UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE PSICOLOGIA

Felipe Tadeu Galante Rocha de Vasconcelos

Estudo morfológico da retina e genético do pigmento visual LWS de cinco espécies de corujas e sua relação com o ritmo circadiano

São Paulo

2017

Estudo morfológico da retina e genético do pigmento visual LWS de cinco espécies de corujas e sua relação com o ritmo circadiano

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

Área de concentração: Neurociências e Comportamento

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Maria Oliveira Bonci

São Paulo

2017

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

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

Galante Rocha de Vasconcelos, Felipe Tadeu

Estudo morfológico da retina e genético do pigmento visual LWS de cinco espécies de corujas e sua relação com o ritmo circadiano / Felipe Tadeu Galante Rocha de Vasconcelos; orientadora Daniela Maria Oliveira Bonci. -- São Paulo, 2017.

55 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento) -- Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2017.

1. Corujas . 2. Genética. 3. Pigmentos visuais em animal. 4. Morfologia. 5. Visão. I. Oliveira Bonci, Daniela Maria, orient. II. Título.

Nome: Vasconcelos, Felipe Tadeu Galante Rocha de

Título: Estudo morfológico e genético do cone L e do pigmento visual LWS de diferentes espécies de corujas e sua relação com o ritmo circadiano

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Jerome Baron

Instituição: Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais

Assinatura:

Prof^a. Titular Dânia Emi Hamassaki

Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo

Assinatura:

Prof^a. Titular Dora Fix Ventura

Instituição: Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo

Assinatura:

Prof^a. Dra. Daniela Maria Oliveira Bonci

Instituição: Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo

Assinatura: Daniela MOBanci

Dedico este trabalho à minha família, meus amigos e minha namorada por me dar todo o suporte, amor e carinho que me ajudaram a chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Daniela Maria Oliveira Bonci por todo ensinamento e apoio, fundamentais para meu desenvolvimento científico.

À Dr^a Einat Hauzman, supervisora, colega e amiga com quem também aprendi muito nesses quatro anos de trajetória no laboratório. Também agradeço aos meus colegas e amigos do Laboratório da Visão, por todo apoio.

À aluna de iniciação cientifica Julia Silvestre pelo auxilio com os experimentos de morfologia.

Às agências de fomento, que permitiram o desenvolvimento do trabalho, sobretudo o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

"A coruja de Minerva alça seu voo somente com o início do crepúsculo" (Hegel, 1820)

RESUMO

Felipe, T. G. R. V. (2017). Estudo morfológico da retina e genético do pigmento visual LWS de cinco espécies de corujas e sua relação com o ritmo circadiano (Dissertação de Mestrado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As corujas formam um grupo diversificado, estando presentes em diversos habitats ao redor do globo e têm diferentes padrões de atividade, com espécies diurnas, noturnas e crepusculares. Os fotorreceptores encontrados em corujas são os bastonetes e três classes de cones, levando potencialmente à tricromacia, e as demais camadas da retina mantém a mesma organização de outras aves. O gene LWS tem sido estudado em aves e o pico de absorção espectral da opsina expressa por esse gene está entre 560-570nm. Exceções foram reportadas no melro-preto (P557), pinguim Humboldt (P543) e na corujado-mato (Strix aluco). Entre esses três gêneros, somente as corujas apresentam espécies com diferentes hábitos circadianos. Dessa forma é possível que diferentes adaptações visuais possam ser encontradas em associação com o padrão circadiano. Neste trabalho foi investigada a morfologia da retina e a genética do pigmento visual LWS de cinco espécies de corujas com diferentes ritmos circadianos: Asio clamator, Megascops choliba, Tyto alba (noturnas), Athene cunicularia e Glaucudium brasilianum (diurnas). Um indivíduo de cada espécie foi utilizado nos experimentos. Foi realizada a extração de RNA a partir de uma retina homogeneizada de cada espécie e o RNA mensageiro (mRNA) foi convertido em DNA complementar (cDNA). Partes do gene LWS foram amplificadas utilizado a reação em cadeia da polimerase (PCR) e seguenciadas utilizando a metodologia de Sanger. Cinco sítios importantes para o ajuste espectral da opsina LWS (164,181, 261, 269 e 292) foram analisados e comparados com a sequência de outras aves e da rodopsina bovina, a qual foi referência para determinar as posições dos aminoácidos. No estudo morfológico, foram realizados cortes transversais em criostato de uma retina de cada espécie de coruja. Para a reação de imunohistoquímica foi utilizado o anticorpo Rabbit anti opsin (AB5405) para marcar cones L/M e DAPI marcando núcleos celulares.

Também foi realizada a coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) para visualizar a organização da retina. A partir das análises morfológicas foi possível observar a presença de cones nas retinas das cinco espécies de corujas, bem como uma organização laminar semelhante a de outros vertebrados. Para todas as espécies estudadas, os resultados da análise de sequência da opsina LWS foram: A164, H181, Y261, T269 e A292. Ao menos para o gene *LWS*, não foram encontradas diferenças entre espécies diurnas e noturnas de corujas.

Palavras-chave: Corujas. Pigmento visual. Genética de opsinas.

ABSTRACT

Felipe, T. G. R. V. (2017). Estudo morfológico da retina e genético do pigmento visual LWS de cinco espécies de corujas e sua relação com o ritmo circadiano (Dissertação de Mestrado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The owls forms a diverse group present in many habitats around the world and they have different activity patterns, with diurnal, nocturnal and crepuscular species. Photoreceptors found in owls are the rods and three classes of cones that potentially provide trichromacy, and the other retinal layers maintain the same organization of other birds. The LWS gene has been studied in birds and the peak spectral absorption of opsin expressed by this gene is between 560-570nm. Exceptions were reported on blackbird (P557), Humboldt penguin (P543) and tawny owl (*Strix aluco*). Among these three genera, only owls have species with different circadian habits. It is therefore possible that different visual adaptations can be found in association with the circadian pattern. In this study the retinal morphology and the genetics of LWS visual pigment of five owl species with different circadinan habits were investigated: Asio clamator, Megascops choliba, Tyto alba (nocturnal), Athene cunicularia e Glaucudium brasilianum (diurnal). One individual of each species was used in the experiments. RNA extraction was performed from a homogenized retina of each species and messenger RNA (mRNA) was converted into complementary DNA (cDNA). Parts of the LWS gene were amplified using the polymerase chain reaction (PCR) and sequenced using the methodology of Sanger. Five important sites for the spectral tuning of the LWS opsin (164, 181, 261, 269 and 292) were analyzed and compared to the sequence of other birds and bovine rhodopsin, which was referenced to determine amino acid positions. In the morphological study, cross - sections were performed in cryostat of a retina of each owl species. For the immunohistochemistry reaction, the rabbit anti-opsin antibody (AB5405) was used to label L / M cones and DAPI labeling cell nuclei. Hematoxylin-Eosin (HE) staining was also performed to visualize the organization of the retina. From the morphological analyzes it was possible to observe the presence of cones in the

retinas of the five species of owls, as well as a laminar organization similar to that of other vertebrates. For all species studied, the results of LWS opsin sequence analysis were: A164, H181, Y261, T269 and A292. At least for the LWS gene, no differences were found between diurnal and nocturnal species of owls.

Keywords: Owls. Visual pigment. Opsin genetics.

SUMÁRIO

1 INTRO	DUÇÃO					
1.1 Coru	jas					
1.2 Visão	o das Corujas	15				
1.3 F	otorreceptores					
1.4 0	Opsinas	27				
2 Justific	ativa					
3 Objetiv	VOS					
4 Anima	is e Métodos					
4.1 A	Análise genética					
4.1.1	Extração de RNA e transcrição reversa					
4.1.2	Reação em Cadeia da Polimerase					
4.1.3	Primers					
4.1.4	Sequenciamento do DNA					
4.2 A	Análise morfológica					
4.2.1	Coleta e emblocagem do material					
4.2.2	Imunohistoquímica					
4.2.3	Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE)					
5 Result	S Resultados					
5.1 Gene	.1 Gene LWS					
5.2 Imur	.2 Imunohistoquímica					
6 Discus	Discussão					
7 Conclu	' Conclusões					
REFERÊN	EFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS					
ANEXO -	ANEXO – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais					

1 INTRODUÇÃO

A visão de cores se faz presente na grande maioria dos vertebrados, apresentando características únicas para cada grupo devido às diferentes pressões evolutivas que guiaram o desenvolvimento morfofisiológico dos animais ao longo de sua história evolutiva. Os animais capazes de discriminar diferentes cores o fazem para identificar alimentos, encontrar um parceiro para acasalamento, dentre outras funções (Yokoyama, 2002a).

1.1 Corujas

As corujas são aves pertencentes a ordem Strigiformes a qual divide-se em duas famílias: Tytonidae e Strigidae (Wink, Sauer-gürth, & Gonzalez, 2009). De acordo com o *Global Owl Project* (http://www.globalowlproject.com), existem cerca de 225 espécies distribuídas em todos os continentes, exceto Antártida.

