

ESTUDO DA MORFOLOGIA RETINIANA E GENÉTICA DE OPSINAS DO BENTEVIZINHO-DE-ASA-FERRUGÍNEA (*MYIOZETETES CAYANENSIS*, TYRANNIDAE).

1Naman, M.J.V.; 1,3Hauzman, E.; 1,3Ventura, D.F.; 2da Silva, M.L.,
1,3Bonci, D.M.O.

1Instituto de Psicologia, Departamento de Psicologia Experimental, Universidade de São Paulo - USP, São Paulo/SP; 2Universidade Federal do Pará – UFPA, Belém, Pará/PA; 3Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa, Hospital Israelita Albert Einstein – IIPAE, São Paulo/SP.

maria.vilani@usp.br

Objetivos

1. Amplificar e sequenciar os cinco genes de opsinas expressos na retina de *M. cayanensis* (*LWS*, *SWS1*, *SWS2*, *RH2* e *RH1*); 2. Estimar o pico de sensibilidade espectral (λ_{max}) das opsinas, com base na sequência de aminoácidos encontrada nos sítios responsáveis pelo deslocamento espectral; 3. Identificar os fotorreceptores clássicos através da técnica de Imunohistoquímica.

Métodos e Procedimentos

Cinco indivíduos foram coletados, eutanasiados e seus olhos foram enucleados. Para análise genética, um olho foi preservado em RNAlater® (Ambion), a 4°C. O RNA total foi extraído e convertido em cDNA. Foram amplificadas sequências parciais dos genes das opsinas por meio da técnica de PCR. Após amplificação, as sequências foram purificadas e sequenciadas. As análises foram feitas no programa BioEdit v7.2.5 e alinhadas com seqüências de opsina de outras aves. Para análises morfológicas, os olhos foram fixados 2h em paraformaldeído a 4%, e depois foram mantidas em tampão fosfato 0,1M a 4°C. Os olhos foram seccionados em criostato e os cortes foram incubados com anticorpo *Rabbit anti Opsin* (Millipore AB5405), para marcação dos cones L, e aglutinina WGA (*Wheat Germ agglutinin*) (Vector Laboratories, California, USA) extraída de trigo e acoplada a molécula de FITC (Fluoresceína) para marcação de bastonetes.

O presente projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética do Instituto de Psicologia (IPUSP) (nº2585040517) e da Universidade Federal do Pará (UFPA) (nº7696310817).

Resultados

Os cinco genes de opsinas, *LWS*, *RH2*, *RH1*, *SWS1* e *SWS2*, foram amplificados e sequenciados. A análise do sequenciamento no fotopigmento *LWS* revelou a presença dos aminoácidos SHYTA nos sítios 164, 181, 261, 269 e 292, que são responsáveis por um λ_{max} a 560nm. No sequenciamento da opsina *RH2* foi revelado a presença dos aminoácidos ESS nos sítios 122, 222 e 295, podendo conferir um λ_{max} em ~512nm. Na opsina *SWS1* foram encontrados os aminoácidos CSTFGS nos sítios 86, 90, 93, 116, 118 e 298 que podem conferir um λ_{max} de ~406nm. No fotopigmento *SWS2* foi encontrado os aminoácidos FIGTFFT nos sítios 46, 49, 52, 93, 164, 207 e 269 e um λ_{max} presumido em ~460nm. Finalmente, na opsina *RH1*, expressa em bastonetes, foram vistos os aminoácidos ECA nos sítios 122, 222 e 295, o que infere um λ_{max} em ~503nm (Figura 1). A análise morfológica mostrou um grande número de cones grandes e únicos marcados com anticorpo anti-opsina L/M (Figura 2) e bastonetes, que podem expressar o fotopigmento *RH1* (Figura 3).

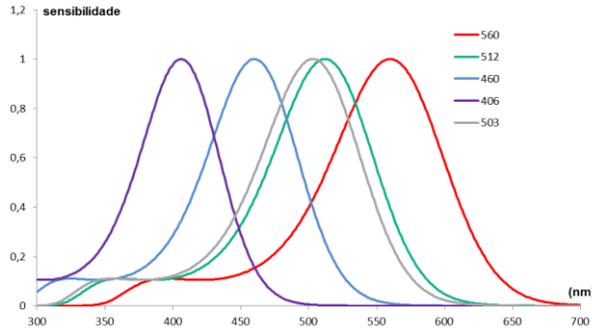


Figura 1- Curvas de sensibilidade espectral dos pigmentos *LWS*, *RH2*, *RH1*, *SWS2* e *SWS1*, com pico de absorção em 560nm, 512nm, 503nm, 460nm e 406nm, respectivamente, expressos na retina de *Myiozetetes cayanensis*.

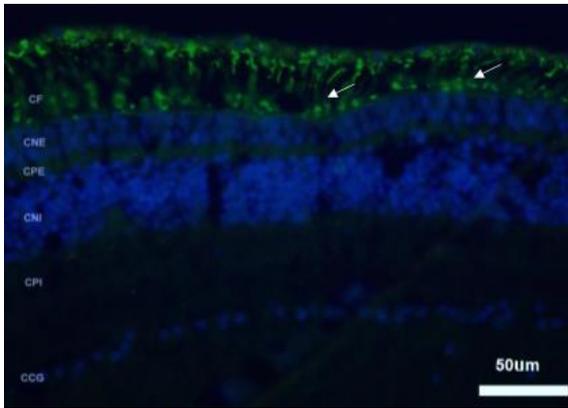


Figura 2- Corte transversal da retina de *M. cayanensis*, marcado com anticorpo anti-opsina L/M. CF (camada de fotorreceptores), CNE (camada nuclear externa), CPE (camada plexiforme externa), CNI (camada nuclear interna), CPI (camada plexiforme interna) e CCG (camada de células ganglionares). Núcleos celulares marcados em azul por DAPI. Identificação dos cones L (seta).

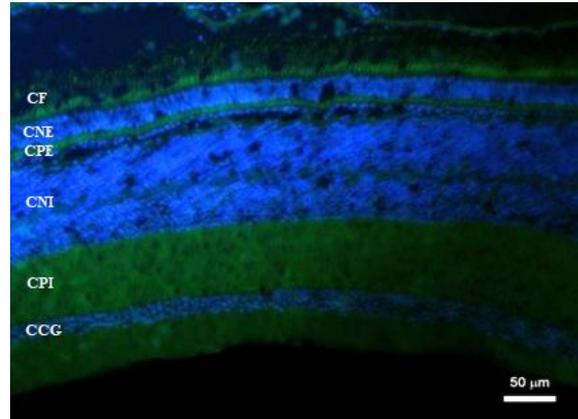


Figura 3- Corte transversal da retina de *M. cayanensis*, marcado com anticorpo WGA. CF (camada de fotorreceptores), CNE (camada nuclear externa), CPE (camada plexiforme externa), CNI (camada nuclear interna), CPI (camada plexiforme interna) e CCG (camada de células ganglionares). Núcleos celulares marcados em azul por DAPI.

Conclusões

Os cinco genes de opsina (*LWS*, *RH2*, *RH1*, *SWS1* e *SWS2*) foram identificados na retina de *Myiozetetes cayanensis* e os respectivos picos de sensibilidade espectral foram estimados (560nm, 512nm, 503nm, 406nm e 460nm). A presença de quatro genes de opsinas em cones confere o potencial para uma visão de cor tetracromática nesta espécie, de acordo com o que é encontrado na maioria das espécies de aves diurnas. A identificação bem sucedida do cone L e de bastonetes por imunohistoquímica abre a possibilidade para trabalhos futuros com análises da topografia retiniana dessa espécie.

Referências Bibliográficas

- Ödeen, A., & Håstad, O. (2013). The phylogenetic distribution of ultraviolet sensitivity in birds. *BMC evolutionary biology*, 13(1), 36.
- Yokoyama, S., & Radlwimmer, F. B. (2001). The molecular genetics and evolution of red and green color vision in vertebrates. *Genetics*, 158(4), 1697-1710.
- Yokoyama, S., & Tada, T. (2003). The spectral tuning in the short wavelength-sensitive type 2 pigments. *Gene*, 306, 91-98.