 288–295.
- Díaz, N. M., Morera, L. P., Verra, D. M., Contin, M. A., & Guido, M. E. (2014). Early appearance of nonvisual and circadian markers in the developing inner retinal cells of chicken. *BioMed Research International*, 646847.
- Díaz, N. M., Morera, L.P., Guido M. E. (2016). Melanopsin and the Non-visual Photochemistry in the Inner Retina of Vertebrates. *Photochem Photobiol.* Jan;92 (1):29-44.
- Doyle, S., Menaker, M. Circadian photoreception in vertebrates. In: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. Vol. 72. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2007.
- Ebrey, T. G., & Takahashy, Y. (2002). Photobiology of Retinal Proteins. In T. P. Coohill & D. P. Valenzano (Eds.), *Photobiology for the 21st century* (pp. 101–133). Valdenmar Pub. Co.
- Enright, J. T. (1970). Ecological aspects of endogenous rhythmicity. *Annual review of ecology and systematics*, 1(1), 221-238.
- Ehlers, C. L., Frank, E., & Kupfer, D. J. (1988). Social zeitgebers and biological rhythms: a unified approach to understanding the etiology of depression. *Archives of general psychiatry*, 45(10), 948-952.
- Espíndola-Hernández, P., Mueller, J. C., Carrete, M., Boerno, S., & Kempenaers, B. (2020). Genomic evidence for sensorial adaptations to a nocturnal predatory lifestyle in owls. *Genome biology and evolution*, 12(10), 1895-1908.
- Frigato, E., Vallone, D., Bertolucci, C., & Foulkes, N. S. (2006). Isolation and characterization of melanopsin and pinopsin expression within photoreceptive sites of reptiles. *Naturwissenschaften*, 93(8), 379–385.
- Grandin, L. D., Alloy, L. B., & Abramson, L. Y. (2006). The social zeitgeber theory, circadian rhythms, and mood disorders: review and evaluation. *Clinical psychology review*, 26(6), 679-694.
- Grone, B. P., Zhao, S., Chen, C. C., & Fernald, R. D. (2007). Localization and diurnal expression of melanopsin, vertebrate ancient opsin, and pituitary adenylate cyclase-activating peptide mRNA in a teleost retina. *Journal of biological rhythms*, 22(6), 558-561.
- Hanna, Z. R., Henderson, J. B., Wall, J. D., Emerling, C. A., Fuchs, J., Runckel, C., ... & Dumbacher, J. P. (2017). Northern spotted owl (*Strix occidentalis caurina*) genome: divergence with the barred owl (*Strix varia*) and characterization of light-associated genes. *Genome biology and evolution*, 9(10), 2522-2545.
- Hannibal, J., Georg, B., Hindersson, P., & Fahrenkrug, J. (2005). Light and darkness regulate melanopsin in the retinal ganglion cells of the albino Wistar rat. *Journal of molecular neuroscience*, 27(2), 147-155.
- Hannibal, J., Georg, B., & Fahrenkrug, J. (2013). Differential expression of melanopsin mRNA and protein in Brown Norwegian rats. *Experimental eye research*, 106, 55-63.
- Hauzman, E., Kalava, V., Bonci, D. M. O., & Ventura, D. F. (2019). Characterization of the

- melanopsin gene (Opn4x) of diurnal and nocturnal snakes. *BMC evolutionary biology*, 19(1), 1-12.
- Herrero, M.J.; Madrid, J.A. and Sánchez-Vázquez, F.J. 2003. Entrainment to light of circadian activity rhythms in tench (*Tinca tinca*). *Chronobiol Int*, 20: 1001-1017.
- Hocking B, Mitchell BL (1961): Owl vision. *Ibis* 103a:284–288.
- Hughes, S., Welsh, L., Katti, C., Gonzalez-Menendez, I., Turton, M., Halford, S., Sekaran, S., Peirson, S.N., Hankins, M.W., Foster, R.G. (2012). Differential expression of melanopsin isoforms Opn4L and Opn4S during postnatal development of the mouse retina. *PLoS One*, 7(4), e34531.
- Jarvis, E. D., Mirarab, S., Aberer, A. J., Li, B., Houde, P., Li, C., ... & Zhang, G. (2014). Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science*, 346(6215), 1320-1331.
- Kolb, H.; Nelson, R.; Ahnelt, P.; Cuenca, N. Cellular organization of the vertebrate retina. *Progress in brain research*, v. 131, p. 3-26, 2001.
- Koyanagi, M., Kubokawa, K., Tsukamoto, H., Shichida, Y., & Terakita, A. (2005). Cephalochordate melanopsin: evolutionary linkage between invertebrate visual cells and vertebrate photosensitive retinal ganglion cells. *Current Biology*, 15(11), 1065-1069.
- Lima, L. H., Scarparo, A. C., Isoldi, M. C., Visconti, M. A., & Castrucci, A. M. (2006). Melanopsin in chicken melanocytes and retina. *Biological Rhythm Research*, 37(5), 393-404.
- Lima, L. H. R. G.; Dos Santos, K. P.; Castrucci, A. M. L. Clock genes, melanopsins, melatonin, and dopamine key enzymes and their modulation by light and glutamate in chicken embryonic retinal cells. *Chronobiology international*, v. 28, n. 2, p. 89-100, 2011.
- Lucas, R, Douglas, R, Foster, R (2001) Characterization of an ocular photopigment capable of driving pupillary constriction in mice. *Nat Neurosci* 4:621-626.
- Lucas, R. J., Allen, A. E., Milosavljevic, N., Storchi, R., & Woelders, T. (2020). Can We See with Melanopsin? *Annual Review of Vision Science*, 6, 453-468.
- Luna, F. Antinuchi, C. D. 2003. Daily movements and maximum speed in *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae) in artificial enclosures. *Journal of Mammalogy*: 84(1):272-277.
- Martin GR (1982): An owl's eye: schematic optics and visual performance in *Strix aluco* L. *J Comp Physiol A* 145:341–349.
- McClellan D., Palfreyman EJ, Smith MJ, Moss JL, Christensen RG, et al. (2005) Physicochemical evolution and molecular adaptation of the cetacean and artiodactyl cytochrome b proteins. *Molecular biology and evolution* 22: 437–455.
- Menaker, M.; Moreira, L.; Tosini, G. (1997). Evolution of circadian organization in vertebrates. *Braz J Med Biol Res*, 30: 305-15.
- Menq, W. (2013). Corujas e seus poderes de caça.
http://www.avesderapinabrasil.com/materias/corujas_predacao.htm.

- Mirick, D. K., & Davis, S. (2008). Melatonin as a biomarker of circadian dysregulation. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 17(12), 3306–13. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0605
- Morera, L. P., Díaz, N. M., & Guido, M. E. (2016). Horizontal cells expressing melanopsin x are novel photoreceptors in the avian inner retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(46), 13215-13220.
- Moraes M.N., de Assis L.V.M., Magalhães-Marques K.K., Poletini M.O., de Lima L.H.R.G., Castrucci A.M.L. Melanopsin, a Canonical Light Receptor, Mediates Thermal Activation of Clock Genes. *Sci Rep*. 2017 Oct 25;7(1):13977. doi: 10.1038/s41598-017-13939-3.
- Motta-Junior, J. C., Alho, C. J. R., & Belentani, S. C. S. (2004). Food habits of the Striped Owl *Asio clamator* in southeast Brazil. 6th World Conference on Birds of Prey and Owls, (1980), 777–784.
- Motta-Junior, J. C., Bueno, A. D. A., & Braga, A. C. R. (2004). Corujas brasileiras. *Departamento de Ecologia, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo*.
- Moyes, C. D., & Schulte, P. M. (2009). *Princípios de fisiologia animal*. Artmed Editora.
- Panda, S., Provencio, I., Tu, D. C., Pires, S. S., Rollag, M. D., Castrucci, A. M., ... & Kay, S. A. (2003). Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science*, 301(5632), 525-527.
- Park, K., & Kang, H. M. (2006). Circadian expression of clock genes in the rat eye and brain. *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*, 22(3).
- Pfeffer, M., Korf, H.-W., Wicht, H. (2017). The Role of the Melatonergic System in Light-Entrained Behavior of Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3).
- Pires, S. S., Hughes, S., Turton, M., Melyan, Z., Peirson, S. N., Zheng, L., Kosmaoglou, M., Bellingham, J., Cheetham, M. E., Lucas, R. J., Foster, R. G., Hankins, M. W., Halford, S. (2009). Differential expression of two distinct functional isoforms of melanopsin (Opn4) in the mammalian retina. *Journal of Neuroscience*, 29(39), 12332-12342.
- Pough, F. H., Heiser, J. B., & McFarland, W. N. (2003). *A vida dos vertebrados* (Vol. 3). São Paulo: Atheneu.
- Provencio, I., Rodriguez, I. R., Jiang, G., Hayes, W. P., Moreira, E. F., & Rollag, M. D. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(2), 600–5.
- Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W. J., Hayes, W. P., & Rollag, M. D. (1998). Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(1), 340–5.
- Quattrochi, L. E., Estevez, M., Kim, I., & Berson, D. M. (2013). Structure, function and outputs of a novel type of ganglion-cell photoreceptor. In *Soc Neurosci* (Vol. 737, p. 15).
- Ramón y Cajal, S. (1893). La Rétine des Vertébrés. *La Cellule*, 9, 17–257.
- Randi, E., Fusco, G. E. A., Lorenzini, R., & Spina, F. (1991). Allozyme divergence and phylogenetic relationships within the Strigiformes. *The Condor*, 93(2), 295-301.

- Rupp, A. C., Ren, M., Altimus, C. M., Fernandez, D. C., Richardson, M., Turek, F., ... & Schmidt, T. M. (2019). Distinct ipRGC subpopulations mediate light's acute and circadian effects on body temperature and sleep. *Elife*, 8, e44358.
- Sandbakken, M., Ebbesson, L., Stefansson, S., & Helvik, J. V. (2012). Isolation and characterization of melanopsin photoreceptors of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Comparative Neurology*, 520(16), 3727-3744.
- Schmidt, T.; Do, M.; Dacey, D.; Lucas, R.; Hattar, S.; Matynia, A. (2011). Melanopsin-Positive Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells: From Form to Function. *The Journal of Neuroscience*, 31(45)16094-16101.
- Schulz, U.H. and Leuchtenberger, C. 2006. Activity patterns of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Braz J Biol*, 66: 565-574.
- Shapley R.; Hawken, M. J. Color in the cortex: single- and double-opponent cells. *Vision Research*, v. 51, p. 701-717. 2011.
- Sick, H. Sick, H. Sick, H. 1997. *Ornitologia Brasileira*. Nova Fronteira Ed.
- Sick, H. 1993. *Birds in Brazil. A natural history*. Princeton University Press, Princeton.
- Sousa, C. E. C., da Silveira Cruz-Machado, S., & Tamura, E. K. (2008). Os ritmos circadianos e a reprodução em mamíferos. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução (Descontinuada)*, 27(1/2).
- Tachinardi, P. (2012). Efeitos das variações de temperatura ambiental em ritmos circadianos. *Revista da Biologia*.
- Tomonari, S., Takagi, A., Akamatsu, S., Noji, S., & Ohuchi, H. (2005). A non-canonical photopigment, melanopsin, is expressed in the differentiating ganglion, horizontal, and bipolar cells of the chicken retina. *Developmental Dynamics*, 234(3), 783-790.
- Tomotani, B. M. (2011). *Pós-efeitos da sincronização em campo e a fase de atividade do roedor subterrâneo tuco-tuco (Rodentia: Ctenomyidae)* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Torii, Masaki, et al. "Two isoforms of chicken melanopsins show blue light sensitivity." *FEBS letters* 581.27 (2007): 5327-5331.
- Underwood, H., & Siopes, T. (1984). Circadian organization in Japanese quail. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 232(3), 557-566.
- Underwood, H., Barrett, R. K., & Siopes, T. (1990). The quail's eye: a biological clock. *Journal of biological rhythms*, 5(3), 257-265.
- Underwood, H., Steele, C. T., & Zivkovic, B. (2001). Circadian organization and the role of the pineal in birds. *Microscopy research and technique*, 53(1), 48-62.
- Valentinuzzi, V. S.; Oda, G. A; Araújo, J.F; Ralph, M. R., 2009. Circadian pattern of wheel running activity of a South American subterranean rodent (*Ctenomys knighti*). *Chronobiology International* 26: 14-27.
- Veras, G. C., Murgas, L. D. S., Zangeronimo, M. G., Oliveira, M. M., Rosa, P. V., & Felizardo, V. O. (2013). Ritmos biológicos e fotoperíodo em peixes. *Archivos de Zootecnia*, 62, 25-43.

- Wink, M., El-Sayed, A. A., Sauer-Gürth, H., & Gonzalez, J. (2009). Molecular phylogeny of owls (Strigiformes) inferred from DNA sequences of the mitochondrial cytochrome b and the nuclear RAG-1 gene. *Ardea*, 97(4), 581-591.
- Wood, S., & Loudon, A. (2014). Clocks for all seasons: unwinding the roles and mechanisms of circadian and interval timers in the hypothalamus and pituitary. *The Journal of Endocrinology*, 222(2), R39–59. doi:10.1530/JOE-14-0141.
- Yokoyama, Shozo. (1996). Molecular evolution of retinal and nonretinal opsins. *Genes to Cells*, 1(9), 787–794. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.d01-273.x>.
- Yokoyama, S. Evolution of Dim-Light and Color Vision Pigments. (2008). *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9, 259–82.
- Yokoyama, S.; Blow, N. S.; Radlwimmer, F. B. (2000). Molecular evolution of color vision of zebra finch. *Gene*, p. 17–24.

ANEXO 1.

INSTITUTO DE PSICOLOGIA
www.ip.usp.br

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise da expressão dos genes de melanopsina na retina da coruja-buraqueira (*Athene cunicularia*)", protocolada sob o CEUA nº 5691140818, sob a responsabilidade de **Profª Drª Daniela Maria Oliveira Bonci e equipe; Maria Júlia Vilani Naman; Dora Selma Fix Ventura; Einat Hauzman; Jerome Baron** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo (CEUA/IPUSP) na reunião de 30/08/2018.

We certify that the proposal "Analysis of the expression of melanopsin genes in the retina of the burrowing owl (*Athene cunicularia*)", utilizing 6 Birds (males and females), protocol number CEUA 5691140818, under the responsibility of **Profª Drª Daniela Maria Oliveira Bonci and team; Maria Júlia Vilani Naman; Dora Selma Fix Ventura; Einat Hauzman; Jerome Baron** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Psychology Institute - Universidade de São Paulo (CEUA/IPUSP) in the meeting of 08/30/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2018 a 09/2021** Área: **Psicologia Experimental**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Aves**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 2 anos**

N: **6**

Linhagem: ***Athene cunicularia***

Peso: **147 a 180 g**

São Paulo, 12 de junho de 2019

Profª.Dra. Miriam García Mijares
Presidente em Exercício da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Profª Dra Ronara de Souza Ferreira Chãline
Vice Presidente
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

ANEXO 2.

Espécies utilizadas nas análises filogenéticas e números de acesso no Genbank.

Gene	Vertebrados	Espécies	Nome comum	Acesso no Genbank
Opn4x	Anfíbios	<i>Nanorana parkeri</i>	Sapo do alto Himalaia	XM_018554495.1
		<i>Xenopus laevis</i>	Rã-de-unhas-africana	NM_001085674.1
		<i>Xenopus tropicalis</i>	Sapo-com-garras-do-ocidente	XM_031903158.1
	Aves	<i>Athene cunicularia</i>	Coruja-buraqueira	XM_026848001.1
		<i>Balearica regulorum gibbericeps</i>	Grou-coroador-oriental	XM_010305774.1
		<i>Buceros rhinoceros silvestris</i>	Calau-rinoceronte	XM_010145660.1
		<i>Chlamydotis macqueenii</i>	Abetarda Houbara	XM_010115979.1
		<i>Colius striatus</i>	Mousebird salpicado	XM_010210159.1
		<i>Egretta garzetta</i>	Garça-branca-pequena	XM_009634774.1
		<i>Falco peregrinus</i>	Falcão-peregrino	XM_027779975.1
		<i>Gallus gallus</i>	Galinha	NM_204625.3
		<i>Haliaeetus albicilla</i>	Águia-rabalva	XM_009914040.1
		<i>Leptosomus discolor</i>	Rolo de cuco	XM_009948938.1
		<i>Mesitornis unicolor</i>	Mesito marrom	XM_010180958.1
		<i>Nestor notabilis</i>	Papagaio-da-nova-zelândia	XM_010023292.1
		<i>Pygoscelis adeliae</i>	Pinguim de Adélie	XM_009329756.1
		<i>Tyto alba</i>	Coruja-das-torres	XM_033004495.1
	Peixes	<i>Betta splendens</i>	Peixe- lutador-siamês	XM_029168258.1
		<i>Callorhinchus milii</i>	Tubarão-elefante	NM_001292191.1
		<i>Carassius auratus</i>	Peixinho-dourado	XM_026274121.1
		<i>Danio rerio</i>	Peixe-zebra	NM_001258223.1
		<i>Lepisosteus oculatus</i>	Boca de jacaré	XM_015340274.1
		<i>Scleropages formosus</i>	Aruanã Asiática	XM_018750164.2
	Répteis	<i>Bothrops jararaca</i>	Jararaca-comum	MN241125
		<i>Chironius bicarinatus</i>	Cobra-cipó-verde	MN241126
		<i>Helicops modestus</i>	Cobra d'água	MN241133.1
		<i>Micrurus corallinus</i>	Coral-verdadeira	MN241134
		<i>Notechis scutatus</i>	Cobra-tigre	XM_026672626.1
		<i>Podarcis muralis</i>	Lagarto comum da parede	XM_028744000.1
		<i>Podarcis sicula</i>	Lagartixa do mato	DQ013043.2
		<i>Pogona vitticeps</i>	Dragões-barbudos	XM_020798658.1
		<i>Pseudonaja textilis</i>	Cobra-marrom	XM_026697858.1
		<i>Python bivittatus</i>	Pitão birmanês	XM_007429400.1
Gene	Vertebrados	Espécies	Nome comum	Acesso no Genbank
Opn4m	Anfíbios	<i>Microcaecilia unicolor</i>	Minúsculo Cayenne Caecilian	XM_029610695.1
		<i>Nanorana parkeri</i>	Sapo do alto Himalaia	XM_018569942.1
		<i>Rhinatrema bivittatum</i>	Dois-alinhado caecilians	XM_029610695.1
		<i>Xenopus laevis</i>	Rã-de-unhas-africana	XM_018239430.1
		<i>Xenopus tropicalis</i>	Sapo-com-garras-do-ocidente	XM_002937570.4

Aves	<i>Athene cunicularia</i>	Coruja-buraqueira	XM_026851874.1
	<i>Egretta garzetta</i>	Garça-branca-pequena	XM_009649218.1
	<i>Empidonax traillii</i>	Maria-fíbiu	XM_027895937.1
	<i>Falco peregrinus</i>	Falcão-peregrino	XM_027785703.1
	<i>Gallus gallus</i>	Galinha	AY882944.1
	<i>Haliaeetus leucocephalus</i>	Águia-de-cabeça-branca	XM_010567879.1
	<i>Nestor notabilis</i>	Papagaio-da-nova-zelândia	XM_010018308.1
	<i>Nipponia nippon</i>	Íbis-do-japão	XM_009465954.1
	<i>Opisthocomus hoazin</i>	Jacu-cigano	XM_009935095.1
	<i>Pelecanus crispus</i>	Pelicano-crespo	XM_009482021.1
	<i>Pygoscelis adeliae</i>	Pinguim-de-adélia	XM_009334644.1
	<i>Taeniopygia guttata</i>	Mandarim	XM_002191956.5
	<i>Tyto alba</i>	Coruja-das-torres	XM_032994120.1

Mamíferos	<i>Cricetulus griseus</i>	Hamster chinês	XM_007639410.3
	<i>Grammomys surdaster</i>	Rato do mato	XM_028789140.1
	<i>Macaca mullata</i>	Macaco-rhesus	XM_028826398.1
	<i>Meriones unguiculatus</i>	Gerbos da Mongólia	XM_021635996.1
	<i>Microtus ochrogaster</i>	Ratazana da pradaria	XM_005348669.3
	<i>Mus musculus</i>	Camundongo	NM_013887.2
	<i>Peromyscus leucopus</i>	Rato de patas brancas	XM_028878303.1
	<i>Rattus rattus</i>	Rato preto	XM_032919108.1

Peixes	<i>Carassius auratus</i>	Peixinho-dourado	XM_026250699.1
	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	Linguado	XM_008321406.1
	<i>Danio rerio</i>	Peixe-zebra	AY078161.1
	<i>Esox lucius</i>	Peixe Lucio	XM_010870243.1
	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Peixe-diabo	XM_021313052.1
	<i>Ictalurus punctatus</i>	Bagre-americano	NM_001200310.1
	<i>Larimichthys crocea</i>	Corvina amarela grande	XM_027275886.1
	<i>Mastacembelus armatus</i>	Moreia Marca de Pneu	XM_026309362.1
	<i>Notothenia coriiceps</i>	Bacalhau-da-Antártida	XM_010777649.1
	<i>Rutilus rutilus</i>	Pardelha-dos-alpes	AY226847.1
	<i>Salmo salar</i>	Salmão	NM_001279057.1
	<i>Stegastes partitus</i>	Jaqueta bicolor	XM_008288334.1

Gene	Vertebrados	Espécies	Nome comum	Acesso no Genbank
Opn4m	Répteis	<i>Anolis carolinensis</i>	Falso camaleão	XM_008119111.1
		<i>Chelonia mydas</i>	Tartaruga-verde	XM_007069593.1
		<i>Chrysemys picta bellii</i>	Tartaruga-pintada	XM_005293970.1
		<i>Lacerta agilis</i>	Lagarto ágil	XM_033148823.1
		<i>Pelodiscus sinensis</i>	Tartaruga-de-carapaça-mole-chinesa	XM_014578738.1
		<i>Podarcis muralis</i>	Lagarto comum da parede	XM_028728454.1
		<i>Pogona vitticeps</i>	Dragões-barbudos	XM_020805958.1
		<i>Terrapene carolina triunguis</i>	Tartaruga de caixa	XM_024210165.2
		<i>Trachemys scripta elegans</i>	Tartarugas de Orelhas Vermelhas	HM197714.1

ANEXO 3.

Protein-BLAST das sequências peptídicas dos anticorpos da melanopsina OPN4m (UF017, UF018, UF019) e OPN4x (OPN4x1 e OPN4x2), com a sequência do transcriptoma de *Athene cunicularia* e *Tyto alba* publicadas no genbank (NCBI).

OPN4m

OPN4m – *Athene cunicularia*

melanopsin isoform X1 [*Athene cunicularia*]

Sequence ID: [XP_026707672.1](#) Length: **533** Number of Matches: **1**

Range 1: 205 to 217 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
41.8 bits(91)	7e-07	12/13(92%)	13/13(100%)	0/13(0%)

Query 1 GWSAYVPEGLLTS 13
GWSAYVPEGL+TS
Sbjct 205 GWSAYVPEGLMTS 217

rhodopsin [*Athene cunicularia*]

Sequence ID: [XP_026712941.1](#) Length: **357** Number of Matches: **1**

Range 1: 174 to 183 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
25.7 bits(53)	0.41	7/10(70%)	9/10(90%)	0/10(0%)

Query 1 GWSAYVPEGL 10
GWS Y+PEG+
Sbjct 174 GWSRYIPEGM 183

green-sensitive opsin [*Athene cunicularia*]

Sequence ID: [XP_026720308.1](#) Length: **355** Number of Matches: **1**

Range 1: 175 to 183 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
23.1 bits(47)	3.3	6/9(67%)	8/9(88%)	0/9(0%)

Query 2 WSAYVPEGL 10
WS Y+PEG+
Sbjct 175 WSRYPPEGM 183

visual pigment-like receptor peropsin isoform X1 [*Athene cunicularia*]

Sequence ID: [XP_026701289.1](#) Length: **397** Number of Matches: **1**

Range 1: 274 to 286 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
22.3 bits(45)	6.8	9/15(60%)	9/15(60%)	5/15(33%)

Query 2 WSAY--VPEGLLTS 13
WSAY VP LTS
Sbjct 274 WSAYGHPVPN--LTS 286

OPN4m – *Tyto alba*

melanopsin [Tyto alba alba]

Sequence ID: [XP_032850011.1](#) Length: 445 Number of Matches: 1

Range 1: 168 to 180 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
44.3 bits(97)	1e-07	13/13(100%)	13/13(100%)	0/13(0%)

Query 1 GWSAYVPEGLLTS 13
GWSAYVPEGLLTS
Sbjct 168 GWSAYVPEGLLTS 180

rhodopsin, partial [Tyto alba alba]

Sequence ID: [XP_032843714.1](#) Length: 357 Number of Matches: 1

Range 1: 174 to 183 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
25.7 bits(53)	0.53	7/10(70%)	9/10(90%)	0/10(0%)

Query 1 GWSAYVPEGL 10
GWS Y+PEG+
Sbjct 174 GWSRYIPEGM 183

Visual pigment-like receptor peropsin, partial [Tyto alba]

Sequence ID: [KFV57782.1](#) Length: 208 Number of Matches: 1

Range 1: 161 to 173 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
22.3 bits(45)	8.8	9/15(60%)	9/15(60%)	5/15(33%)

Query 2 WSAY---VPEGLLTS 13
WSAY VP LTS
Sbjct 161 WSAYGHPVPN--LTS 173

opsin-5 [Tyto alba alba]

Sequence ID: [XP_009970422.2](#) Length: 397 Number of Matches: 1

Range 1: 274 to 286 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
22.3 bits(45)	8.9	9/15(60%)	9/15(60%)	5/15(33%)

Query 2 WSAY---VPEGLLTS 13
WSAY VP LTS
Sbjct 274 WSAYGHPVPN--LTS 286

Opsin-3, partial [Tyto alba]

Sequence ID: [KFV59681.1](#) Length: 110 Number of Matches: 1

Range 1: 53 to 61 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
19.3 bits(38)	104	6/9(67%)	6/9(66%)	0/9(0%)

Query 1 GWSAYVPEG 9
GWS Y EG
Sbjct 53 GWSSYGVEG 61

pinopsin-like [Tyto alba alba]

Sequence ID: [XP_032853008.1](#) Length: 397 Number of Matches: 1

Range 1: 192 to 200 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
19.3 bits(38)	105	6/9(67%)	6/9(66%)	0/9(0%)
Query 1	GPSAYVPEG 9			
	GPS Y EG			
Sbjct 192	GPSYGVPEG 200			

OPN4x

OPN4x1 – *Athene cunicularia*

melanopsin-like isoform X1 [Athene cunicularia]

Sequence ID: [XP_026703798.1](#) Length: 585 Number of Matches: 1

[See 2 more title\(s\)](#) [▼ See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 432 to 449 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
33.3 bits(71)	0.002	12/18(67%)	12/18(66%)	1/18(5%)
Query 1	SSSLRQ-KRDLLPDSYSC 17			
	S LRQ KRDLLP SC			
Sbjct 432	STNLRQEKRDLLPKTWSC 449			

OPN4x1- *Tyto alba*

melanopsin isoform X1 [Tyto alba alba]

Sequence ID: [XP_032860384.1](#) Length: 569 Number of Matches: 2

[See 2 more title\(s\)](#) [▼ See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 416 to 433 [GenPept](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
37.1 bits(80)	1e-04	13/18(72%)	13/18(72%)	1/18(5%)
Query 1	SSSLRQ-KRDLLPDSYSC 17			
	S SLRQ KRDLLP SC			
Sbjct 416	STSLRQEKRDLLPQTSC 433			

OPN4x2 – *Athene cunicularia*

melanopsin-like isoform X1 [Athene cunicularia]

Sequence ID: [XP_026703798.1](#) Length: **585** Number of Matches: **2**

[See 2 more title\(s\)](#) ▼ [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 570 to 585 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
51.5 bits(114)	5e-10	16/16(100%)	16/16(100%)	0/16(0%)
Query 1	LSSSTEFLEAVEKFLS	16		
	LSSSTEFLEAVEKFLS			
Sbjct 570	LSSSTEFLEAVEKFLS	585		

OPN4x2 – *Tyto alba*

melanopsin isoform X1 [Tyto alba alba]

Sequence ID: [XP_032860384.1](#) Length: **569** Number of Matches: **3**

[See 2 more title\(s\)](#) ▼ [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 554 to 569 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
48.1 bits(106)	9e-09	15/16(94%)	15/16(93%)	0/16(0%)
Query 1	LSSSTEFLEAVEKFLS	16		
	LSSS EFLEAVEKFLS			
Sbjct 554	LSSSAEFLEAVEKFLS	569		

APÊNDICE 1.

Dados das coletas de todas as espécies de corujas.

Espécie	Sexo	Olhos	Dia da eutanasia	Horário	Temperatura	Umidade
AC1109	fêmea	OD e OE	14/08/2019	12h10min	24.3°C	53.9%
AC1201	fêmea	OD e OE	15/08/2019	11h39min	21.5°C	49%
AC1115	fêmea	OD e OE	15/08/2019	12h15min	21.3°C	50%
MC1602	fêmea	OD e OE	16/08/2019	11h50min	20.9°C	48.5%
GB1901	fêmea	OD e OE	16/08/2019	12h20min	20.9°C	48.8%
AC0805	fêmea	OD e OE	17/08/2019	11h30min	21.6°C	49%
AS1404	fêmea	OD e OE	17/08/2019	12h	22.0°C	50%
AC0609	macho	OD e OE	18/08/2019	11h30min	22.2°C	54.0%
AS1103	macho	OD e OE	18/08/2019	11h58min	22.8°C	46.4%
AS1904	macho	OD e OE	18/08/2019	12h30min	22.9°C	43.9%
MC1501	fêmea	OD e OE	19/08/2019	11h26min	24.9°C	44.5%
GB1902	fêmea	OD e OE	19/08/2019	11h58min	24.7°C	44.4%
AS1902	fêmea	OD e OE	19/08/2019	12h30min	24.8°C	44.6%
MC1903	fêmea	OD e OE	20/08/2019	11h30min	22.4°C	48%
GB1903	macho	OD e OE	20/08/2019	12h	22.9°C	48.5%
AS1005	fêmea	OD e OE	20/08/2019	12h30min	22.9°C	48.7%
MC1901	fêmea	OD e OE	21/08/2019	11h35min	24.9°C	56.2%
GB1905	macho	OD e OE	21/08/2019	12h08min	25.0°C	55.9%
MC1902	macho	OD e OE	22/08/2019	11h30min	23.2°C	62.0%
GB1904	fêmea	OD e OE	22/08/2019	12h10min	23.2°C	60.9%

APÊNDICE 2.

Alinhamento das sequências de *Opn4x* e *Opn4m* entre as corujas deste estudo (*Asio clamator*, *Glaucidium brasilianum* e *Megascops choliba*) com as sequências submetidas no Genbank da *Athene cunicularia* e *Tyto alba*.

Opn4x

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
A. cunicularia	ATGCTGGT	GCTTTGGAAA	CTGAGTGG	CATGCTG	CAGGGTTT	GAACATGG	GACGAG	CTTACTCT	GACCAAGG
Tyto alba	CTCAGCTT	TACAAACAT	GACACGAG	CAAGATG	CGCGAGGG	TTTGAACAT	GGGACG	CACTCTAT	TCTGTTAC
A. clamator									
G. brasilianum									
M. choliba									
	110	120	130	140	150	160	170	180	190
A. cunicularia	TTTACACAG	TAGGAACG	TGTGTGCT	CAITATTG	GCTCTGTT	GGCATCAT	TGGAAAC	CTCTAGTT	TCTCTACAC
Tyto alba	TTTACACAG	TAGGAACG	TGTGTGCT	CAITATTG	GCTCTGTT	GGCATCAT	TGGAAAC	CTCTAGTT	TCTCTACAC
A. clamator									
G. brasilianum									
M. choliba									
	210	220	230	240	250	260	270	280	290
A. cunicularia	ACCCCAAA	CTACTTTA	TATGAATT	TGGCTGT	GAGTGACT	TCTGATG	TCAGCTT	CTCAGG	CGCCATG
Tyto alba	ATCCCAAA	CTACTTTA	TATGAATT	TGGCTGT	GAGTGACT	TCTGATG	TCAGCTT	CTCAGG	CGCCATG
A. clamator									
G. brasilianum									
M. choliba									
	310	320	330	340	350	360	370	380	390
A. cunicularia	ATACTTGG	AGATATAG	GGGTGTGA	ATTGTACG	CTTTCTG	TGGGGC	CACTCTT	CGGAATA	AOCTCAAT
Tyto alba	ATACTTGG	AGATATAG	GGGTGTGA	ATTGTACG	CTTTCTG	TGGGGC	CACTCTT	CGGAATA	AOCTCAAT
A. clamator									
G. brasilianum									
M. choliba									
	410	420	430	440	450	460	470	480	490
A. cunicularia	TTGTGATC	ACTAAGCC	CTCGATCC	ATACAGT	GGACTTCA	AAAGAA	CGCACC	ATGCAGAT	CATTGCCA
Tyto alba	TTGTGATC	ACTAAGCC	CTCGATCC	ATACAGT	GGACTTCA	AAAGAA	CGCACC	ATGCAGAT	CATTGCCA
A. clamator									
G. brasilianum									
M. choliba									
	510	520	530	540	550	560	570	580	590
A. cunicularia	GGCTCCAC	TCTTGGG	TGGAGT	TCTATG	TGCTGAG	GGCTTGA	TATCCTG	TACCTGGG	ACTATGTA
Tyto alba	GGCTCCAC	TCTTGGG	TGGAGT	TCTATG	TGCTGAG	GGCTTGA	TATCCTG	TACCTGGG	ACTATGTA
A. clamator									
G. brasilianum									
M. choliba									
	610	620	630	640	650	660	670	680	690
A. cunicularia	ATGATTTT	ATGTTG	CTGCGT	TTTTTT	ATTCCACT	GATAATA	ATTTCATT	GCTATTT	ATTATGTT
Tyto alba	ATGATTTT	ATGTTG	CTGCGT	TTTTTT	ATTCCACT	GATAATA	ATTTCATT	GCTATTT	ATTATGTT
A. clamator									
G. brasilianum									
M. choliba									
	710	720	730	740	750	760	770	780	790
A. cunicularia	AAAAGCT	GGGGTCT	GCAGCCG	GAATCT	CTCTCAG	TCCATGA	AGATGA	TGGAAC	TGGCAAAA
Tyto alba	AAAAGCT	GGGGTCT	GCAGCCG	GAATCT	CTCTCAG	TCCATGA	AGATGA	TGGAAC	TGGCAAAA
A. clamator									
G. brasilianum									
M. choliba									
	810	820	830	840	850	860	870	880	890
A. cunicularia	CTTGCTCT	GGTCACCA	TATGCTT	GTGTCA	CTTTGATT	GGCTGGG	CAGGTC	GAGGCA	ACACCT
Tyto alba	CTTGCTCT	GGTCACCA	TATGCTT	GTGTCA	CTTTGATT	GGCTGGG	CAGGTC	GAGGCA	ACACCT
A. clamator									
G. brasilianum									
M. choliba									

Opn4m

	610	620	630	640	650	660	670	680	690
A. cunicularia	CCCTTCCTTTGGATGGAGTGC	GTATGTTCCCGAGGGTCTG	ATGACTTCTGTTCCCTGGG	ACTACATGACTTTTCACAC	CGTCAGTCCGTCCTACAC	GA			
Tyto alba	CCCTTCCTTTGGATGGAGTGC	GTATGTTCCCGAGGGTCTG	ATGACTTCTGTTCCCTGGG	ACTACATGACTTTTCACAC	CGTCAGTCCGTCCTACAC	GA			
A. clamator	-----	-----	-----	ACTTCTGTTCCCTGGG	ACTACATGACTTTTCACAC	CGTCAGTCCGTCCTACAC	GA		
G. brasiliianum	-----	-----	-----	AGGGTCTGATGACTTCTG	TCTGTTCCCTGGGACTAC	ATGACTTTTCACACCAT	CAGTCCGTCCTACAC	GA	
M. choliba	-----	-----	-----	AGGGTCTGATGACTTCTG	TCTGTTCCCTGGGACTAC	ATGACTTTTCACACCAT	CAGTCCGTCCTACAC	GA	
	710	720	730	740	750	760	770	780	790
A. cunicularia	TGATTTTCTGTTTCGTCTTT	TCATTCCTTTGATTGCTAT	CATATACAGCTACGCTTT	TATATTTGAGGCTATCA	AGAAGGCCAACAGTCT	ATTCA			
Tyto alba	ATTGGATGCAGACGTGGAA	TAAAGAGTCCAGAAACAG	TATCGGAGGATGAAAAAT	GAGTGGAGATGGCCAAA	ATTGCACTGATTGTCA	TCTTG			
A. clamator	TGCTTTTCTGTTTCGTCTTT	TCATTCCTTTGATTGCTAT	CATATACAGCTATGCTTT	TATATTTGAGGCTATCA	AGAAGGCCAACAGTCT	ATTCA			
G. brasiliianum	TGCTTTTCTGTTTCGTCTTT	TCATTCCTTTGATTGCTAT	CATATACAGCTATGCTTT	TATATTTGAGGCTATCA	AGAAGGCCAACAGTCT	ATTCA			
M. choliba	TGCTTTTCTGTTTCGTCTTT	TCATTCCTTTGATTGCTAT	CATATACAGCTATGCTTT	TATATTTGAGGCTATCA	AGAAGGCCAACAGTCT	ATTCA			
	810	820	830	840	850	860	870	880	890
A. cunicularia	ATTGGATGTAAACATGGA	ATAAGGAGTCCAGAAACAG	TATCAGAGGATGAAAAAT	GAGTGGAGATGGCCAAA	ATTGCACTGATTGTCA	TCTTG			
Tyto alba	ATTGGATGTAAACATGGA	ATAAGGAGTCCAGAAACAG	TATCAGAGGATGAAAAAT	GAGTGGAGATGGCCAAA	ATTGCACTGATTGTCA	TCTTG			
A. clamator	ATTGGATGTAAACATGGA	ATAAGGAGTCCAGAAACAG	TATCAGAGGATGAAAAAT	GAGTGGAGATGGCCAAA	ATTGCACTGATTGTCA	TCTTG			
G. brasiliianum	ATTGGATGTAAACATGGA	ATAAGGAGTCCAGAAACAG	TATCAGAGGATGAAAAAT	GAGTGGAGATGGCCAAA	ATTGCACTGATTGTCA	TCTTG			
M. choliba	ATTGGATGTAAACATGGA	ATAAGGAGTCCAGAAACAG	TATCAGAGGATGAAAAAT	GAGTGGAGATGGCCAAA	ATTGCACTGATTGTCA	TCTTG			
	910	920	930	940	950	960	970	980	990
A. cunicularia	TATGTCATTTCTGGTCAC	CATACTCTGTTGTTGCT	CTGGTGGCTTTTGTCTGG	GTAITCCCACGTCCTAAC	CCCCITCATGAACCTCA	TACCAGCTG			
Tyto alba	TATGTCATTTCTGGTCAC	CATACTCTGTTGTTGCT	CTGGTGGCTTTTGTCTGG	GTAITCCCACGTCCTAAC	CCCCITCATGAACCTCA	TACCAGCTG			
A. clamator	TATGTCATTTCTGGTCAC	CATACTCTGTTGTTGCT	CTGGTGGCTTTTGTCTGG	GTAITCCCACGTCCTAAC	CCCCITCATGAACCTCA	TACCAGCTG			
G. brasiliianum	TATGTCATTTCTGGTCAC	CATACTCTGTTGTTGCT	CTGGTGGCTTTTGTCTGG	GTAITCCCACGTCCTAAC	CCCCITCATGAACCTCA	TACCAGCTG			
M. choliba	TATGTCATTTCTGGTCAC	CATACTCTGTTGTTGCT	CTGGTGGCTTTTGTCTGG	GTAITCCCACGTCCTAAC	CCCCITCATGAACCTCA	TACCAGCTG			
	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190
A. cunicularia	GCTGAGAGTTTCTCCTAG	AGACTCCCGGTCTTTT	CAGCAGCTACCCCTC	CTCCAGACGAGTGACT	AATAAGCAGCCAGTCT	CTCTGATG	-----		
Tyto alba	GCTGAGAGTTTCTCCTAG	AGACTCCCGGTCTTTT	CAGCAGCTACCCCTC	CTCCAGACGAGTGACT	AATAAGCAGCCAGTCT	CTCTGATG	-----		
A. clamator	GCTGAGAGTTTCTCCTAG	AGACTCCCGGTCTTTT	CAGCAGCTACCCCTC	CTCCAGACGAGTGACT	AATAAGCAGCCAGTCT	CTCTGATG	-----		
G. brasiliianum	GCTGAGAGTTTCTCCTAG	AGACTCCCGGTCTTTT	CAGCAGCTACCCCTC	CTCCAGACGAGTGACT	AATAAGCAGCCAGTCT	CTCTGATG	-----		
M. choliba	GCTGAGAGTTTCTCCTAG	AGACTCCCGGTCTTTT	CAGCAGCTACCCCTC	CTCCAGACGAGTGACT	AATAAGCAGCCAGTCT	CTCTGATG	-----		
	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290
A. cunicularia	-----	-----	-----	GCTGTA	CTGACACAGAACTGATA	CCCCCAGCATGTTCT	CCAGACTTGTAGCAG	CAGATTCTCT	
Tyto alba	GAAGGAAAAAGGCAACT	CCTCTCTCTGACAGGT	GGTACTGACACAGAACT	GATAACCCAGCATG	TTCTCCAGACTTGTAG	CAGACAGATTCTCT			
A. clamator	-----	-----	-----	GCTGTA	CTGACACAGAACTGATA	CCCCCAGCATGTTCT	CCAGACTTGTAGCAG	CAGATTCTCT	
G. brasiliianum	-----	-----	-----	GCTGTA	CTGACACAGAACTGATA	CCCCCAGCATGTTCT	CCAGACTTGTAGCAG	CAGATTCTCT	
M. choliba	-----	-----	-----	GCTGTA	CTGACACAGAACTGATA	CCCCCAGCATGTTCT	CCAGACTTGTAGCAG	CAGATTCTCT	
	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390
A. cunicularia	AAACGGGTAAAGACACA	CACTCAAACTAGTGAC	ATAAGAGCCCAACATA	AGCTGAGGAGTCGTG	ACTCTGGGAATTGTG	AGAAGACAGCTGTAG	ATGC		
Tyto alba	AAATGGGTAAAGACACA	CACTCAAACTAGTGAC	ATAAGAGCCCAACATA	AGCTGAGGAGTCGTG	ACTCTGGGAATTGTG	AGAAGACAGCTGTAG	ATGC		
A. clamator	AAACGGGTAAAGACACA	CACTCAAACTAGTGAC	ATAAGAGCCCAACATA	AGCTGAGGAGTCGTG	ACTCTGGGAATTGTG	AGAAGACAGCTGTAG	ATGC		
G. brasiliianum	AAACGGGTAAAGACACA	CACTCAAACTAGTGAC	ATAAGAGCCCAACATA	AGCTGAGGAGTCGTG	ACTCTGGGAATTGTG	AGAAGACAGCTGTAG	ATGC		
M. choliba	AAACGGGTAAAGACACA	CACTCAAACTAGTGAC	ATAAGAGCCCAACATA	AGCTGAGGAGTCGTG	ACTCTGGGAATTGTG	AGAAGACAGCTGTAG	ATGC		
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490
A. cunicularia	TGACATATCCATGATGGA	ATTGAATGTCACAGAG	TACACTGCTACACTTACT	-----	-----	-----	-----	AGAGGT	
Tyto alba	TGACATATCCATGATGGA	ATTGAATGTCACAGAG	TACACTGCTACACTTACT	CAGCAAGCATCTAAAA	AATGCAACTTGGAGG	AAATCAAGATAAGT			
A. clamator	TGACATATCCATGATGGA	ATTGAATGTCACAGAG	TACACTGCTACACTTACT	-----	-----	-----	-----	AGAGAI	
G. brasiliianum	TGACATATCCATGATGGA	ATTGAATGTCACAGAG	TACACTGCTACACTTACT	-----	-----	-----	-----	AGAGGT	
M. choliba	TGACATATCCATGATGGA	ATTGAATGTCACAGAG	TACACTGCTACACTTACT	-----	-----	-----	-----	AGAGGT	
	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590
A. cunicularia	AGCCTGAATGATATTGG	ACAAAGAAAGGAGAGT	CTCACCACAGACTTT	CTGCAGCCAGATACCC	AGCATTACAGTAAC	ATACAGCAGTGTTC	CAAG		
Tyto alba	AGCCTGAACGATATTGG	ACAAAGAAAGGAAAGT	CTCACCACAGACCCT	GCAGCCAGATACCC	AGCATTACAAACAT	ACAGCACTGTCC	CAAG		
A. clamator	AGCCTGAATGATATTGG	ACAAAGAAAGGAGAGT	CTCACCACAGACTTT	CTGCAGCCAGATACCC	AGCATTACAGTAAC	ATACAGCAGTGTTC	CAAG		
G. brasiliianum	AGCCTGAATGATATTGG	ACAAAGAAAGGAGAGT	CTCACCACAGACTTT	CTGCAGCCAGATACCC	AGCATTACAGTAAC	ATACAGCAGTGTTC	CAAG		
M. choliba	AGCCTGAATGATATTGG	ACAAAGAAAGGAGAGT	CTCACCACAGACTTT	CTGCAGCCAGATACCC	AGCATTACAGTAAC	ATACAGCAGTGTTC	CAAG		
	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	
A. cunicularia	CAGAGCAGCCTTGTGG	ATACAGCTCTGGTTTT	CTGACCCCTAAGAT	CAACAGCCGCAAG	CAGAACAGAAAT	CTAATAGCTAA			
Tyto alba	TACAGCAGCCTTGTGG	ATACAGCTCTGGTTTT	CTGACCCCTAAGAT	CAACAGCCGCAAG	CAGAACAGAAAT	CTAATAGCTAA			
A. clamator	CAGAGCAGCCTTGTGG	ATACAGCTCTGGTTTT	CTGACCCCTAAGAT	CAACAGCCG	-----	-----			
G. brasiliianum	CAGAGCAGCCTTGTGG	ATACAGCTCTGGTTTT	CTGACCCCTAAGAT	CAACAGCCG	-----	-----			
M. choliba	TAGAGCAGCCTTGTGG	ATACAGCTCTGGTTTT	CTGACCCCTAAGAT	CAAC	-----	-----			

APÊNDICE 3.

Curva Padrão Relativa

A eficiência de cada *primer* foi realizada a partir da diluição seriada (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16) das amostras de cDNA das corujas coletadas no estudo, a fim de validar a concentração de 300nM dos *primers* dos genes alvos, *Opn4x* e *Opn4m*, e a concentração de 50nM do gene de referência, RNA 18S. A reação foi realizada com um *pool* composto de 5 amostras de cDNA de cada espécie, analisadas individualmente, escolhidas de forma aleatória, provenientes de 1 µg de RNA total, amplificados em duplicata.

Realizada a reação de PCR em tempo real, para validar o método Ct comparativo de quantificação relativa foi realizado cálculos e uma expressão para determinar a eficiência de cada primer, que podem ser vistos no esquema abaixo. A *slope* da curva de amplificação relativa (valor a) e o R² foram utilizados nos passos iniciais de padronização dos experimentos para estimar a eficiência da reação. Diante disso, foram gerados os gráficos de regressão linear.

$$E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$$

Gene	Amostra	CT	Média CT	DP				
18S	AC 1:1	11,120	11,201	0,081		Concentração	[Log]	CT
18S	AC 1:1	11,282				1,000	0,000	11,201
18S	AC 1:2	12,010	11,840	0,171		0,500	-0,301	11,840
18S	AC 1:2	11,669				0,250	-0,602	12,828
18S	AC 1:4	12,953	12,828	0,126		0,125	-0,903	13,790
18S	AC 1:4	12,702				0,063	-1,204	14,586
18S	AC 1:8	13,826	13,790	0,036				
18S	AC 1:8	13,755				Valor a	-2,897	
18S	AC 1:16	14,578	14,586	0,008		eficiência	121,404	
18S	AC 1:16	14,595