O filo das aves sofre constantes mudanças à medida que novos estudos moleculares são realizados (Wink & Heidrich, 2000; Wink *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2016). Com isso, a relação da ordem Strigiformes com outros grupos de aves também tem sido revista. Atualmente esse grupo está inserido na filogenia como grupo irmão da ordem Coraciimorphae - representada pelos guarda-rios, uduse abelharucos – ordem Accipitriformes, da qual fazem parte os gaviões, as águias, abutres do velho mundo, próximas a esses dois grupos (Remsen *et al.*, versão 04/2017).

As espécies de corujas que serão estudadas neste trabalho pertencem a quatro gêneros diferentes da família Strigidae - *Asio clamator* (Figura 1A), *Athene cunicularia* (Figura 1B), *Glaucidium brasilianum* (Figura 1C), *Megascops choliba*

(Figura 1D) - e uma espécie da família Tytonidae - *Tyto alba* (Figura 1E). Dados sobre a ecologia desses animais estão reunidos na Tabela 1. Essas espécies estão classificadas em diferentes grupos dentro dos Strigiformes conforme apresentado na Figura 2.



Figura 1. Imagens ilustrativas de cada uma das espécies de corujas incluídas neste estudo, são elas: (A) *Asio clamator*, (B) *Athene cunicularia*, (C) *Glaucidium brasilianum*, (D) *Megascops choliba* e (E) *Tyto alba*. Fontes: A (http://www.avesenuruguay.com/aves), B, C e D (http://avesderapinabrasil.com), E (http://naturemappingfoundation.org/natmap/maps/wa/birds).

Tabela '	1.	Informaçõe	es sobre	а	ecologia	das	diferentes	espécies	de	corujas
estudadas neste trabalho.										

Espécie	Nome popular	Habitat	Período de atividade	Alimentação	Referências
Asio clamator	Coruja- orelhuda	Campos, Cerrado	Noturno	Roedores, aves	Motta- Junior, Alho, & Belentani, 2004; König, 2008
Megascops choliba	Corujinha- do-mato	Cerrado	Noturno	ins., roe., anf., ser.	Barros, Motta-junior, & Unior, 2014; König, 2008
Tyto alba	Suindara	Cerrado	Noturno	Roedores	Edut & Eilam, 2003; König & Weick, 2008
Athene cunicularia	Coruja buraqueira	Campos	Catemeral	Art., anf., rep., aves, pq. mam.	König & Weick, 2008; Martins & Egler, 1990
Glaucudium brasilianum	Caburé	Florestas, Savanas	Diurno/crepuscular	Lag., ins., aves, mam.	Flesch <i>et al.</i> , 2015; König, 2008

Art. (artrópodes); rep. (répteis); ins. (inseto); roe. (roedor); anf. (anfíbios); ser. (serpentes); lag. (lagartos); mam. (mamíferos).



Figura 2. Cladograma mostrando a filogenia das corujas. As espécies destacadas em vermelho estão sendo estudadas no presente trabalho. Modificado de Wink, Sauer-gürth, & Gonzalez (2009).



Continuação da Figura 2, apresentando a filogenia das outras famílias de corujas. Modificado de Wink, Sauer-gürth, & Gonzalez (2009).

O olho da coruja, assim como de outros vertebrados, é constituído por três túnicas: fibrosa, vascular e nervosa (Jones, Pierce, & Ward, 2007). As principais estruturas constituintes dessas túnicas e do restante do globo ocular são evidenciadas na Figura 3. As funções dessas estruturas são apresentadas a seguir.



Figura 3. Ilustração esquemática de um olho de ave. Nela são evidenciadas três camadas que constituem a região posterior, que são esclera, coroide e retina, além de outras estruturas importantes para o funcionamento desse órgão. Modificado de Creutzburg et al., 2016.

A túnica fibrosa é a mais externa do globo ocular e é responsável por dar forma ao olho e suporte ao conteúdo intraocular. Para isso conta com uma esclera cartilaginosa em sua porção posterior e, na porção anterior, a córnea, uma lente transparente que permite a passagem de luz e a refrata (Gelatt, 2014; Jones *et al.*, 2007).

A túnica vascular é formada por coroide, corpo ciliar e íris. Essa túnica é responsável pelo controle da entrada de luz no olho, sustentação do cristalino –

juntamente com o humor aquoso – e sua acomodação, além de nutrição e oxigenação da retina.

A túnica nervosa é a camada localizada mais central e internamente no globo ocular. Esta camada contém as células responsáveis pela absorção da luz e transdução do sinal luminoso em sinal neural, que é levado pelo nervo óptico. A luz que incide na retina atravessa dez camadas retinianas até atingir a camada dos fotorreceptores (Figura 4). Ainda na retina, há a fóvea, uma região de depressão na topografia tecidual, na qual observa-se uma maior densidade de fotorreceptores (Gelatt, 2014; Jones *et al.*, 2007).

Na cavidade interna do olho encontra-se o humor vítreo, substância gelatinosa que ajuda a manter a posição da retina e permite a passagem da luz. Outra estrutura importante na cavidade interna é o pécten, estrutura típica de aves, que tem como funções a nutrição da retina e a manutenção da temperatura ocular (Jones *et al.*, 2007).



Figura 4. Corte histológico com coloração Hematoxilina-Eosina (HE) da retina da espécie de coruja *Athene cunicularia*. As dez camadas da retina estão identificadas apresentadas: EP epitélio pigmentado; CF, camada de fotorreceptores; MLE, membrana limitante externa; CNE, camada nuclear externa; CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada de células ganglionares; CFN, camada de fibras nervosas; MLI, membrana limitante interna. Fonte: modificado de Pinto et al., 2016.

Como pode ser visto na Figura 4, a retina se organiza em camadas de morfologias distintas. Abaixo é apresentada uma breve descrição de cada uma dessas camadas:

- Epitélio pigmentado (EP): formado por células epiteliais com grânulos de pigmento;
- Camada dos Segmentos Externos dos Fotorreceptores (CF): formada por células fotorreceptoras, cones e/ou bastonetes;
- Membrana Limitante Externa (MLE): formada pelos prolongamentos das células de Müller;
- Camada Nuclear Externa (CNE): contém os núcleos dos fotorreceptores;
- Camada Plexiforme Externa (CPE): na qual os fotorreceptores entram em contato por sinapses com células bipolares e horizontais;
- Camada Nuclear Interna (CNI): fazem parte desta camada os corpos celulares de células horizontais, bipolares, amácrinas e de Müller;
- Camada Plexiforme Interna (CPI): na qual células bipolares e amácrinas entram em contato por sinapses com as células ganglionares;
- Camada de Células Ganglionares (CCG): formada pelos corpos celulares de células ganglionares e de células amácrinas deslocadas;
- Camada de Fibras Nervosas (CFN): contém axônios das células ganglionares;
- Membrana Limitante Interna (MLI): formada por prolongamentos das células de Müller.

A visão das corujas é estudada há muitas décadas em seus diferentes aspectos. Elas compartilham certas características visuais com as outras aves, como a surpreendente proporção do globo ocular, cujo volume pode ultrapassar os 50% do total do crânio contra apenas 5% desse volume em humanos (Jones, Pierce & Ward, 2007). O olho das corujas tem uma forma tubular (Figura 5) que pode ser importante para redução do peso (Davies & Green, 2012). Em outras aves pode ser mais achatado (Figura 3) ou globoso.



Figura 5. Olho direito de uma coruja *Strix aluco*, com sua forma tubular. Vista dorsal. Adaptado de Martin, 1982.

Em um trabalho sobre óptica esquemática e desempenho visual em *Strix aluco*, Martin (1982) trouxe dados da medição do olho, como o comprimento axial do globo ocular (28,50 mm) e o diâmetro da cuia óptica (30,10 mm). Esse comprimento axial, quando comparado ao de animais com pesos similares (aproximadamente 500 g) - como o pombo e o rato (11,6 mm e 6,3 mm, respectivamente) - evidencia um olho grande. O olho tubular da *S. aluco* é muito grande em relação ao seu crânio. Além disso, é marcante uma protuberância do globo ocular externamente à sua cavidade no crânio, visto que esta não é suficientemente grande para acomodá-lo.

Os achados do trabalho de Martin (1982) estão de acordo com a descrição de Walls (1942) sobre o olho de vertebrados noturnos, que diz que o globo ocular desses animais é relativamente grande em relação ao tamanho corporal. Ele descreve ainda que há um amplo segmento anterior, dando espaço a um cristalino esférico grande, posicionado mais atrás da córnea - que apresenta curvatura mais acentuada -, enquanto a pupila tem considerável abertura. Esses

animais apresentam ainda o centro óptico mais ao fundo do olho, resultando em uma imagem retiniana menor e mais brilhante. Uma situação semelhante à da *S. aluco* foi reportada em outra coruja, *Bubo virginianus* (Wood, 1917 in Martin, 1982).

Seguindo para a porção mais interna do olho podemos encontrar mais uma estrutura que é exclusiva das aves, o pécten (Figura 3). que é encontrado na forma dobrada em raptores, como por exemplo corujas e gaviões, e na maioria das aves (Jones *et al.*, 2007). O pécten tem como funções a manutenção da temperatura intraocular, e nutrição e gradiente de oxigênio na retina (Jones *et al.*, 2007). A retina é o tecido fotossensível que se apresenta em diversas camadas, sendo a camada de fotorreceptores aquela que recebe a informação luminosa e dá início ao processo de transdução do estimulo luminoso em sinal eletroquímico. Nesse tecido pode estar presente a fóvea, região em que a acuidade visual é aumentada devido a características dessa área: a separação das camadas retinianas, resultando em uma depressão do tecido; e a alta densidade de fotorreceptores e células ganglionares (Fite & Rosenfield-Wessels, 1975; Jones *et al.*, 2007).

