

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

Paulo Roberto de Amoretty

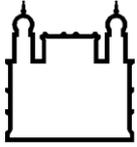
Análise dos ritmos circadianos de atividade locomotora de drosófilas transgênicas carregando o gene *cycle* do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**Orientador** : Prof. Dr. Alexandre Afranio Peixoto

**RIO DE JANEIRO**

2010



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

Paulo Roberto de Amoretty

Análise dos ritmos circadianos de atividade locomotora de drosófilas transgênicas carregando o gene *cycle* do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Alexandre Afranio Peixoto**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Leila de Mendonça Lima - Presidente**

**Prof. Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine**

**Prof. Dr. Marcelo Salabert Gonzalez**

**Prof. Dr. Paulo Redner (Suplente)**

**Prof. Dr. Luiz Guilherme Soares da Rocha Bauzer (Suplente)**

Rio de Janeiro, 29 de abril de 2010

Às minhas filhas:  
Alice e Aline.

## **Agradecimentos**

Agradeço antes de tudo a Deus por me dar disposição e coragem pra enfrentar os desafios da vida. Aos meus familiares que me apoiaram e incentivaram, embora muitas vezes fosse difícil explicar o meu trabalho. Meus pais Roberto e Hercília pelo apoio e compreensão nos meus momentos de impaciência e nervosismo. Sou grato também aos meus tios Gilberto e Zuila por se fazerem sempre presentes na minha vida. Aos meus irmãos Eliseu e Patrícia pelo apoio e incentivo. A Natalia, que é mais que uma companheira, é parceira de todas as horas. Mesmo nos momentos mais difíceis, estive ao meu lado me apoiando sempre. Ela me trouxe Alice e Aline, minhas filhas, sou uma pessoa de sorte por tê-la em minha vida.

São muitos os amigos que contribuíram para que este trabalho se realizasse. O casal Paulo Redner (revisor) e Rafaela, que me ajudaram a entrar (e sair) no mestrado, sacrificando o feriadão para ir até a Fiocruz, com o único propósito de me ajudar na compreensão dos artigos da prova. Este, aliás, foi um dos momentos mais emocionantes da minha história na Fiocruz, porque outros colegas que também estudavam para prova juntaram-se a nós. A partir daquele momento, não éramos mais concorrentes, mas amigos com um objetivo comum – passar na prova. Para sair do mestrado também recebi muita ajuda, Ricardo que me ajudou muito no desenho dos cruzamentos e na obtenção dos transgênicos, Rafaela na escrita de vários textos, Gabriel e Michele pela revisão dos textos e incentivo, Canto (Rachel) pelo incentivo e ajuda no texto, Tamara pela ajuda na língua portuguesa, Kiko (Luiz Guilherme) pela ajuda no inglês, Robson que foi um irmão emprestado (com menos juízo), e me ajudou em vários momentos difíceis que passei. Os amigos Ana Karina, Jorge, Samiruda (Samira), Guga (Gustavo), Saori, Denise, Felipe, Lourdinha (Lourdes), Luísa, Lins (Rachel) e Carol pelos papos e momentos de descontração. Meu muito obrigado aos amigos que não citei, mas que também contribuíram para este projeto.

Ao meus orientadores e amigos Alexandre Afranio Peixoto e Antônio Meireles-filho. Alexandre é uma pessoa extremamente competente e com profundo conhecimento sobre o tema desta dissertação, por isso transmite a segurança necessária para realização do trabalho. Também pela cobrança e incentivo, sem ele seria impossível cursar essa pós-graduação. E Antônio, que foi também meu professor, me ensinando os primeiros passos deste projeto.

# Índice

<b>Lista de abreviações:</b> .....	<b>vi</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Genética molecular do relógio circadiano em <i>Drosophila melanogaster</i> .....	3
1.2 Controle neural da atividade locomotora circadiana .....	8
1.3 Genes do relógio circadiano em <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	9
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1 Objetivo geral .....	14
2.2 Objetivos específicos .....	14
<b>3. Material e Métodos</b> .....	<b>15</b>
3.1 Insetos.....	15
3.2 Manutenção dos Insetos.....	15
3.3 Obtenção do duplo mutante <i>Clock<sup>irk</sup></i> e <i>cycle<sup>0</sup></i> .....	17
3.4 Sistema de identificação de mutantes .....	18
3.4 Amplificação do gene <i>cycle</i> de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	21
3.5 Clonagem e análise da seqüência do gene <i>cycle</i> de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	21
3.6 Obtenção de moscas transgênicas carregando gene <i>cycle</i> de flebotomíneos .....	24
3.7 Sistema UAS - GAL4 .....	25
3.8 Atividade Locomotora .....	27
<b>4. Resultados:</b> .....	<b>28</b>
4.1 Obtenção do duplo-mutante <i>Clock<sup>irk</sup></i> e <i>cycle<sup>0</sup></i> .....	28
4.2 Comportamento do duplo mutante <i>Clk<sup>irk</sup></i> e <i>cyc<sup>0</sup></i> .....	28
4.2 Clonagem e sequenciamento da ORF do gene <i>cycle</i> de <i>L. longipalpis</i> .....	33
4.3 Obtenção de moscas transgênicas carregando <i>llcyc</i> .....	34
4.4 Efeito de <i>llcyc</i> em moscas selvagens .....	34
4.5 Efeito de <i>llcyc</i> no mutante nulo <i>Clk<sup>irk</sup></i> em heterozigose .....	39
4.6 Expressão de <i>llcyc</i> no duplo mutante recombinante em heterozigose .....	44
<b>5. Discussão</b> .....	<b>50</b>
5.1 Padrão de atividade locomotora e período endógeno. ....	50
5.2 Atividade noturna versus diurna .....	55
5.3 Startle response e atividade total .....	56
<b>6. Conclusões e Perspectivas</b> .....	<b>58</b>
<b>Referências:</b> .....	<b>60</b>

## Lista de abreviações:

Act - ativador independente do relógio.

AVL - Leishmaniose Visceral Americana.

BCTR - *bmall C-terminal region* (região C-terminal de Bmall).

bHLH – hélice volta hélice.

CK2 – proteína Caseína cinase 2.

*Clk* – mRNA ou gene Clock.

Clk - proteína Clock.

*Clk<sup>irk</sup>* - mRNA ou gene mutante *Clock<sup>irk</sup>*.

Clk<sup>irk</sup> – proteína mutante *Clock<sup>irk</sup>*.

Cry – Criptocromo 1.

CS – Canton S - linhagem selvagem.

Cyc - proteína Cycle.

*cyc<sup>0</sup>* – mutação *cycle<sup>0</sup>*.

Dbt – proteína Doubletime.

DN1- neurônio dorsais 1.

DN2 - neurônio dorsais 2.

DN3 - neurônio dorsais 3 .

*elavgal4* - Gal4 sob o controle do promotor *elav*.

EPM – erro padrão da média.

Gal4 – Ativador transcricional.

h - horas.

Llcy - proteína cycle de *L. longipalpis*

l-LN<sub>v</sub> – grandes neurônios ventro-laterais.

LN<sub>d</sub> - neurônios dorso-laterais.

LPN - neurônio postero-lateral.

n - número de indivíduos testados.

OL - lobo óptico.

ORF - *open reading frame* (fase de leitura aberta).

PAS A – *period Arnt single-minded A*.

PAS B - *period Arnt single-minded B*.

Pb – pares de base.

PDF – *peptide dispersing factor*.

*pdfgal4* – Gal4 sob o controle do promotor *pdf*.

Pdp1ε - *PAR domain protein 1ε*.

Per - proteína Period.

*per*- mRNA ou gene *period*.

*per*<sup>+</sup> - alelo selvagem do gene *period*.

*per*<sup>0</sup> – alelo mutante essencialmente arritmico do gene *period*.

*per*<sup>L</sup> - alelo mutante com período endógeno longo (*long*) do gene *period*.

*per*<sup>S</sup> - alelo mutante com período endógeno curto (*short*) do gene *period*.

poli-Q - repetição de glutaminas.

PP2a – proteína Fosfatase 2A.

Rpm – rotações por minuto.

Sgg – proteína Shaggy.

s-LN<sub>v</sub> - pequenos neurônios ventro-laterais.

*tim* - mRNA ou gene *timeless*.

Tim - proteína Timeless.

*timgal4* - Gal4 sob o controle do promotor *tim*.

TM3Sb – balanceador para o terceiro cromossomo com marcador dominante que confere cerdas curtas.

UAS – *upstream activation site* (sítio de ativação montante).

*uasdmcyc* - *cycle* de *D. melanogaster* controlado pela região UAS.

*uasllcyc* - *cycle* de *L. longipalpis* controlado pela região UAS.

V/P-boxes – sítios alvo de VriIle e Pdp1ε.

Vri - mRNA ou gene *vriIle*.

Vri - proteína *vriIle*.

*w<sup>-</sup>* – gene *white*.

τ – tau.

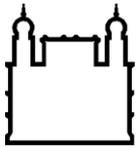
+/*Clk<sup>irk</sup>* - *Clk<sup>irk</sup>* heterozigoto.

+/*cyc<sup>0</sup>* – *cyc<sup>0</sup>* heterozigoto.

+/*cyc<sup>0</sup>*, *Clk<sup>irk</sup>* – duplo mutante heterozigoto.

+/*timgal4* ; +/*uasllcyc*, *Clk<sup>irk</sup>* - *Clk<sup>irk</sup>* heterozigoto, expressando *llcyc* sob o controle de *timgal4*.

+/*timgal4*; +/*uasllcyc*, *Clk<sup>irk</sup>*, *cyc<sup>0</sup>* - duplo mutante heterozigoto, expressando *llcyc* sob o controle de *timgal4*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Análise dos ritmos circadianos de atividade locomotora de drosófilas transgênicas carregando o gene *cycle* do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*.

### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Paulo Roberto de Amoretty

O relógio circadiano, presente em diversos organismos, é um mecanismo que controla ritmos diários na fisiologia e comportamento, os quais são mantidos mesmo na ausência de estímulos externos. Estudos em *Drosophila melanogaster* revelaram genes envolvidos diretamente com este relógio biológico. Tais genes formam alças de autoregulação negativa que promovem a transcrição cíclica de alguns dos seus próprios componentes assim como de outros genes que controlam uma variedade de aspectos fisiológicos e comportamentais. A principal alça regulatória é composta por dois ativadores transcricionais, Clock (Clk) e Cycle (Cyc), que após formarem um heterodímero, promovem a transcrição de *period* (*per*) e *timeless* (*tim*). Por sua vez, as proteínas Period (Per) e Timeless (Tim) também formam dímeros, entram no núcleo e interagem com Clk e Cyc, causando a desestabilização destes ativadores transcricionais e, conseqüentemente, a repressão de suas próprias transcrições.

Nosso grupo tem estudado genes do relógio circadiano em *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da *Leishmania chagasi* (= *Le. infantum*) nas Américas. Comparações entre nossos resultados e o que é conhecido em *D. melanogaster* revelaram diferenças interessantes. Em *D. melanogaster*, a proteína Clk possui uma cauda de ativação formada por um domínio poli-Q, que está ausente no mutante arrítmico *Clk<sup>rk</sup>*. Em *L. longipalpis*, Clk parece não possuir esta cauda de ativação. Contudo, a proteína Cyc deste inseto possui uma região homóloga ao domínio de ativação encontrada em proteínas ortólogas de outros insetos e vertebrados, mas que está ausente na proteína Cyc de *D. melanogaster*. Finalmente, o gene *cyc* é expresso de modo distinto em cada espécie: em *L. longipalpis*, o mRNA de *cyc* oscila quantitativamente ao longo do dia ao passo que, em *D. melanogaster*, apresenta expressão constitutiva.

Uma construção contendo o gene *cyc* de *L. longipalpis* (*llcyc*) foi permanentemente introduzida em *D. melanogaster* utilizando a transformação mediada pelo elemento de transposição "P". Utilizando o sistema UAS-GAL4, analisamos a atividade locomotora de moscas transformadas expressando esta construção em diferentes grupos neuronais e *backgrounds* genéticos de *D. melanogaster*. Embora *L. longipalpis* seja um inseto crepuscular/noturno e *D. melanogaster* diurno, a presença de *llcyc* não tornou as moscas transformadas mais noturnas. Contudo, o padrão de atividade em ciclos de claro-escuro sofreu mudanças e o período endógeno foi reduzido quando expostas à escuridão constante. Os resultados sugerem que a proteína Cyc de *L. longipalpis*, com sua cauda de ativação, interfere no funcionamento do relógio circadiano de *D. melanogaster*.

# INSTITUTO OSWALDO CRUZ

## Analysis of the circadian locomotor activity rhythms of transgenic fruitflies carrying the cycle gene of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*.

### ABSTRACT

The circadian clock, present in several organisms, is a mechanism that controls daily physiological and behavioral rhythms which are maintained even in the absence of external stimuli. Studies on *Drosophila melanogaster* revealed genes directly involved with this biological clock. These genes form negative feedback loops responsible for the cyclic transcription of some of its own components as well as other genes that control a variety of physiological and behavioral aspects. The main feedback loop is composed of two transcriptional activators, Clock (Clk) and Cycle (Cyc), which after heterodimerizing promote the transcription of *period* (*per*) and *timeless* (*tim*) genes. In turn, the Per and Tim proteins also form a heterodimer, enter into the nucleus and interact with Clk and Cyc, causing the destabilization of these transcription activators and, as a consequence, the repression of their own transcription.

Our group has been studying circadian clock genes in *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of *Leishmania chagasi* (= *Le. infantum*) in the Americas. Comparisons between our results and what is known in *D. melanogaster* revealed interesting differences. In *D. melanogaster*, the Clk protein has an activation tail formed by a poly-Q domain, which is absent in the arrhythmic mutant *Clk<sup>Jrk</sup>*. In *L. longipalpis*, Clk does not seem to have this activation tail. However, the Cyc protein in this insect has a region that is homologous to an activation domain found in orthologous proteins from other insects and vertebrates, but absent in the *D. melanogaster* Cyc. Finally, the *cyc* gene is distinctly expressed in each of the species: in *L. longipalpis*, *cyc* mRNA shows a daily oscillation in abundance, while in *D. melanogaster* it is constitutively expressed.

A construct containing the *L. longipalpis cyc* gene (*llcyc*) was permanently introduced into *D. melanogaster* using "P" element mediated transformation. Using the UAS-Gal4 system, we analyzed the locomotor activity of transgenic flies expressing this construct in different *D. melanogaster* neuronal groups and genetic backgrounds. Although *L. longipalpis* is a crepuscular/nocturnal insect and *D. melanogaster* is diurnal, the presence of *llcyc* did not make the transformed flies more nocturnal. However, the activity pattern in light-dark cycles was altered and the endogenous period was reduced in constant darkness. The results suggest that the presence of *L. longipalpis* Cyc protein, with its activation tail, interferes in the functioning of the *D. melanogaster* circadian clock.

# 1. Introdução

O movimento de rotação da terra ocorre aproximadamente a cada 24 horas, submetendo plantas e animais a um previsível ciclo diário de luz e temperatura. Portanto, parece “natural” que os organismos apresentem ritmos diários no metabolismo e comportamento (Moore-Ede *et al.*, 1984).

A explicação mais simples seria de que plantas e animais respondem exclusivamente a ciclos do ambiente. Contudo, quando um organismo é isolado de qualquer indicador de passagem de tempo - por exemplo, luz e temperatura mantidos constantes ao longo do dia - a maioria dos ritmos persiste com um período próximo à 24 horas. A natureza endógena desses ritmos foi demonstrada inicialmente pelo astrônomo Francês Jean Jacques d’Ortous de Mairan, através de experimentos realizados com a planta *Mimosa pudica* (Moore-Ede *et al.*, 1984).

O sistema responsável por manter uma periodicidade endógena e sincronizar os processos internos dos organismos com eventos diários do ambiente externo é conhecido como “relógio circadiano” (latim: *circa*-cerca; *diano*-dia). O relógio funciona como um marcapasso interno, que controla diferentes aspectos do metabolismo e comportamento. Possui três características básicas: sincronia com ambiente externo, persistência em condições ambientais constantes e termo-compensação (Menna-Barreto *et al.*, 2003).

O processo de ajuste dos ritmos biológicos a ciclos ambientais ou do próprio organismo é conhecido como adaptação temporal e permite ao organismo a antecipação, que consiste em organizar recursos e atividades antes que sejam necessários (Pittendrigh, 1960). Uma característica da adaptação temporal é a harmonização das fases do ritmo da espécie com aquelas dos ciclos ambientais. Essa é alcançada através da sincronização ou arrastamento, em que o ritmo gerado pelo oscilador interno, tem sua fase e frequência ajustadas por um ou mais fatores cíclicos do ambiente (Pittendrigh, 1981). Ao fator ambiental que promove o arrastamento dos ritmos biológicos, foi dado o nome de *zeitgeber*, neologismo alemão que significa “doador de tempo” (Aschoff, 1960). Existem diversos fatores capazes de sincronizar o relógio circadiano, entre eles a luz (ciclos de claro e escuro), oscilações diárias na temperatura, disponibilidade de alimentos, interações sociais e diversos outros ciclos ambientais. A importância desses fatores como sincronizadores depende das características da espécie, contudo os ritmos de uma mesma espécie podem ser sincronizados por diferentes *zeitgebers* segundo uma hierarquia (Menna-Barreto *et al.*, 2003).

No entanto, devido ao caráter endógeno da ritmicidade biológica, os ritmos se mantêm mesmo em ambiente constante, ou seja, na ausência de qualquer *zeitgeber*. Em condições controladas de laboratório, quando o organismo está em uma situação na qual são eliminadas oscilações externas, diz-se que o ritmo por ele apresentado está em livre-curso. Nessa condição é possível avaliar o período endógeno, que é representado pela letra grega “ $\tau$ ” (tau). O valor de  $\tau$ , geralmente próximo a 24h, apresenta variações interespecíficas e interindividuais (Daan & Pittendrigh, 1976).

Outra característica marcante do relógio é a compensação térmica. Sabe-se que processos biológicos e reações bioquímicas são sensíveis à temperatura. Desse modo, seria esperado que, sendo o ritmo biológico um desses processos e estando baseado em reações bioquímicas, ele apresentasse reação semelhante. No entanto, ritmos endógenos mostram apenas mudanças sutis quando submetidos a variações de temperatura, desde que as mudanças estejam dentro da faixa permissiva para a espécie. A importância desse mecanismo é manter os organismos sincronizados com o ambiente, independente da variação de temperatura (Menna-Barreto *et al.*, 2003).

O relógio circadiano pode ser decomposto em três componentes principais (Figura 1.1): uma via aferente, representada pelos estímulos externos, ou seja, informações ambientais (*zeitgeber*) que serão transmitidas ao relógio; um ou mais osciladores circadianos capazes de gerar ritmo; e vias eferentes através dos quais o oscilador regula a expressão de diversos ritmos fisiológicos ou comportamentais (Menna-Barreto *et al.*, 2003).

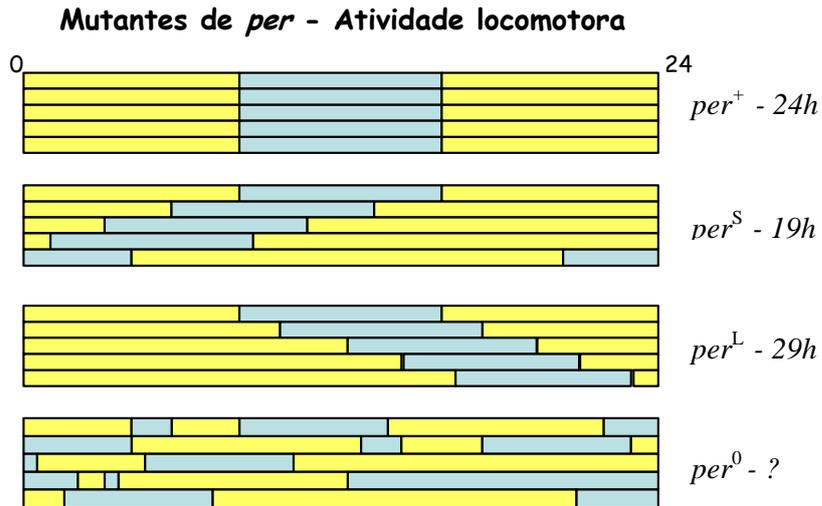
Com o objetivo de melhorar a compreensão do mecanismo do relógio circadiano, diferentes modelos teóricos foram propostos. Alguns deles sugerem a existência de um oscilador único, baseados, de forma geral, na descrição de um processo bioquímico ou molecular, do qual são conhecidos seus elementos integrantes, podendo deduzir-se as equações que regem sua dinâmica (Blanius *et al.*, 1997). Porém, os modelos mais utilizados propõem a existência de dois ou mais osciladores (Pittendrigh, 1960; Petri & Stengel, 2001).



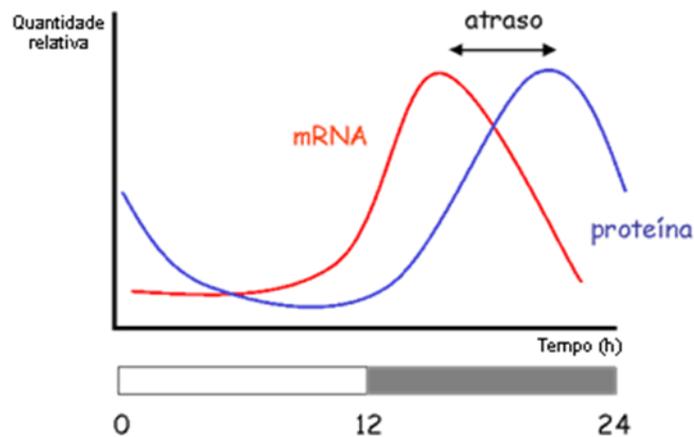
**Figura 1.1.** Modelo simplificado dos componentes do relógio circadiano. A via aferente corresponde aos estímulos externos, que são as informações ambientais (*zeitgeber*) transmitidas ao relógio. O oscilador circadiano pode ser uma célula ou grupo de células, cuja característica funcional é produzir oscilação regular. Na figura, está representado o oscilador central em *D. melanogaster*, que corresponde a um grupo de neurônios capazes de expressar os genes de relógio de forma rítmica. As vias, através das quais, o oscilador regula a expressão de diversos ritmos fisiológicos ou comportamentais são chamadas de eferentes (Menna-Barreto *et al.*, 2003).

### 1.1 Genética molecular do relógio circadiano em *Drosophila melanogaster*

Na espécie-modelo *Drosophila melanogaster*, os aspectos moleculares do funcionamento do relógio circadiano têm sido amplamente estudados e, por isso, têm servido de base para o entendimento do relógio de diversos organismos. Em 1971, Konopka e Benzer demonstraram o controle genético do relógio circadiano de *D. melanogaster*, quando isolaram três mutantes que alteravam os ritmos de emergência do estágio de pupa e os ritmos de atividade locomotora de moscas adultas (Figura 1.2). Estas mutações foram mapeadas em um mesmo locus chamado de *period* (Konopka & Benzer, 1971). Posteriormente este gene foi clonado e sequenciado (Jackson *et al.*, 1986; Citri *et al.*, 1987), e demonstrou-se que tanto seu mRNA quanto sua proteína oscilavam com um período de 24 horas, o que sugeria um mecanismo de auto regulação negativa, havendo no entanto um atraso de algumas horas no pico de expressão da proteína (Hardin *et al.*, 1990) (Figura 1.3).



**Figura 1.2.** Esquema mostrando as diferentes mutações no gene *period*, que conferiam três fenótipos do padrão de atividade locomotora de *Drosophila melanogaster*. Cada linha horizontal corresponde a um dia (24 h). Barras horizontais amarelas representam repouso. Barras horizontais azuis representam atividade. Em *per*<sup>+</sup> (selvagem) as moscas iniciam a atividade aproximadamente no mesmo horário ao longo dos dias, com período endógeno próximo de 24 horas. *per*<sup>S</sup> inicia atividade cinco horas mais cedo a cada dia, apresentando um período de 19h. *per*<sup>L</sup> inicia atividade cinco horas mais tarde ao longo dos dias, apresentando um período de 29h. *per*<sup>0</sup> é essencialmente arritmico. Baseado nos dados de Konopka e Benzer (1971).

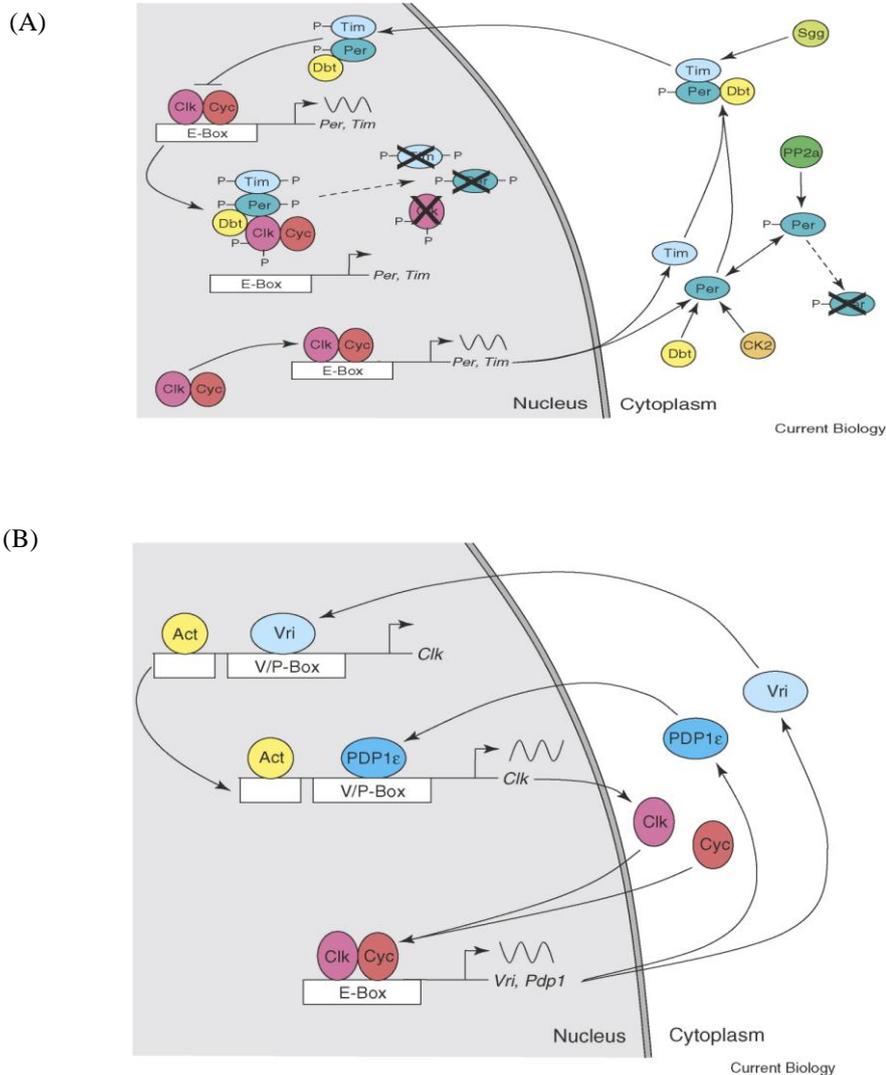


**Figura 1.3.** Ritmo circadiano na abundância do mRNA e proteína de *period*. Linha vermelha, mRNA; linha azul, proteína; barra branca, fotofase; barra preta, escotofase. Modificado de Hardin *et al.*, (1990).

Desde então, diversos outros genes do relógio foram identificados e sabe-se hoje que o controle molecular dos ritmos circadianos em *D. melanogaster* é bastante complexo, sendo constituído por alças regulatórias de transcrição e tradução que são fundamentais para seu o funcionamento (Figura 1.4).

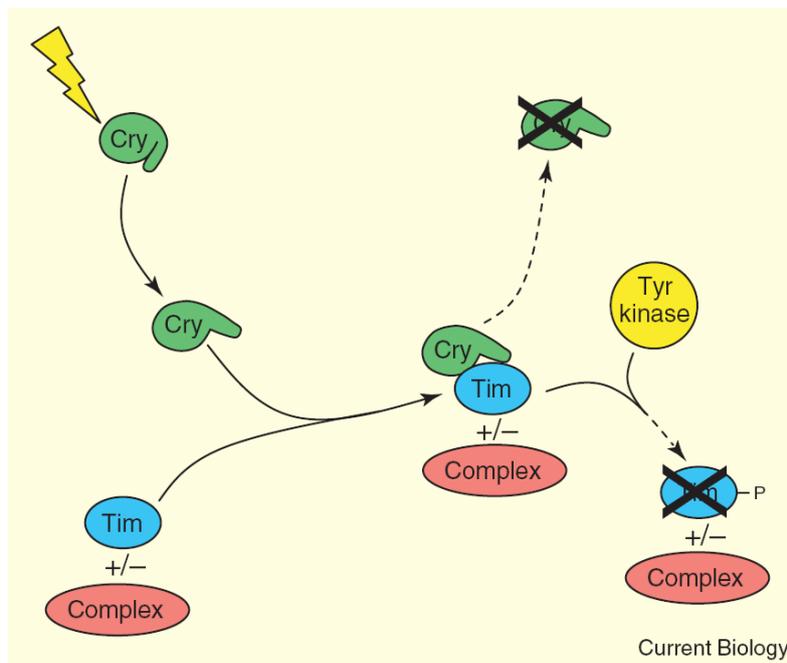
Na alça principal, do meio do dia até o início da noite, os ativadores transcricionais Clock (Clk) e Cycle (Cyc) se ligam à região regulatória *e-box* (CAGGTG) de *period* (*per*) e *timeless* (*tim*), ativando a transcrição desses genes. Os níveis dos transcritos *per* e *tim* atingem o nível máximo no início da noite enquanto o acúmulo dos seus produtos protéicos sofrem um atraso, apresentando um pico apenas no meio da noite. As proteínas Per e Tim formam um heterodímero, entram no núcleo e se ligam a Clk e Cyc, desestabilizando-os e reprimindo, assim, sua própria transcrição. O tempo de ativação e repressão da transcrição de *per* e *tim* é regulado por modificações pós-traducionais de Per, Tim e Clk, realizadas por cinases e fosfatases.

A segunda alça regulatória do relógio controla a transcrição de *Clk* e envolve o repressor *vri* (*vri*) e o ativador *PAR domain protein 1ε* (*Pdp1ε*), ambos ativados por Clk-Cyc. Embora o mRNA de *vri* se acumule em fase com os mRNAs de *per* e *tim*, o acúmulo mRNA de *Pdp1ε* é atrasado em algumas horas. Os níveis da proteína Vri aumentam com os níveis de seu mRNA. Como Vri se acumula no núcleo durante o meio para o fim do dia, ele se liga aos sítios Vri/PDP1ε (V/P-boxes) para reprimir a transcrição de *Clk*. A proteína Vri atinge o nível máximo no início da noite, o que é coincidente com os baixos níveis de *Clk*. Posteriormente Vri é deslocado por PDP1, ativando novamente a transcrição de *Clk*. O gene *cyc* não apresenta oscilação cíclica em seu mRNA (revisões em Hardin, 2005; Dubruille & Emery, 2008).



**Figura 1.4.** Modelo das alças que controlam o relógio circadiano. **(A)** Na alça principal, Clk e Cyc formam um heterodímero e ativam a transcrição de *per* e *tim*. O Per produzido é fosforilado pelas cinases Doubletime (Dbt) and Caseína cinase 2 (CK2), que o leva a degradação. Per fosforilado, ainda ligado a Dbt, é estabilizado pela ligação com Tim. Per também é estabilizado pela Fosfatase 2a (PP2a) que remove fosfatos adicionados a Per. O complexo Per-Tim-Dbt é fosforilado por Shaggy (Sgg), que promove a entrada do complexo no núcleo. Per-Tim-Dbt então se ligam a Clk-Cyc removendo-os do E-box, inibindo assim a transcrição de *per* e *tim*. Per e Clk são então desestabilizados via fosforilação por Dbt e degradados. O acúmulo de Clk hipofosforilado leva a heterodimerização com Cyc e outro ciclo de *per* e *tim* recomeça. **(B)** Na segunda alça, Clk-Cyc ativam a transcrição de *vri* e *pdp1*. Vri se acumula em paralelo com seu mRNA para se ligar ao domínio V/P, e inibir a transcrição de *Clk*. PDP1 se acumula com certo atraso e suplanta Vri do domínio V/P para permitir a transcrição de *Clk*. Um ativador independente do relógio (Act) ativa *Clk* constitutivamente na ausência de Vri. O acúmulo de Clk hipofosforilado leva a heterodimerização com Cyc e outro ciclo de *vri* e *pdp1* recomeça. Linhas sólidas com setas representam passos seqüenciais nas alças; linhas bloqueadas, interação inibitória; linha ondulada, *per* e *tim* mRNA; linha com duas setas, fosforilação reversível; linha pontilhada, degradação via proteossomo; X preto, proteínas degradadas; P, fosforilação protéica; linha dupla, membrana nuclear (Retirado de Hardin, 2005).

O relógio circadiano de *D. melanogaster* é muito sensível à luz. Ciclos de claro e escuro (LD) com intensidades luminosas de 0,03 lux, correspondente às fases lunares quarto minguante e crescente, podem sincronizar a atividade circadiana (Bachleitner, 2007). Em *D. melanogaster*, o fotoreceptor intracelular CRY é capaz de mediar a resposta à luz, e, dessa forma, sincronizar o relógio circadiano em muitos tecidos da mosca, inclusive nos neurônios que controlam comportamento locomotor (Emery *et al.*, 1998, 2000; Stanewsky *et al.*, 1998). A luz induz uma mudança conformacional em CRY, permitindo que ele se associe a TIM. Uma vez associados, TIM é fosforilado e levado à degradação via proteossomo. A degradação de TIM expõe PER à fosforilação e à subsequente degradação, também via proteossomo, resultando na sincronização do marcapasso circadiano (Lin *et al.*, 2001; revisado por Dubruille & Emery, 2008) (Figura 1.5).



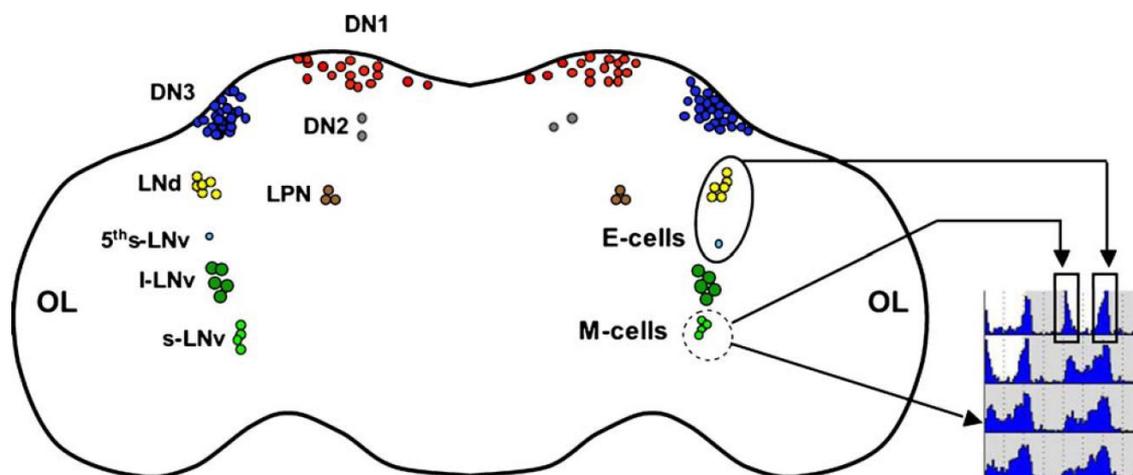
**Figura 1.5.** Modelo de ajuste do relógio circadiano de *D. melanogaster* pela luz. A luz induz uma mudança conformacional na proteína Cry, permitindo sua ligação com Tim. Cry se liga tanto a Tim livre quanto ligado ao complexo Tim-Per-Dbt no citoplasma ou ao complexo nuclear Tim-Per-Dbt-Clk-Cyc, e promove a fosforilação de Tim por uma tirosina cinase. Tim fosforilado é levado rapidamente para a degradação via proteossomo. A prolongada exposição à luz leva a eventual degradação de Cry no proteossomo. Linhas sólidas com setas indicam passos sequenciais em uma via dependente de luz; linhas pontilhadas, degradação via proteossomo; X preto, proteínas degradadas; P, fosforilação protéica (Retirado de Hardin, 2005).

## 1.2 Controle neural da atividade locomotora circadiana

Em *D. melanogaster*, foram identificados os grupos de neurônios que expressam genes do relógio e, por isso, candidatos a controlar os ritmos circadianos de atividade locomotora. Esses neurônios foram nomeados de acordo com sua localização anatômica e divididos em seis grupos maiores: os neurônios ventro-laterais (LN<sub>v</sub> - *lateral neurons ventral*), os neurônios dorso-laterais (LN<sub>d</sub> - *dorsal lateral neurons*), três grupos de neurônios dorsais (DN1, DN2, DN3 - *dorsal neurons*), e os neurônios postero-laterais (Figura 1.6) (revisado por Dubruille & Emery, 2008).

De acordo com o tamanho e os genes que expressam, os LN<sub>v</sub> podem ser divididos em três subgrupos. Quatro pequenos LN<sub>v</sub> (s-LN<sub>v</sub> - *small lateral neurons ventral*), quatro a cinco grandes LN<sub>v</sub> (l-LN<sub>v</sub> - *large lateral neurons ventral*) que expressam o neuropeptídeo PDF (*pigment-dispersing factor*) que é importante na comunicação entre alguns neurônios circadianos (Helfrich-Foster & Homberg, 1993; Park et al., 2000), e um único neurônio adicional que expressa *Per* e não expressa PDF, adjacente a LN<sub>v</sub> (Kaneko & Hall, 2000). Este neurônio está presente em cérebro de larvas junto ao s-LN<sub>v</sub> positivo para PDF e desta forma é chamado de “quinto s-LN<sub>v</sub>” (Kaneko, 1998). Os outros grupos de neurônios não expressam PDF (Helfrich-Foster, 2005).

Os LN<sub>d</sub> formam um grupo de seis células de tamanhos diferentes e somente três a quatro deles expressam níveis detectáveis do fotoreceptor Cry (Rieger et al., 2006; Picot et al., 2007; Yoshii et al., 2008). Os s-LN<sub>v</sub> são freqüentemente chamados de células M (*morning cells*), porque são necessários para o pico de atividade locomotora da manhã, quando moscas são submetidas a ciclos de claro (fotofase) e escuro (escotofase) (LD - *light-dark*). Eles também são necessários para o livre-curso do ritmo de atividade locomotora em escuro constante (DD - *dark-dark*). Os “quintos s-LN<sub>v</sub>” e os LN<sub>d</sub> são responsáveis por gerar a atividade noturna em LD e dessa forma são chamados de células E (*evening cells*) (Figura 1.6) (revisado por Dubruille & Emery, 2008).



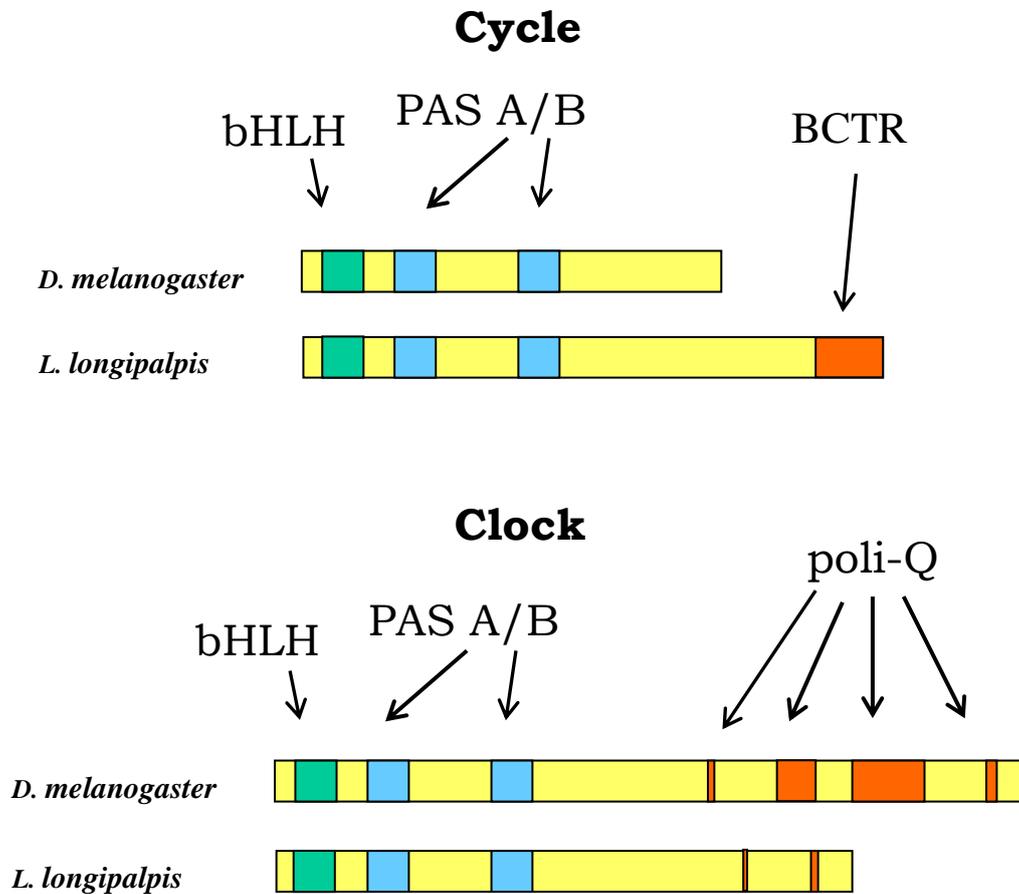
**Figura 1.6.** Esquema dos neurônios circadianos no cérebro de *D. melanogaster*. Os pequenos (s-LN<sub>v</sub>) e os grandes (l-LN<sub>v</sub>) neurônios ventro-laterais expressam PDF. O quinto s-LN<sub>v</sub>, os neurônios dorso-laterais (LN<sub>d</sub>), o postero-lateral (LPN), e o grupo de três neurônios dorsais (DN1, DN2 e DN3) não expressam PDF. Os s-LN<sub>v</sub> são frequentemente chamados de células M (*morning cells*). Os quintos s-LN<sub>v</sub> e os LN<sub>d</sub> são chamados de células E (*evening cells*). OL (lobo óptico). Retirado de Dubruille & Emery, 2008.

### 1.3 Genes do relógio circadiano em *Lutzomyia longipalpis*

O flebotomíneo *L. longipalpis* é o principal vetor da Leishmaniose Visceral Americana (AVL) (Soares & Turco, 2003; Lainson & Rangel, 2005). Compreender as bases moleculares do comportamento circadiano de *L. longipalpis* pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias alternativas de controle deste importante vetor.

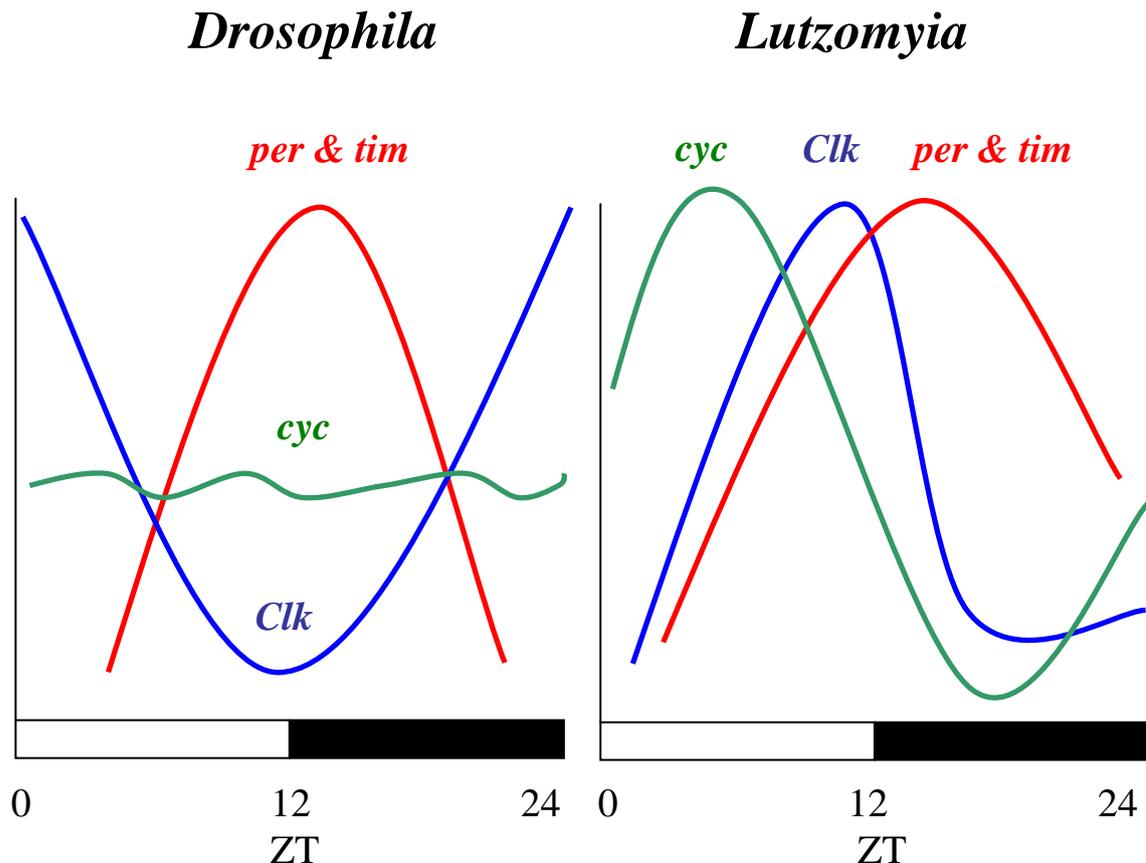
Embora o cerne do relógio circadiano seja bastante conservado entre diferentes espécies de insetos (revisado por Sandreli *et al.*, 2008), existem algumas diferenças interessantes entre *D. melanogaster* e *L. longipalpis*. A proteína Clk de *D. melanogaster* possui o domínio bHLH de ligação ao DNA, os domínios de interação entre proteínas PAS A e B, e uma repetição de glutaminas (poli-Q) na região C terminal responsável pela ativação transcricional (Allada *et al.*, 1998). O seu homólogo em *L. longipalpis* apresenta os domínios bHLH e PAS muito conservados entre as duas espécies, contudo, a região de transativação encontra-se bastante reduzida (Gesto, 2006) (Figura 1.7). Por outro lado, a proteína Cyc de *L. longipalpis* possui uma região de ativação chamada de BCTR, encontrada também nos seus

ortólogos em mamíferos, e alguns outros insetos (Meirelles-Filho *et al.*, 2006a; Sandrelli *et al.*, 2008), mas que foi perdida em *D. melanogaster* (Rutila *et al.*, 1998) (Figura 1.7).



**Figura 1.7.** Diagrama comparativo dos domínios funcionais presentes nas proteínas Clock e Cycle de *D. melanogaster* e *L. longipalpis*. As proteínas Cycle e Clock de *D. melanogaster* e *L. longipalpis* compartilham os grupamentos bHLH (ligação ao DNA), PAS-A e PAS-B (interação entre proteínas) sendo muito conservados entre as duas espécies. Entretanto somente em Cyc de *L. longipalpis* está presente o domínio de transativação BCTR (*bmall C-terminal region*, região C-terminal de Bmall, proteína ortóloga de Cyc em mamíferos). Em *D. melanogaster* o domínio de ativação está presente em Clk, e é formado por uma grande repetição de glutaminas (poli-Q).

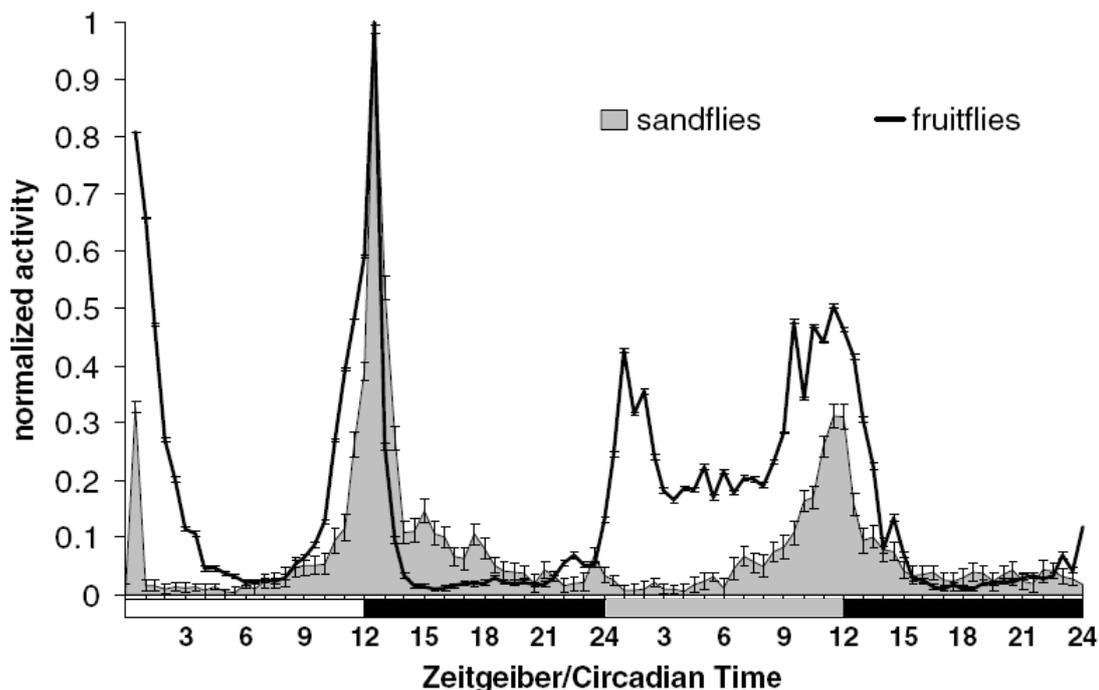
Existem também diferenças marcantes na expressão dos genes de relógio entre esses dois insetos. Enquanto *per* e *tim* de *L. longipalpis* ciclam como em *D. melanogaster*, com pico de abundância no início da noite, o nível máximo de *Clock* de *L. longipalpis* ocorre em anti-fase ao de *D. melanogaster* (So & Rosbash, 1997; Goto & Denlinger, 2002; Meirelles-Filho *et al.*, 2006b). Além disso, os níveis de *cycle* de *D. melanogaster* mantêm-se constitutivo e, em *L. longipalpis*, os níveis ciclam, sendo mais abundante no meio do dia (Hall, 2003; Meirelles-Filho *et al.*, 2006a) (Figura 1.8).



**Figura 1.8.** Esquema da expressão dos genes centrais do relógio circadiano em *Drosophila melanogaster* e *Lutzomyia longipalpis*. Barras horizontais brancas representam a fotofase (fase clara), barras pretas representam a escotofase (fase escura). Enquanto *per* e *tim* de *L. longipalpis* ciclam como em *D. melanogaster*, com pico de abundância em torno do início da noite, o nível máximo de *Clock* de *L. longipalpis* ocorre em anti-fase ao de *D. melanogaster*. Além disso, os níveis de *cycle* de *D. melanogaster* se mantêm constitutivo, e em *L. longipalpis* os níveis ciclam, sendo mais abundante no meio do dia.

Além das diferenças ao nível molecular entre os relógios circadianos de *D. melanogaster* e *L. longipalpis*, existem diferenças também no comportamento. Em condições controladas no laboratório, *D. melanogaster* apresenta um padrão bimodal diurno em ciclos de claro-escuro (LD 12:12) enquanto que, nas mesmas condições, *L. longipalpis* apresenta um

padrão de atividade locomotora essencialmente unimodal, com pico no horário correspondente ao crepúsculo e mais atividade noturna (Figura 1.9). No primeiro dia em escuro constante (DD) esta diferença entre as duas espécies se mantém, com *D. melanogaster* apresentando muito mais atividade no “dia subjetivo” (horário em que as luzes estariam ligadas) do que *L. longipalpis* (Meireles-Filho *et al.*, 2006b).



**Figura 1.9.** Perfil de atividade locomotora de *L. longipalpis* comparado com o de *D. melanogaster*. O gráfico mostra a atividade normalizada durante um dia de LD 12:12 seguido de um dia de DD. Barras representam erro padrão. Barra horizontal branca representa o dia, barra horizontal cinza representa o “dia subjetivo”, barras horizontais pretas representam a noite e “noite subjetiva”. Fonte: Meireles-Filho *et al.*, 2006b.

Nesse projeto foram investigados aspectos relacionados a conservação funcional entre as proteínas *Cyc* de *D. melanogaster* e *L. longipalpis*. Para isso, foram utilizadas *D. melanogaster* transformadas com o gene *cycle* de *L. longipalpis* (*llcyc*). O ritmo de atividade locomotora foi avaliado, em presença das mutações *cyc*<sup>0</sup> ou *Clk*<sup>irk</sup>, e também em situações onde as duas mutações estavam presentes simultaneamente, o que foi possível após a geração do duplo mutante *cyc*<sup>0</sup>, *Clk*<sup>irk</sup>. Essas mutações são pontuais, *cyc*<sup>0</sup> leva a um códon de terminação prematuro, originando uma proteína truncada e não funcional (Rutila *et al.*, 1998). A mutação *Clk*<sup>irk</sup> causa um códon de terminação na região que codifica o domínio de ativação da proteína, com isso a repetição de glutaminas (poli-Q) não se forma (Allada *et al.*, 1998).

Em ambos os casos, as moscas se tornam arrítmicas (Rutila *et al.*, 1998; Allada *et al.*, 1998). A sequência de *llcyc* mostrou grande homologia com *cyc* de *D. melanogaster*, além disso, este gene codifica o domínio de ativação (BCTR) na região C terminal, por esse motivo, é possível que a expressão de *llcyc*, controlada pelo sistema bipartido UAS-GAL4 (Brand & Perrimon, 1993), pudesse recuperar os mutantes arrítmicos. Além disso, uma vez que o padrão de atividade locomotora de *D. melanogaster* é bimodal/diurna e, o de *L. longipalpis* é unimodal/noturno, essa abordagem nos permite avaliar também, se o gene de *L. longipalpis* poderia trazer em sua estrutura, alguma informação espécie-específica em relação ao comportamento circadiano.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Estudar os aspectos evolutivos e funcionais das proteínas Cyc de *Lutzomyia longipalpis* e *Drosophila melanogaster*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Analisar o comportamento do duplo mutante *cycle*<sup>0</sup> e *Clock*<sup>jr<sup>k</sup></sup>.
- Avaliar o efeito da expressão do gene *cyc* de *L. longipalpis* em *D. melanogaster*, em diferentes grupos neuronais e *backgrounds* genéticos, através do sistema UAS-GAL4.
- Investigar se o gene *cyc* de *L. longipalpis* poderia trazer em sua estrutura, alguma informação espécie-específica em relação ao comportamento circadiano.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Insetos

Os espécimes de *Lutzomyia longipalpis* utilizados neste projeto foram provenientes de colônia iniciada com insetos da Gruta da Lapinha, localizada no município de Lagoa Santa, Minas Gerais. Esse material foi cedido pela Dra. Nataly Araújo de Souza (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ).

As linhagens de *Drosophila melanogaster*: Canton S (selvagem), *cycle*<sup>0</sup> (mutante arritmico), *Clock*<sup>irk</sup> (mutante arritmico) e *timgal4/CYO* (ativador transcricional GAL4 sob o controle do promotor do gene *timeless*) foram doadas pelo Dr. Charalambos Kyriacou (Departamento de Genética, Universidade de Leicester, Reino Unido). A estirpe *uasdmcyc* (*cyc* de *D. melanogaster* controlado pela região alvo de GAL4:UAS) foi disponibilizada pelo Dr. Paul Hardin (Departamento de Biologia e Centro de Pesquisa do Relógio Biológico, Universidade Texas A&M, EUA).

As linhagens *uasllcyc* (*cyc* de *L. longipalpis* controlado pela região alvo de GAL4:UAS) e duplo mutante arritmico [*cycle*<sup>0</sup>, *Clock*<sup>irk</sup>] foram geradas durante a realização deste projeto.

#### 3.2 Manutenção dos Insetos

As moscas foram mantidas em tubos ou garrafas de vidro, contendo meio de cultura próprio para *D. melanogaster* feito a base de aveia. Em intervalos de quinze dias as moscas eram transferidas para tubos ou garrafas novos. O meio de cultura a base de aveia foi feito da seguinte forma:

1-Misturar:

- Bacto agar 18,28g
- Extrato de levedura 52g
- Aveia 65g
- Melado 128,8mL
- Água destilada 1752,0mL

2-Cozinhar por aproximadamente 10 minutos.

3-Esfriar no banho maria 60°C.

4-Adicionar 27,6mL de fungicida 10% (Nipagin® - Pharma Special).

5-Adicionar 10mL de ácido propiônico.

Alternativamente, quando se desejava manter estoques por período mais longos, em torno de 30 dias sem efetuar trocas, era utilizado o meio a base de farinha de milho (fubá).

Modo de preparo:

1-Misturar em três litros de água:

- Açúcar 140g;
- Bacto agar 35g;
- Fermento seco 35g.

2-Ferver.

3-Adicionar 233g de fubá.

4-Cozinhar por 10 minutos.

5-Esfriar a 60°C.

6-Adicionar 22,4mL de fungicida 10% (Nipagin® - Pharma Special).

7-Adicionar 15,75mL de ácido propiônico P.A.

8-Diluir em 500mL de água a temperatura ambiente e misturar bem.

Para efetuar a coleta de embriões de *D. melanogaster*, foi utilizado o meio de oviposição, feito com suco de uva, devido a sua coloração vermelha facilitava a visualização dos embriões. Pode ser preparado da seguinte forma:

1-Misturar:

- Água destilada: 270,0mL;
- Suco de uva (integral): 177,5mL;
- Agar: 12,6g.

2-Levar ao fogo ou microondas até ferver.

3-Deixar esfriar até 60°C

4-Adicionar:

- Etanol absoluto: 3,72mL;
- Ácido acético: 3,60mL.

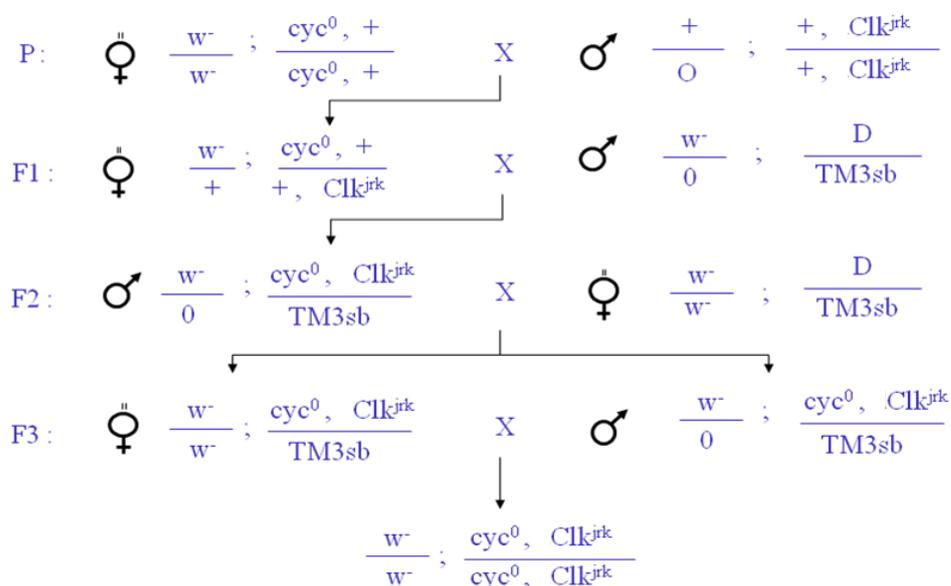
### 3.3 Obtenção do duplo mutante *Clock<sup>irk</sup>* e *cycle<sup>0</sup>*

Para gerar o duplo mutante [*Clock<sup>irk</sup>*, *cycle<sup>0</sup>*] foram realizados cruzamentos entre estirpes mutantes simples (*cyc<sup>0</sup>* e *Clock<sup>irk</sup>*) já disponíveis no laboratório (Figura 3.1). A técnica envolveu o uso de cromossomos balanceadores que, por possuírem inúmeras inversões sobrepostas, impedem a recombinação homóloga, além de estarem marcados com mutações visíveis que permitem rastreá-los durante os cruzamentos.

Os genes *cycle* e *Clock* de *D. melanogaster* localizam-se no braço esquerdo do cromossomo 3, nas posições 76C6 e 66A12, respectivamente ([www.flybase.net](http://www.flybase.net)). A distância entre eles é de 10 unidades de mapa (u.m.) ou centimorgan (cM), resultando em uma frequência de recombinação de 0,10. Por situarem-se no mesmo par cromossômico, precisaríamos acompanhar um evento de recombinação entre eles.

Desta forma, as fêmeas nascidas do primeiro cruzamento eram coletadas, pois carregavam as células germinativas que sofreriam a recombinação, e os machos eram descartados, por não sofrerem recombinação homóloga. Para impedir novas recombinações, as fêmeas coletadas foram cruzadas com uma estirpe que possuía o balanceador TM3Sb, para o cromossomo 3. Os machos nascidos deste cruzamento foram coletados e cruzados novamente com a estirpe que continha o balanceador. Finalmente, as moscas nascidas deste cruzamento foram endocruzadas para que fosse retirado o TM3Sb e linhagens homozigotas fossem estabelecidas. Os recombinantes foram identificados por digestão enzimática de produtos de PCR, como explicado a seguir.

## Cruzamentos



**Figura 3.1.** Esquema dos cruzamentos para obtenção do duplo mutante.  $w^-$  corresponde a mutação *white* (olho branco);  $cyc^0$  mutação *cycle*;  $Clk^{jrk}$  mutação *Clock<sup>jrk</sup>*; D mutante *Dichaete* (asa aberta); TM3Sb balanceador para o cromossomo 3 com marcador visível *Stubble* (cerdas dorsais curtas).

### 3.4 Sistema de identificação de mutantes

Inicialmente, o DNA era extraído pelo método rápido de Jowett (Roberts, 1998). A amplificação de uma região do genoma da mosca contendo o sítio da mutação ( $Clk^{jrk}$  ou  $cyc^0$ ) era feita por PCR, e posteriormente, o produto era digerido com enzimas de restrição. Para a PCR os seguintes pares de iniciadores foram utilizados:

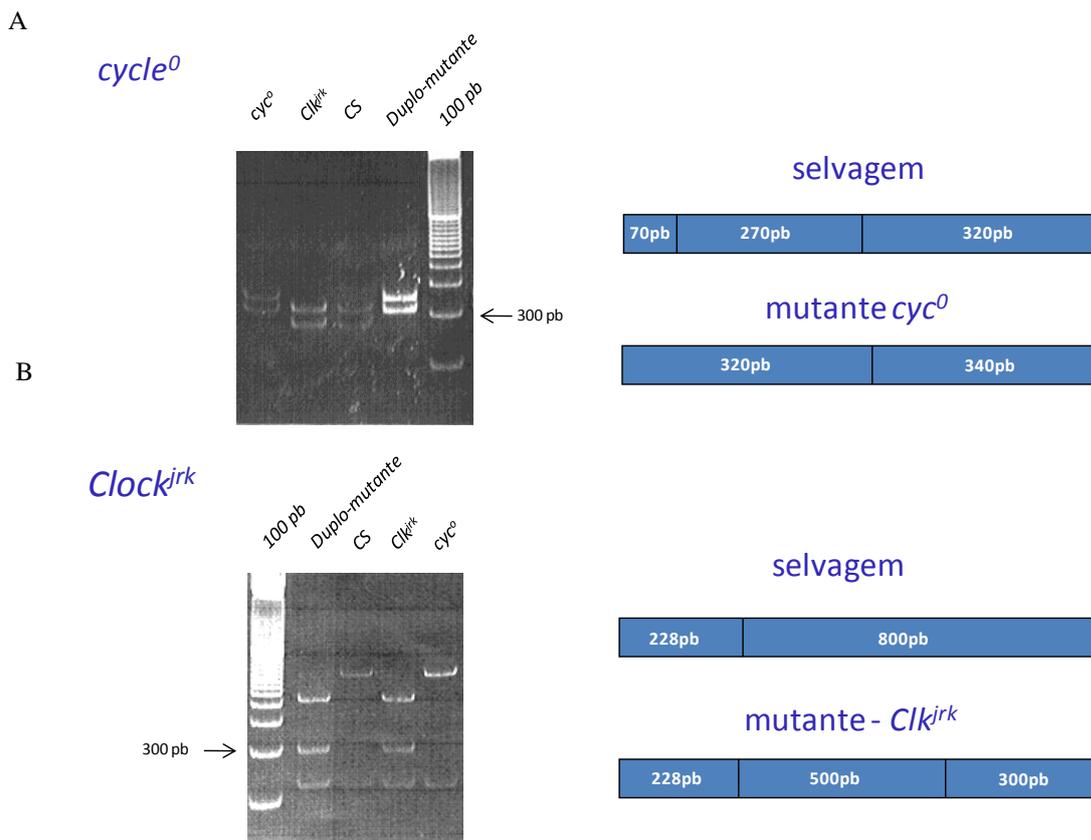
- 5'CLK-BFA                      5'CGAGAACACCATCGAGAAAA3'
- 3'CLK-BFA                      5'CTGCCTCCATTGTAGCTTTG3'
- 5'CYC-HPY188I                5'GGTGTCCAGTGTGCTGAACA3'
- 3'CYC-HPY188I                5'ATCGTACCTACCGCTGGTCT3'

A reação de amplificação foi realizada em volume final de 20  $\mu$ l contendo: 2,0  $\mu$ l de tampão (10X), 0,8  $\mu$ l de  $MgCl_2$  (50 mM), 0,08  $\mu$ l de dNTPs (25 mM) e 0,4  $\mu$ l de TTH 1 U/ $\mu$ l (Biotools). As amostras foram acondicionadas em um termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) e submetidas as seguintes condições: 94°C por 5 minutos; 35

ciclos de 94°C por 30 segundos, 60,6°C por 30 segundos e 72°C por 1,5 minutos. Ao final da reação as amostras eram armazenadas a -20°C.

Os fragmentos amplificados foram digeridos separadamente com as enzimas Hpy188I (concentração inicial: 10 U/μl) e BfaI (concentração inicial: 5 U/μl) (New England BioLabs), para *cyc<sup>0</sup>* e *Clk<sup>jk</sup>*, respectivamente. As reações de digestão foram preparadas em volume final de 20 μl, que continham: 10 μl do produto da PCR purificado, 1 μl de enzima de restrição, 2 μl de tampão 10X e 7 μl de água milli-Q. Os tubos foram acondicionados em banho-maria à 37°C onde permaneceram por um período de três horas. Os perfis eletroforéticos dos produtos das digestões foram analisados em gel de agarose 3% (USB) ou em gel de poliacrilamida 12% (1,0 mL de TBE 10X; 4,0 mL de acrilamida:Bis-acrilamida 29:1 (Bio rad); 70 μl de APS 10%; 6,0 μl de Temed (GiBco BRL). Tanto o gel de agarose quanto o de poliacrilamida foram corados com brometo de etídio, na concentração final de 0,5 μg/mL. Apenas no gel de agarose o corante fazia parte da composição, o de poliacrilamida foi corado após a eletroforese.

A clivagem do produto da PCR com HPY188I gera duas bandas para moscas homozigotas para a mutação *cyc<sup>0</sup>*: uma de 320 pb e outra de 340 pb. Em moscas selvagens, esse mesmo procedimento gera três bandas: uma de 320 pb, uma de 270 pb e uma terceira banda de 70 pb (Figura 3.2A). Por outro lado, a digestão do produto de PCR com BFAI gera três bandas para moscas homozigotas para a mutação *Clk<sup>jk</sup>*: uma de 500 pb, uma de 300 pb e uma de 228 pb. Em moscas que não carregavam a mutação, foi obtido um padrão de duas bandas: uma de 800 pb e uma de 228 pb (Figura 3.2B).



**Figura 3.2.** