

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

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

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.

Catlogação 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: _____

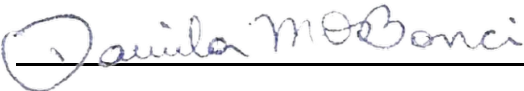
Prof^a. Titular Dora Fix Ventura

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:  _____

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 científica Julia Silvestre pelo auxílio 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 mantêm 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 coruja-do-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 *Glaucidium 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 utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciadas 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 circadian habits were investigated: *Asio clamator*, *Megascops choliba*, *Tyto alba* (nocturnal), *Athene cunicularia* e *Glaucidium 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