A fóvea está presente na grande maioria das aves e que algumas apresentam duas fóveas, uma central e outra temporal, como por exemplo em águias e falcões (Jones *et al.*, 2007). No estudo do Fite (1973) e Fite e Rosenfield-Wessels (1975), foi avaliado o número de células ganglionares, cones e bastonetes em cortes transversais. Os autores concluíram que, as corujas possuem uma fóvea temporal, a qual apresenta como característica única a presença majoritária de bastonetes (Figura 6), ao invés de cones como em outras espécies, em virtude da adaptação ao estilo de vida noturno. Uma melhor descrição dos fotorreceptores de aves, principalmente das corujas, será abordada na próxima seção



Figura 6. Análise comparativa das densidades celulares (bastonetes, cones e células ganglionares) na fóvea de *B. virginianus* em intervalos de 100 µm. Modificado de Fite, 1973.

No estudo realizado por Lisney *et al.*. (2012) a topografia de células ganglionares foi estudada com a técnica de Nissl e foi observado que somente a fóvea temporal está presente na retina das corujas *Aegolius acadicus, Asio flammeus, Athene cunicularia, Bubo scandiacus, B. virginianus, Strix varia, Sturnia ulula.* No entanto, nenhuma fóvea foi encontrada nas espécies *Strix nebulosa* e *Tyto alba* (Jones *et al.,* 2007; Lisney *et al.,* 2012). Os autores sugerem que há uma relação entre o tamanho do animal e a sua acomodação visual, sendo que animais menores apresentam maior amplitude de acomodação.

Outras características visuais das corujas também já foram estudadas, principalmente na década de 70, tendo como modelo experimental a *Strix aluco*. Nesses trabalhos foram abordados, sensibilidade espectral determinada por eletrorretinografia (Martin, Gordon, & Cadle, 1975), sensibilidade escotópica e limiar absoluto (Martin, 1977), desempenho visual (Martin, 1982), avaliação do campo visual (Martin, 1984), visão de cores (Martin, 1974; Bowmaker & Martin, 1978) e acuidade visual (Martin & Gordon, 1974). Entre os principais achados desses trabalhos estão que a *S. aluco*, uma ave estritamente noturna, apresenta acuidade visual equiparada ao pombo, uma ave diurna, maior que a acuidade aferida em *B. virginianus*, também noturna (K V Fite, 1973); a sensibilidade escotópica dessa espécie é maior do que aquela observada em

aves diurnas fato este suficiente para lhe dar vantagem sobre as aves diurnas em ambientes de baixa luminosidade; foram identificados três tipos de cones em sua retina que são funcionais e a sensibilidade espectral efetiva de seus três pigmentos visuais com as gotículas de óleo foi avaliada, tendo encontrado os valores 468nm, 530nm e 556nm.

Atualmente, a espécie Tyto alba, conhecida como coruja das torres, é objeto de estudo de várias pesquisas com visão em seus aspectos fisiológicos e comportamentais е teve seu genoma parcialmente sequenciado (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA212909). Alguns trabalhos investigaram a acuidade de vernier (Harmening, Göbbels, & Wagner, 2007), o Wulst visual (Pinto & Baron, 2010), o grau de interação binocular e seletividade para disparidade binocular (Nieder & Wagner, 2000, Wagner & Frost, 1993 e Pettigrew, 1979) e o campo visual binocular, o qual é aumentado comparado com outras aves (Martin, 1984). A acuidade visual da Tyto alba tem sido estudada (Orlowski, Harmening, & Wagner, 2012) e relacionada à densidade de células ganglionares por meio de análises morfológicas (Wathey & Pettigrew, 1989) e eletrofisiológicas (Ghim & Hodos, 2006).

Outra espécie já comentada anteriormente que teve suas funções visuais avaliadas foi a *B. virginianus*. Fite (1973) avaliou a acuidade visual correlacionada com anatomia e comportamento. Estão presentes em seu relato uma fóvea bem definida, com cones e bastonetes em densidade menor do que a esperada para uma fóvea, e a hipótese de que os cones presentes na fóvea podem contribuir para a resolução espacial em alta luminosidade. Mais tarde, utilizando do método da eletrorretinografia (ERG), Jacobs (1987) identificou nesta mesma espécie um tipo de cone com um pigmento cuja absorção espectral máxima foi estimada em 555nm – a mesma encontrada em um tipo de cones da *S. aluco* (Bowmaker & Martin, 1978).

Em outro trabalho envolvendo ERG em uma coruja, *Athene noctua*, Porciatti, Fontanesi & Bagnoli (1989) mostraram em seus resultados que o ERG de frequência de fusão de flicker da *A. noctua* é similar de animais noturnos, assim como o ERG de padrão (PERG) indicou a contribuição de cones e bastonetes. Os autores relacionaram esses dados como sendo próximos ao de outros animais noturnos e mais distante dos diurnos

Todos os trabalhos mencionados acima estão explorando diferentes aspectos da visão, alguns utilizando o globo ocular inteiro para estabelecer relações funcionais com a visão, enquanto outros investiram na investigação de algumas células ou grupos de células. Neste trabalho foram investigados os cones, células fotorreceptoras e seus pigmentos visuais, descritos a seguir.

1.3 Fotorreceptores

As aves, assim como outros vertebrados possuem em sua retina dois tipos de fotorreceptores, segundo a literatura clássica, cones e bastonetes (Figura 7), sendo cada um deles responsável por operar em diferentes faixas luminosas. A atividade dos cones ocorre na presença de grande quantidade de luz, denominando-se sistema fotópico, ao passo que a atividade dos bastonetes ocorre sob baixa luminosidade e esse sistema é denominado escotópico. Em níveis intermediários de luminosidade, cones e bastonetes estão em funcionamento, compondo o sistema mesópico (Chien, Teller & Palmer, 2000).



Figura 7. Ilustração dos fotorreceptores, bastonete (esquerda) e cone. Modificado de Wright *et al.*. (2010).

Os fotorreceptores cones e bastonetes são células especializadas da retina. Morfologicamente são compostos pelos segmentos interno, externo, núcleo e terminais sinápticos. No segmento interno se encontram as mitocôndrias e, dependendo do táxon em questão, as gotículas de óleo. No segmento externo, estão presentes os discos membranosos onde ocorre a absorção da luz que incide na retina (Ali & Klyne, 1985). O segmento externo possui formatos diferentes para cones (cônico) e bastonetes (bastão) e apresenta evaginações da membrana plasmática onde estão localizados os pigmentos visuais. Estes são compostos por uma proteína de membrana da família dos receptores acoplados à proteína G, chamada de opsina (presente nos bastonetes) (Trezise & Collin, 2005), além de um cromóforo derivado da Vitamina A, o retinal – molécula que efetivamente absorve a energia dos fótons de luz.

Em aves, os cones podem ser classificados em dois grupos diferentes (Figura 8): os cones simples - divididos em quatro tipos - e os cones duplos,

representados por um único tipo de fotorreceptor composto por um membro principal e um membro acessório. Os quatro tipos de cones simples são: (1) cones do tipo UV/VS que contêm pigmentos com absorção máxima em comprimentos de onda curtos na faixa do ultravioleta ou violeta; (2) cones do tipo S que contêm pigmentos com absorção máxima em comprimentos de onda curtos na faixa do azul; (3) cones do tipo M, com pigmentos maximamente sensíveis a comprimentos de onda médios; (4) cones do tipo L, cujos pigmentos são especializados em absorver maximamente comprimentos de onda longos (Bowmaker, 2008). Os bastonetes se apresentam na retina com apenas uma variedade morfológica (Figura 8). Enquanto os cones simples atuam na visão de cores, os cones duplos devem atuar na detecção de luminância e percepção de movimentos (Kram *et al.*, 2010). Entre as espécies de aves, esses fotorreceptores podem apresentar diferentes porcentagens na retina como pode ser observado nos dois exemplos de aves descritos na Tabela 2.



Figura 8. Representação esquemática dos fotorreceptores de aves. Nesta figura pode-se observar as diferentes classes de cones (simples e duplos), com suas respectivas gotículas de óleo: T - Transparente; C - Clara; Y - Amarelo; R - Vermelho; P – Pálido (membro principal). A proporção de cones na retina (porcentagens). Bastonete ao lado do cone duplo. Modificado de Bowmaker (2008)

Espécies			Cones (simples %)		Cones duplos (%)
		UVS	SWS	MWS	LWS	-
	% de todos os cones	7,6	14,6	20,4	20,5	36,9
Chapim-azul	razão dos cones simples	1	1,92	2,68	2,70	-
	razão dos cones simples:duplos	1,71			1	
	% de todos os cones	6,8	12,1	15,0	13,3	52,9
Melro-preto	razão dos cones simples	1	1,78	2,21	1,96	-
	razão dos cones simples:duplos			1		1,12

Tabela 2. Porcentagem de cone em relação ao total de cones na retina, evidenciando a diferença da densidade dos cones nas retinas de Champim–azul (*Blue tit*, acima) e Melro preto (*Blackbird*, abaixo). Modificado de Hart *et al.* (2000).

UVS – sensível ao ultravioleta; SWS – sensível a comprimentos de onda curtos; MWS - sensível a comprimentos de onda médios; LWS – sensível a comprimentos de onda longos.

Nos segmentos internos dos cones das aves estão presentes as gotículas de óleo, organelas esféricas localizadas entre o segmento interno e externo do fotorreceptor. As gotículas podem ou não conter um tipo de pigmento e estes quando presentes, agem como filtros para a luz que incide no segmento externo. Aquelas gotículas que não possuem pigmento já foram encontradas em alguns mamíferos (Walls, 1942; Arrese et al., 2002), répteis (Elling- son et al., 1995, as cited in Hart & Hunt, 2007), peixes (Walls, 1942) e anfíbios (Hailman, 1976, as cited in Hart & Hunt, 2007) e sua função está relacionada ao foco de luz nos segmentos externos, aumentando a sensibilidade do cone (lves et al. 1983, as cited in Hart & Hunt, 2007). Já as gotículas com pigmentos foram encontradas em tartarugas (Liebman and Granda 1971, 1975; Loew and Govardovskii, 2001) lagartos (Barbour et al. 2002; Loew et al., 2002), aves (Gold-Smith et al., 1984) e um grupo de peixes (Robinson, 1994) e o efeito dessa pigmentação da gotícula de óleo presente nos cones é uma mudança na sensibilidade espectral máxima efetiva do cone em relação ao comprimento de onda maximamente absorvido (λ max) do respectivo pigmento visual, como mostrado na Figura 9 (Hart & Hunt, 2007; Hart, 2001; Stavenga &

Wilts, 2014). A Tabela 3 resume as a relação entre as gotículas de óleo em cada cone com os carotenoides presentes em seu interior e os picos de absorção espectral.

Tipo de gotícula	Tipo de cone/gene	Pico de absorção do fotopigmento	Carotenoide	
T (Transparente)	UV ou VS/SWS1	0nm	Não possui	
C (Incolor)	S/SWS2	450nm	Galloxantina	
Y (Amarelo)	M/Rh2	510nm	Zeaxantina	
R (Vermelho)	L(simples)/LWS	576nm	Astaxantina	
P (Verde-pálido,			Galloxantina e	
amarelo-pálido ou incolor)	L(duplo)/LWS	Variável*	zeaxantina ou caroteno	

Tabela 3. Relações entre as gotículas de óleo em cada cone com pico de absorção espectral e os diferentes carotenoides (Stavenga & Wilts, 2014).

*Depende do carotenoide presente na gotícula



Figura 9. Curvas de absorção espectral dos cones do Chapim-azul (linhas cheias) e das gotículas de óleo em associação aos cones (linhas tracejadas). UVS – sensível a comprimentos de onda curtos (ultravioleta), SWS - sensível a comprimentos de onda curtos, MWS - sensível a comprimentos de onda médios e LWS - sensível a comprimentos de onda longos. Modificado de Stavenga e Wilts (2014).

Takase (1997) no seu trabalho de doutorado com beija-flores observou 6 classes diferentes de gotículas de óleo (T fluorescente, T não fluorescente, C, Y,

R e P). As gotículas associadas aos cones UV (T não fluorescente) foram observadas na região dorsal da retina, indicando um possível papel dos cones UV na detecção de flores que refletem a luz UV. Em outras aves foi observada provável relação dos cones UV com magnetorreceptores, responsáveis pela orientação dessas aves de acordo com o campo magnético da Terra (Niebner *et al.*, 2011).

1.4 Opsinas

As opsinas são proteínas de membrana da família dos receptores acoplados à proteína G, compostas por 350 – 400 aminoácidos. Estas proteínas, associadas ao retinal, compõem os pigmentos visuais. Quando a luz atinge os fotopigmentos, o retinal muda a sua conformação de 11-*cis*-retinal para todo *trans*-retinal (Palczewski *et al.*, 2000) dando início ao processo de transdução do sinal luminoso em sinal elétrico.

A classificação dos pigmentos é feita com base nas análises molecular e filogenética dos genes que expressam essas proteínas. Além disso, também considera-se o comprimento de onda que tal pigmento é capaz de absorver maximamente, podendo ser sensíveis a comprimentos de onda curtos, médios ou longos. No caso das Aves, foram descritas 4 variedades de genes (Bowmaker *et al.*, 1997) que expressam os diferentes tipos de opsinas em cones com diferentes picos de absorção espectral (Das *et al.*, 1999):

- SWS1 expressa uma proteína com pico de absorção espectral entre 355 e 420nm;
- SWS2 expressa uma proteína com pico de absorção em torno de 440nm;
- RH2 expressa uma proteína com pico de absorção em torno de 505nm;
- LWS expressa uma proteína com pico de absorção em torno de 570nm.

Além disso, o gene *Rh1* também é encontrado em aves, expresso em bastonetes, e a proteína resultante tem um pico de absorção espectral em torno de 500nm.

Neste trabalho, será estudado apenas o gene *LWS* das corujas por sua importância evolutiva, pois ele é o gene mais ancestral filogeneticamente entre as opsinas (Figura 10).



Figura 10. Cladograma com a filogenia das principais linhagens de opsinas presentes nos vertebrados. Os genes *LWS*, *SWS1*, *SWS2*, *RH2* e *RH1*, respectivamente, foram produzidos após sucessivos eventos de duplicação. As cores do fundo próximas às ramificações da chave indicam a sensibilidade espectral aproximada de cada opsina: LWS 510-560nm; SWS1 360-430nm; SWS2 440-460nm; RH2 470-510nm; RH1 (bastonetes) por volta de 500nm. (Trezise & Collin, 2005).

As opsinas fazem uma ligação covalente com o cromóforo (11-*cis*-retinal) para formar o pigmento visual. Essa ligação ocorre sempre com aminoácido lisina, no sítio 296. Como o retinal está localizado no meio da proteína de membrana, alguns aminoácidos em sítios específicos interferem em sua absorção de fótons, resultando em diferentes comprimentos de onda absorvidos pelos diferentes fotopigmentos. Foram estudadas as regiões mais conservadas dos pigmentos visuais entre os vertebrados, buscando identificar os resíduos que pudessem ser importantes na interação entre a proteína e o cromóforo (Figura 11), ou seja, entre a opsina e o retinal (Yokoyama, 1995). Para o gene

LWS foram descritas cinco posições importantes nessa interação: 164, 181, 261, 269 e 292, com os aminoácidos serina-histidina-tirosina-treonina-alanina (SHYTA) nos respectivos sítios. Essa combinação é responsável por gerar um fotopigmento com λ max de 560nm nos vertebrados em geral (Yokoyama & Radlwimmer, 1998). Variações nestes sítios podem levar a deslocamentos entre 543 e 571nm em aves (Bowmaker & Martin, 1985; Coyle *et al.*, 2012; Hart *et al.*, 2016; Wright & Bowmaker, 2001).

Na Figura 11 também estão identificados sítios responsáveis pelo ajuste espectral das outras opsinas. Como pode ser observado, alguns sítios de aminoácidos são importantes para o ajuste espectral em mais de uma opsina, como é o caso da posição 269 – influenciando no ajuste das opsinas LWS e SWS2.



Figura 11. Ilustração bidimensional mostrando os sete domínios transmembrânicos da opsina. A numeração dos aminoácidos corresponde à sequência da rodopsina de bovinos. O retinal ligase covalentemente a uma lisina na posição 296. Os sítios importantes para o ajuste espectral da opsina LWS estão em vermelho. Modificado de Yokoyama (2002b).

Wu e colaboradores (2016) publicaram recentemente um estudo sobre genes relacionados à visão de corujas e seus parentes mais próximos, pertencentes à superordem Coraciimorphae e às ordens Accipitriformes e Falconiformes, no total de 26 espécies, sendo seis de corujas - Tyto longimembris, Athene noctua, Otus bakkamoena, Otus scops, Asio otus e Bubo bubo – além da Tyto alba. Os autores fizeram o transcriptoma de 119 genes da visão, incluindo os genes de opsinas, LWS, RH1, RH2 e SWS2. Eles observaram fortes sinais de seleção positiva nos genes LWS e SWS2 no ramo ancestral de corujas. Esses genes apresentaram substituições críticas de aminoácidos em relação ao ancestral das corujas em duas posições: a S164A, resultando numa redução do λmax em 7nm no gene LWS, o que confere um pico de absorção espectral em torno de 553nm; e a S292A resultando num aumento do λmax em 8nm, no gene SWS2 o que confere um pico de absorção espectral em torno de 448nm. Essas substituições se aproximam dos comprimentos de onda dominantes no período do crepúsculo, sendo este o período de atividade de muitas corujas. A figura 12 mostra os comprimentos de onda dominantes nas diferentes fases do dia,



Figura 12. Distribuição de energia espectral nas diferentes fases da luz através do espectro visível (Wyszecki & Stiles, 2000).

Bowmaker e Martin utilizaram o método de microespectrofotometria para medir o pico de sensibilidade espectral das opsinas em uma coruja noturna (*Strix* *aluco*), além de terem feito o mesmo para as gotículas de óleo também presentes nos cones. Eles encontraram os valores de P555, P503 e P463 respectivamente para os cones sensíveis aos comprimentos de onda longos, médios e curtos, sendo a sensibilidade efetiva (com as gotículas de óleo) em 556, 530 e 468nm.

Além dos trabalhos citados acima, Hart *et al.* (2000) realizaram a microespectrofotometria e chegaram ao resultado de λ max para o Melro preto (*Turdus merula*, black Bird) de 557nm para o pigmento visual LWS. A possível razão para essa mudança seria a substituição do aminoácido serina por alanina na posição 164 e de glicina por serina na posição 117. Apesar dessa opsina LWS ajustada para comprimentos de onda mais curtos, o pico de absorção final do cone L para o Melro preto ocorre em comprimentos de onda mais longos tendo em vista que a gotícula de óleo encontrada nele determina um pico de sensibilidade espectral efetivo de 601nm, nos cones simples.

A coruja *Strix aluco* está entre as espécies conhecidas até o momento que possuem o pigmento visual LWS ajustado em direção a comprimentos de onda bem mais curtos (555nm). Juntam-se a ele o Pinguim Humboldt, *Spheniscus humboldti*, e o Melro preto, *Turdus merula* (543nm e 557nm, respectivamente, mensurados por microespectrofotometria), e também o Corujão-da-virgínia (*Bubo virginianus*), que teve um λ max em 555nm inferido por estudo eletrorretinográfico (Bowmaker & Martin, 1978, 1985;Hart *et al.*, 2000; Jacobs, Crognale, & Fenwick, 1987).

Outras interações podem causar o efeito oposto ao mostrado anteriormente, como a de íons cloreto com a histidina no sítio 194 e a lisina nos sitio 197 (H197 e K200, numeração equivalente em mamíferos) que proporciona uma mudança em direção a comprimentos de onda mais longos superior a 20nm, como observado nas opsinas LWS de galinha (Okano *et al.*, 1992), pombo (Kawamura *et al.*, 1999), mandarim (Yokoyama *et al.*, 2000) e canário (Das *et al.*, 1999) (Hart & Hunt, 2007).

2 Justificativa

A visão das aves tem sido investigada, entre outros fatores, para entender melhor sua importância no estilo de vida desses animais. O período de atividade do animal pode exercer pressão seletiva relacionada às características do sistema visual, o que implica em variações morfológicas e funcionais entre aves diurnas e noturnas. A ordem dos strigiformes, composta pelas corujas, é bem diversificada no que diz respeito ao período de atividade preferencial, compreendendo animais diurnos, crepusculares e noturnos.

Apesar dos vários trabalhos com visão em corujas, tais como os de Porciatti *et al.* (1989), Nieder & Wagner (1999) e Lisney *et al.* (2012), entre outros, sobre os aspectos anatômicos e funcionais desse sistema, ainda são poucos os estudos relacionados à visão de cores e pigmentos visuais (Bowmaker & Martin, 1978; Jacobs *et al.*, 1987; Martin, 1974; Wu *et al.*, 2016). Dois desses trabalhos (Bowmaker & Martin, 1978; Jacobs *et al.*, 1987) identificaram um cone com λ max em 555nm em duas espécies de corujas noturnas (*Strix aluco e Bubo virginianus*), indicando a presença do pigmento LWS. O estudo das bases moleculares do gene *LWS* em corujas com padrões de atividade diferentes entre si deve trazer dados relevantes para a compreensão do ajuste espectral do pigmento LWS neste grupo.

Com este trabalho também será possível desenvolver metodologias e estímulo visuais mais adequados para o estudo da visão de cores de corujas, além de trazer mais dados sobre a morfologia da retina nas espécies investigadas.

3 Objetivos

Analisar o gene *LWS* em cinco espécies de corujas (*Asio clamator, Athene cunicularia, Glaucidium brasilianum, Megascops choliba* e *Tyto alba*) e comparar esses dados com o hábito circadiano de cada espécie.

Analisar a morfologia da retina e a presença dos cones L em cinco espécies de corujas (*Asio* clamator, *Athene cunicularia, Glaucidium brasilianum, Megascops choliba* e *Tyto alba*).

4 Animais e Métodos

Um indivíduo de cinco espécies de corujas foi avaliado neste estudo: *Asio clamator* (código AS1403), *Athene cunicularia* (código AC0504), *Glaucudium brasilianum* (código GB1303), *Megascops choliba* (código MC0902) e *Tyto alba* (código TA1302). Todos os indivíduos foram mantidos na Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, sob responsabilidade do Prof. Dr. Jerome Baron do Departamento de Fisiologia e Biofísica, no Instituto de Ciências Biológicas. O uso dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sob o protocolo nº 39/2011, em anexo.

Todos os animais foram eutanasiados por excesso de anestésico Tioneambutal (Tiopental Sódico) 30mg/mL. Logo em seguida, o olho direito de cada animal foi enucleado com o auxílio de tesoura cirúrgica e feita a cuia óptica. Após coletados, os olhos foram fixados em paraformaldeído 4% diluído em solução de tampão fosfato salina (PBS) 0,1M, por duas horas e em seguida, foram transferidos para PBS 0,1M para serem utilizados na morfologia. Os olhos esquerdos foram extraídos utilizando um conjunto diferente de material cirúrgico daquele utilizado para coleta dos olhos para morfologia. Este material foi lavado com água sanitária (30%) após cada animal coletado a fim de evitar contaminação com DNA de outra espécie. Após a extração, os olhos foram preservados em *RNA later* (Ambion) a 4ºC para extração do RNA.

4.1 Análise genética

4.1.1 Extração de RNA e transcrição reversa

Nas retinas coletadas para análise genética, a extração do RNA foi realizada utilizando o *RNeasy Mini kit* (Qiagen), conforme o protocolo do fabricante. Apenas o RNAm foi convertido para fita simples de DNA complementar (cDNA) em uma diluição de 1 em 10, utilizando a transcriptase reversa *MultiScribe*TM, (Thermo Fisher Scientific) conforme protocolo do fabricante.

4.12 Reação em Cadeia da Polimerase

A técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) foi realizada com o kit *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Life Technologies). A solução final de cada reação era 50µL, com os reagentes MgCl₂, com concentração de 50µM, os *primers* a 20 µM cada e dNTPs - 10µM cada. Também foram utilizados a enzima Platinum Taq, o tampão 10x *buffer* e água para completar o volume da reação. Os seguintes parâmetros foram adotados: etapa inicial de 94°C por 2 minutos; 37 ciclos de (1) 94°C por 30 segundos; (2) 57°C de temperatura de anelamento por 30 segundos e (3) temperatura de extensão de 72°C por 30 segundos; etapa final de extensão de 72°C por 7 minutos.

Os produtos da PCR foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose (2%). Após eletroforese, o material genético amplificado foi purificado, utilizando o kit *IllustraTM GFXTM PCR DNA and Gel Band purification* (GE Healthcare) seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram mantidas a - 20°C para posterior sequenciamento.

4.1.3 Primers

Para as reações em cadeia de polimerase, foi necessário adquirir primers específicos para os genes de interesse. Para tal, foi utilizado o banco de dados GeneBank e a ferramenta no site Primer3 (Untergasser et al., 2012; Koressaar et al., 2007). No GeneBank, sequências de opsinas de Taeniopygia guttata (NM 001076702.1), Columba livia (AH007800.2), Grus Americana (KM508487.1), Platycercus (KF134493.1), Serinus elegans canaria (AJ277925.1) e Sturnus vulgaris (XM_014893396.1) foram utilizadas como base para desenhar os primers que estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Lista de *primers* desenhados a partir das sequências de *Taenopygia guttata e Columba livia,* e suas respectivas temperaturas de *anneling* utilizadas nas reações de PCR.

Gene	Primers	Temperatura de anelamento
LWS	LWS_ZFinch164_Fw 5'- AGCGCTGGTTCGTGGTCT-3'	57°C
LWS	LWS_ZFinch164_Rv 5'-GGGAAGAAGCAGCAGGTGAC-3'	57°C
LWS	LWS_ZFinch180_Fw 5'-ACATCAAGTTCGACGGGAAA-3'	62ºC
LWS	LWS_ZFinch180_Rv 5'-GCTGCCGCTGAACACGTC-3'	62°C
LWS	LWS_ZFinch277_Fw 5'-AGCAGAAGGAGTCGGAGTCG-3'	62ºC
LWS	LWS_ZFinch277_Rv 5'-TGTAGATGGTGGCGCTCTTG-3'	62°C
LWS	LWS_ZFinch308_Fw 5'-TGGTGGTGGTGATGATCTTG-3'	60°C
LWS	LWS_ZFinch308_Rv 5'-GCCGGTTCATGAAGACGTAG-3'	60°C

*ZFinch = zebra finch (*Taenopygia guttata*)

4.1.4 Sequenciamento do DNA

O sequenciamento dos produtos de PCR foi realizado com base na metodologia de *Sanger* (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977), utilizando o kit *Big Dye Terminator v3.1* (*Life Technologies*) e o sequenciador 3500xL (*Life Technologies*) do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEPAE) em São Paulo.

4.2 Análise morfológica

42.1 Coleta e emblocagem do material

A cuia optica obtida após dissecção dos olhos passou por um processo de crioproteção feita em sacarose 30%, por 24hs a 4°C e foram emblocadas em OCT (*Optimum Cutting Temperature Formulation*) para obtenção dos cortes transversais em criostato a -28°C. De 2 a 3 cortes foram coletados em lâminas

gelatinizadas e mantidos a -20°C.

422 Imunohistoquímica

Para a realização da imunohistoquímica, foram feitas barreiras com esmalte ao redor de cada corte da lâmina, para evitar vazamento e contaminação das soluções dos poços. Cada corte foi tratado com solução tampão fosfato PBS 0,1M + TRITON 0,3% e incubados por 10 minutos. Essa lavagem foi repetida três vezes.

Em seguida, os cortes foram incubados por 1 hora em Soro Normal de Cabra 10% (*SIGMA*) diluído em tampão fosfato PBS 0,1M + TRITON 0,3% para bloqueio de sítios inespecíficos

O anticorpo primário utilizado foi o *Rabbit anti Opsin (Millipore* AB5405), produzido em coelhos contra opsina de humanos e é específico para cones L/M (o número do gene é NM_020061.5). A comparação da sequência do anticorpo com o banco de dados de aves foi feita com o auxílio da ferramenta BLAST para verificar homologia. Ele foi utilizado na concentração de 1:300, diluído em solução tampão PBS 0,1M + TRITON 0,3%. Nas lâminas contendo três cortes, o anticorpo foi gotejado em cada um exceto o primeiro de cada lâmina, tratado apenas com solução tampão PBS 0,1M + TRITON 0,3%, a fim de obter o controle negativo da reação. Os cortes ficaram incubando por 12 horas.

A seguir, os cortes receberam três lavagens com tampão PBS 0,1M + TRITON 0,3% de 10 minutos cada.

Após as lavagens, os cortes foram incubados com anticorpo secundário Goat anti Rabbit acoplado a CY3 (Jackson) diluído em tampão PBS 0,1M +TRITON 0,3% na concentração 1:200 por 2 horas em câmara escura, a fim de preservar a fluorescência.

Logo após, os cortes receberam três lavagens de 10 minutos cada com solução tampão PB 0,1M. Para vedação das lâminas foi utilizado o meio de montagem o *Vectashield* contendo DAPI (*2-(4-amidinophenyl)-1H -indole-6-carboxamidine*) e foram cobertos com lamínulas.

4.3 Análise dos resultados

As sequências obtidas da opsina em corujas foram alinhadas utilizando o algoritmo *ClustalW* com sequências de outras espécies de aves, *Taeniopygia guttata, Columba livia* e *Serinus canaria,* através do programa BioEdit v7.2.5 e foram identificados os aminoácidos presentes nos sítios 164, 181, 262, 269 e 292, importantes para o ajuste espectral da opsina. Com este resultado foi estimado o pico de absorção espectral da opsina presente em cada espécie com base em dados da literatura.

As lâminas foram visualizadas e fotografadas em microscópio de fluorescência (Leica DMRXE, Nussloch, Alemanha) acoplado a câmera Nikon digital sight DS-U3, com o software de imagem NIS Elements v.4.0. As imagens obtidas foram analisadas com softwares de edição de imagem com a finalidade de identificar as marcações realizadas no tecido e diferenciar as camadas da retina, assim como os diferentes fotorreceptores.

5 Resultados

5.1 Gene LWS

Na Tabela 6 constam os sítios considerados importantes para o deslocamento espectral do pigmento sensível aos comprimentos de onda longos (LWS) e seus respectivos aminoácidos em cada uma das espécies avaliadas. Nesta tabela podemos ver que as cinco espécies que estão sendo comparadas apresentam os mesmos aminoácidos nos cinco sítios analisados, sendo eles A164, H181, Y261, T269 e A292. Com este resultado, o pico de absorção espectral estimado para o pigmento LWS é de 555nm, com base em dados da literatura (Hart & Hunt, 2007). A Figura 12 mostra a curva de absorção espectral inferida a partir da combinação de aminoácidos obtida no sequenciamento do gene *LWS*.

Aves/Sítios	164	181	261	269	292
AS1403	A	н	Y	Т	А
GB1303	A	Н	Y	Т	А
MC0902	A	н	Y	Т	А
AC0504	A	н	Y	Т	А
TA1302	A	н	Y	Т	A

Tabela 5. Aminoácidos encontrados nos 5 sítios importantes para o deslocamento espectral do pigmento LWS.

AS (Asio clamator); GB (Glaucidium brasilianum); MC (Megascops choliba); AC (Athene cunicularia); TA (Tyto alba); A (Alanina); H (Histidina); Y (Tirosina); T (treonina).



Figura 13. Curva de absorção espectral inferida a partir do resultado do sequenciamento do gene *LWS* para as cinco espécies de corujas analisadas.

5.2 Imunohistoquímica

Os resultados obtidos com a técnica de imunohistoquímica mostraram uma marcação positiva para o anticorpo *Rabbit anti opsin* (AB5405) nos cortes obtidos a partir das retinas das cinco espécies de corujas analisadas. Essa marcação foi observada nos segmentos externos dos cones presentes na camada de fotorreceptores (Figura 12).







Figura 14. Corte transversal de retinas de (A) *Athene cunicularia* (B) *Asio clamator*, (C) *Glaucidium brasilianum*,, (D) *Tyto alba* e (E) *Megascops choliba*. Em azul estão evidenciados núcleos celulares marcados com DAPI. Em vermelho (setas), os segmentos externos de cones marcados com anticorpo *Rabbit anti Opsin (Millipore* AB5405). 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.

6 Discussão

A partir de nossos resultados foi possível observar a organização retiniana e marcar diferencialmente os segmentos externos de cones. Também conseguimos identificar os cinco sítios importantes para o ajuste espectral da opsina LWS nas cinco espécies de corujas analisadas.

Um dos principais objetivos deste estudo foi avaliar nas espécies *Asio clamator, Glaucidium brasilianum, Megascops choliba, Athene cunicularia* e *Tyto alba* por sequenciamento genético, os sítios de maior importância para o ajuste espectral da opsina LWS, são eles: 164, 181, 261, 269 e 292 (Yokoyama & Radlwimmer, 1998). Como resultados, nós observamos que, para as cinco espécies avaliadas, não houve variação no tipo de aminoácido encontrado para cada um dos sítios espectrais (A164, H181, Y261, T269 e A292).

De acordo com Yokoyama & Radlwimmer (2001), o aminoácido mais comumente presente na posição 164 em aves é a serina, o que já foi demonstrado em pombo (Kawamura et al., 1999), galinha (J. K. Bowmaker & Knowles, 1977) e mandarim (Shozo Yokoyama et al., 2000). No entanto, nossos resultados demonstram que, para as espécies *Asio clamator, Glaucidium brasilianum e Megascops choliba, Athene cunicularia e Tyto alba* de corujas, a alanina está presente nesse sitio. Considerando que a serina é um aminoácido polar neutro e que a alanina é apolar (Higgs & Attwood, 2005 p.15), essa substituição pode alterar a interação dos fótons com o retinal e consequentemente o pico de absorção espectral da proteína. Nos demais sítios (181, 261, 269 e 292) foram observados os mesmos aminoácidos descritos em aves (HYTA, respectivamente), para todas as cinco espécies de corujas.

Estudos anteriores (Hart, 2001; Yokoyama & Radlwimmer, 1998) mostraram que, em aves e mamíferos, a substituição de uma serina por uma alanina no sitio 164 (numeração a partir da rodopsina bovina) é responsável por um deslocamento espectral de aproximadamente 7nm em direção a comprimentos de ondas mais curtos. Em aves, para a combinação de aminoácidos SHYTA, Yokoyama & Radlwimmer (2001) descrevem um pigmento visual com pico de absorção espectral entre 559 e 561nm. Desta forma, podemos inferir que os indivíduos das cinco espécies estudadas devem apresentar um pico de absorção espectral da opsina LWS por volta de 552 a 554nm. Este valor está dentro da faixa espectral descrita para o pigmento LWS em outra espécie de coruja, a *Strix aluco* (555±3nm), cujo valor foi medido por meio da técnica de microespectrofotometria (Bowmaker & Martin, 1978). Estudos posteriores da genética do pigmento LWS da *S. aluco* bem como a microespectrofotometria das cinco espécies de corujas deste trabalho devem ser realizados para confirmar os dados sobre a genética e o pico de absorção espectral do pigmento LWS de corujas.

Considerando as variações de aminoácidos possíveis para os sítios de ajuste espectral do pigmento LWS, observa-se que a maioria das aves apresentam um pico de absorção espectral para o pigmento LWS acima de 560nm, com média de 565nm (Hart & Hunt 2007). Poucas espécies estão abaixo deste valor (Figura 14). Entre elas, temos o pinguim, o melro-preto e as corujas. Em retina de pinguim (Spheniscus humboldti), Bowmaker e Martin (1985) identificaram, através de microespectrofotometria, um tipo de cone com pico de absorção espectral em 543nm, deslocado em direção a comprimentos de onda mais curtos quando comparado a outras aves. Esse deslocamento se deve as adaptações visuais desse animal em virtude do ambiente aquático em que vive. Os autores citam o trabalho de Stonehouse (1975) para mencionar que o pinguim Spheniscus humboldti habita principalmente águas oceânicas profundas, onde os comprimentos de onda longos não prevalecem. O melro-preto (Turdus merula) estudado por Hart et al.(2000), possui um pigmento visual que absorve comprimentos de onda longos com o pico de absorção espectral em 557nm. Apesar do comprimento de onda maximamente absorvido por seu pigmento visual ser deslocado em direção a comprimentos de onda mais curtos, assim como o das corujas e do pinguim, a gotícula de óleo presente entre os segmentos interno e externo altera a sensibilidade espectral efetiva do cone para cerca de 600nm.



Figura 15. Curvas de absorção espectral da opsina LWS em aves, inferidas a partir da sequência de aminoácidos de acordo com a literatura: 543nm – pinguim; 555nm – corujas;557nm– melropreto; 565nm – curva média das aves.

Portanto, dentro do grupo das aves descritas até o presente momento somente as corujas e o pinguim (espécie) apresentam a sensibilidade espectral final do cone L (que expressa o gene LWS) deslocada para comprimentos de onda mais curtos. No caso das corujas, isto pode ser devido ao fato das corujas terem ancestrais noturnos.

Com os estudos moleculares e filogenéticos, sabe-se que o ancestral comum das corujas apresentou a troca da serina pela alanina (S164A) bem como passou a ter como período de atividade preferencial o crepúsculo. O ancestral das aves apresentava uma serina no sítio 164 (S164). O ancestral comum das corujas, por sua vez, apresentou a troca da serina pela alanina neste sítio (S164A) bem como apresentava como período de atividade preferencial o crepúsculo (Heesy & Hall, 2010; Wu et al., 2016). Muitas corujas viventes atualmente, como as estudadas por Wu *et al.* (2016), são noturnas (Tabela 4). Entretanto, algumas espécies se adaptaram às horas de maior luminosidade – casos de *Athene cunicularia* e *Glaucidium brasilianum*. Apesar das diferenças no padrão de atividade observado entre as corujas, todas as espécies estudadas até o momento mantiveram o gene *LWS* com a mesma sequência de aminoácidos, fato oposto ao descrito em serpentes (Hauzman, 2014). Em

serpentes, apesar de seus ancestrais noturnos, observa-se que, entre as diferentes espécies, os aminoácidos presentes nos cinco sítios importantes para o ajuste espectral da opsina diferem entre os animais noturnos e diurnos, apresentando as combinações AHYAA (537nm, noturno), AHFTA (543nm, diurno), AHYTA (553nm, diurno e noturno) e SHYTA (560nm, diurno).

Espécies	Padrão de atividade
Tyto longimembris	Noturna
Athene noctua	Noturna
Otus bakamoena	Noturna
Otus scops	Noturna
Asio otus	Noturna
Bubo bubo	Noturna
Tyto alba	Noturna

Tabela 6 . Espécies de corujas cujos dados genéticos foram analisados no trabalho de Wu *et al.* (2016) e seus padrões de atividade preferencial.

Ainda que os pigmentos LWS das corujas estudadas neste trabalho sejam iguais, modificações na retina como: presença ou ausência de fóvea, densidades de fotorreceptores diferentes (presença majoritária de bastonetes ou proporção equilibrada entre cones e bastonetes), presença ou ausência de gotículas de óleo e de cones duplos, podem estar influenciando a visão desses animais. No caso das cinco espécies de corujas estudadas, pudemos observar as camadas da retina e a presença dos cones L. Desse modo, o estudo morfológico se faz importante para entender o correto funcionamento da visão nessas espécies.

O anticorpo *rabbit anti opsin* (AB5405) marcou os segmentos externos dos cones nas diferentes espécies de corujas. Em outros vertebrados, este anticorpo já foi utilizado para marcar o cone L e obteve-se nestas retinas uma marcação específica, como por exemplo visto em tartaruga (Grötzner, 2005) e serpentes (Hauzman, 2014). Apesar de ter sido produzido a partir da opsina de humanos, uma comparação feita no BLAST mostrou homologia com opsinas LWS de aves podendo ser usado para estudos morfológicos em retina de aves. Entretanto,

mais experimentos são necessários para confirmar se essa marcação está restrita aos cones L ou se é inespecífica. Uma forma de verificar a especificidade do anticorpo é fazendo a dupla marcação: utilizam-se dois anticorpos específicos para diferentes opsinas, no mesmo tecido. Com essa técnica podemos visualizar marcações de opsinas distintas, no mesmo corte e dessa forma é possível identificar se estão ou não marcando as mesmas células pela sobreposição da marcação.

As imagens obtidas com a técnica de HE nos permitiram observar a organização da retina, mas a preservação do tecido não ficou boa. Tanto na coloração HE quanto nas marcações de imunohistoquímica observamos um tecido danificado, com buracos nas camadas e a camada de fotorreceptores por vezes desorganizada e parcialmente separada das outras camadas. A hipótese mais provável é que o tempo de fixação não tenha sido o mais adequado para essas espécies, então seria necessário uma melhor padronização do protocolo para aumentar a preservação da retina e a qualidade das imagens obtidas.

Outros estudos de morfologia como quantificação dos diferentes tipos de fotorreceptores com essas espécies são importantes para verificar possíveis especializações na retina dessas corujas, como presença ou ausência de gotículas de óleo nos cones ou a eventual presença da fóvea e também investigar a presença de outros genes expressos em cones. Essas características morfológicas podem influenciar a visão de cores nesses animais, apesar de não haver diferença genética no *LWS*.

7 Conclusões

Não foram observadas diferenças nos sítios críticos para o ajuste espectral da opsina expressa pelo gene *LWS* entre as cinco espécies de corujas estudadas. Considerando que a *G. brasilianum* e *A. cunicularia* apresentam um período de atividade diferente das demais espécies de corujas, podemos dizer que para esses animais avaliados, o ajuste espectral da opsina LWS não é influenciado pelos hábitos circadianos.

Além disso, observamos que o pigmento LWS é expresso nos cones das retinas desses animais os quais mantem uma organização retiniana laminar, com núcleos e plexos intercalados, típica de retina de vertebrados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, M. A., & Klyne, M. A. (1985). *Vision in vertebrates*. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/8504547
- Barros, F. M., Motta-junior, J. C., & Unior, C. M. O. (2014). Home Range and Habitat Selection by the Tropical Screech- Owl in a Brazilian Savanna Your use of this PDF, the BioOne Web site, and all posted and associated content HOME RANGE AND HABITAT SELECTION BY THE TROPICAL SCREECH-OWL IN A BRAZILIAN SAVANNA, 48(2), 142–150.
- Bowmaker, J. K. (2008). Evolution of vertebrate visual pigments. *Vision Research*, 48(20), 2022–2041. https://doi.org/10.1016/j.visres.2008.03.025
- Bowmaker, J. K., et al. (1997). Visual pigment and oil droplets from six classes of photorecepto in the retinas of birds. *Vision Res*, *37*(16), 2183–2194.
- Bowmaker, J. K., & Knowles, A. (1977). The Visual Pigments and Oil Droplets of the Chicken Retina. *Vision Res*, *17*, 755–764.
- Bowmaker, J. K., & Martin, G. R. (1978). Visual pigments and colour vision in a nocturnal bird, Strix aluco (Tawny owl). Vision Research, 18(9),1125–1130. https://doi.org/10.1016/0042-6989(78)90095-0
- Bowmaker, J. K., & Martin, G. R. (1985). Visual pigments and oil droplets in the penguin, Spheniscus humboldti. *Journal of Comparative Physiology A*, *156*(1), 71–77. https://doi.org/10.1007/BF00610668
- Chien, S. H.-L., Teller, D. Y., & Palmer, J. (2000). The transition from scotopic to photopic vision in 3-month-old infants and adults: an evaluation of the rod dominance hypothesis. *Vision Research*, *40*, 3853–3871.
- Coyle, B. J., et al. (2012). Limited variation in visual sensitivity among bowerbird species suggests that there is no link between spectral tuning and variation in display colouration. *Journal of Experimental Biology*, 215(7), 1090–1105. https://doi.org/10.1242/jeb.062224
- Creutzburg, R., et al (Eds.). (2016). *Multimedia y Compresión de Datos* (2016th ed.). Brandenburg: Wikipedia. https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1416.1527
- Das, D., et al. (1999). Visual pigments and oil droplets in the retina of a passerine bird, the canary Serinus canaria: Microspectrophotometry and opsin sequences. *Vision Research*, 39(17), 2801–2815. https://doi.org/10.1016/S0042-6989(99)00023-1

Davies, M. N. ., & Green, P. R. (2012). Perception and Motor Control in Birds: An

Ecological Approach. https://doi.org/10.1007/978-3-642-75869-0

- Edut, S., & Eilam, D. (2003). Rodents in open space adjust their behavioral response to the different risk levels during barn-owl attack. *BMC Ecology*, *3*, 10. https://doi.org/10.1186/1472-6785-3-10
- Fite, K. V., & Rosenfield-Wessels, S. (1975). A comparative study of deep avian fovea. *Brain, Behavior and Evolution*, *12*, 97–115.
- Fite, K. V. (1973). Anatomical and behavioral correlates of visual acuity in the Great Horned Owl. *Vision Research*, *13*(2), 219–230. https://doi.org/10.1016/0042-6989(73)90101-6
- Flesch, A. D., et al (2015). Spatial, temporal, and density-dependent components of habitat quality for a desert owl. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–36. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119986
- Gelatt, K. N. (Ed.). (2014). *Essentials of veterinary ophtalmology* (3rd ed.). Gainesville: Wiley Blackwell.
- Harmening, W. M., et al (2007). Vernier acuity in barn owls. Vision Research, 47(7), 1020–1026. https://doi.org/10.1016/j.visres.2007.01.005
- Hart, N. S. (2001). The visual ecology of avian photoreceptors. *Progress in Retinal and Eye Research*, *20*(5), 675–703. https://doi.org/10.1016/S1350-9462(01)00009-X
- Hart, N. S., & Hunt, D. M. (2007). Avian visual pigments: Characteristics, spectral tuning, and evolution. *American Naturalist*, *169*(SUPPL.), S7–S26. https://doi.org/10.1086/510141

Hart, N. S., et al. (2016). Visual pigments in a palaeognath bird, the emu *Dromaius novaehollandiae* : implications for spectral sensitivity and the origin of ultraviolet vision. https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1063

- Hart, N. S., Partridge, J. C., Cuthill, I. C., & Bennett, a T. (2000). Visual pigments, oil droplets, ocular media and cone photoreceptor distribution in two species of passerine bird: the blue tit (*Parus caeruleus* L.) and the blackbird (*Turdus merula* L.). Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology, 186(4), 375–387. https://doi.org/10.1007/s003590050437
- Heesy, C. P., & Hall, M. I. (2010). The nocturnal bottleneck and the evolution of mammalian vision. *Brain, Behavior and Evolution*, 75(3), 195–203. https://doi.org/10.1159/000314278

Hegel, G. W. (1820). Princípios da filosofia do direito.

Higgs, P. G., & Attwood, T. K. (2005). *Bioinformatics and Molecular Evolution*. Blackwell Publishing Ltd.

- Jacobs, G. H., Crognale, M., & Fenwick, J. (1987). Cone pigment of the great horned owl. *Condor, The*, (January), 434–436.
- Jones, M. P., Pierce, K. E., & Ward, D. (2007). Avian Vision: A Review of Form and Function with Special Consideration to Birds of Prey. *Journal of Exotic Pet Medicine*, *16*(2), 69–87. https://doi.org/10.1053/j.jepm.2007.03.012
- Kawamura, S., Blow, N. S., & Yokoyama, S. (1999). Genetic analyses of visual pigments of the pigeon (Columba livia). *Genetics*, *153*(4), 1839–1850.
- König, C., & Weick, F. (2008). Owls of the world (second edi). Christopher Helm.
- Kram, Y. a., Mantey, S., & Corbo, J. C. (2010). Avian cone photoreceptors tile the retina as five independent, self-organizing mosaics. *PLoS ONE*, 5(2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008992
- Lisney, T. J., Iwaniuk, A. N., Bandet, M. V., & Wylie, D. R. (2012). Eye shape and retinal topography in owls (Aves: Strigiformes). *Brain, Behavior and Evolution*, *79*(4), 218–236. https://doi.org/10.1159/000337760
- Martin, G. R. (1974). Color vision in the tawny owl (Strix aluco). *J Comp Physiol Psychol*, 86(1), 133–141.
- Martin, G. R. (1977). Absolute visual threshold and scotopic spectral sensitivity in the tawny owl Strix aluco. *Group*, *268*(5621), 636–638. https://doi.org/10.1038/268636a0
- Martin, G. R. (1982). An owl's eye: Schematic optics and visual performance in Strix aluco L. *Journal of Comparative Physiology* □ *A*, *145*(3), 341–349. https://doi.org/10.1007/BF00619338
- Martin, G. R. (1984). The visual fields of the tawny owl, Strix aluco L. Vision Research, 24(12), 1739–1751. https://doi.org/10.1016/0042-6989(84)90005-1
- Martin, G. R., & Gordon, I. E. (1974). Visual acuity in the tawny owl (Strix aluco). *Vision Research*, *14*(12), 1393–1397.
- Martin, G. R., Gordon, I. E., & Cadle, D. R. (1975). Electroretinographically determined spectral sensitivity in the tawny owl (Strix aluco). *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *89*(1), 72–8.
- Martins, M., & Egler, S. G. (1990). Comportamento de caça em um casal de corujas buraqueiras (Athene cunicularia) na região de Campinas, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia*, *50*(3), 579–584.
- 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.

- Niebner, C., et al. (2011). Avian Ultraviolet/Violet cones identified as probable magnetoreceptors. *PLoS ONE*, *6*(5), 1–8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020091
- Nieder, A., & Wagner, H. (1999). Perception and neuronal coding of subjective contours in the owl. *Nature Neuroscience*, 2(7).
- Okano, T., et al. (1992). Primary structures of chicken cone visual pigments: vertebrate rhodopsins have evolved out of cone visual pigments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(13), 5932–6.
- Orlowski, J., Harmening, W., & Wagner, H. (2012). Night vision in barn owls: visual acuity and contrast sensitivity under dark adaptation. *Journal of Vision*, *12*(13), 4. https://doi.org/10.1167/12.13.4

Palczewski, K., et al. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, 289(5480), 739–745. https://doi.org/10.1126/science.289.5480.739

Pinto, L., & Baron, J. (2010). Spatiotemporal Frequency Tuning Dynamics of Neurons in the Owl Visual Wulst, 3424–3436. https://doi.org/10.1152/jn.01151.2009.

Pinto, D. G., Cruz, G. D., Teixeira, R. H. F., Couto, E. P., & Carvalho, M. P. N. de. (2016). Histological analysis of the eyeball of Neotropical birds of prey *Caracara plancus, Falco sparverius, Rupornis magnirostris, Megascops choliba and Athene cunicularia. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, *53*(3), 280. https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2016.109045

- Porciatti, V., Fontanesi, G., & Bagnoli, P. (1989). The electroretinogram of the little owl (*Athene noctua*). *Vision Research*, *29*(12), 1693–1698. https://doi.org/10.1016/0042-6989(89)90151-X
- Remsen, J. V. J., et al. (n.d.). A classification of the bird species of South America. American Ornithologists' Union.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, a R. (1977). DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–7. https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463
- Stavenga, D. G., & Wilts, B. D. (2014). Oil droplets of bird eyes: microlenses acting as spectral filters. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1636), 20130041. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0041
- Trezise, A. E. O., & Collin, S. P. (2005). Opsins: Evolution in waiting. *Current Biology*, *15*(19), 794–796. https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.09.025
- Walls, G. L. (1942). The Vertebrate Eye And It's Adaptive Radiation. *Optometry and Vision Science*, 814. https://doi.org/10.1097/00006324-194301000-

00005

- Wink, M., & Heidrich, P. (2000). Molecular Systematics of Owls (Strigiformes) based on DNA-sequences of the mitochondrial cytochrome b gene. *Raptors at Risk*.
- Wink, M., 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 Molecular phylogeny of owls (Strigiformes) inferred from DNA sequences of the mitochondrial cytochrome b and the nuclea, 97(4), 581–591.
- Wright, M. W., & Bowmaker, J. K. (2001). Retinal photoreceptors of paleognathous birds: The ostrich (Struthio camelus) and rhea (Rhea americana). *Vision Research*, 41(1), 1–12. https://doi.org/10.1016/S0042-6989(00)00227-3
- Wu, Y., Hadly, E. A., Teng, W., Hao, Y., Liang, W., Liu, Y., & Wang, H. (2016). Retinal transcriptome sequencing sheds light on the adaptation to nocturnal and diurnal lifestyles in raptors. *Scientific Reports*, 6(April), 33578. https://doi.org/10.1038/srep33578
- Wyszecki, G., & Stiles, W. S. (2000). Color Science. Concepts and Methods, Quantitative Data and Formulae. Wiley Series in Pure and Applied Optics
- Yokoyama, S. (1995). Amino acid replacements and wavelength absorption of visual pigments in vertebrates. *Molecular Biology and Evolution*, *12*(1), 53–61.
- Yokoyama, S. (2002a). Molecular evolution of color vision in vertebrates.
- Yokoyama, S. (2002b). Molecular evolution of color vision in vertebrates.
- Yokoyama, S., Blow, N. S., & Radlwimmer, F. B. (2000). Molecular evolution of color vision of zebra finch. *Gene*, *259*(1–2), 17–24. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00435-2
- Yokoyama, S., & Radlwimmer, F. B. (1998). The "five-sites" rule and the evolution of red and green color vision in mammals. *Molecular Biology and Evolution*, *15*(5), 560–567. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025956
- Yokoyama, S., & Radlwimmer, F. B. (2001). The molecular genetics and evolution of red and green color vision in vertebrates. *Genetics*, *158*(4), 1697–1710.

ANEXO – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

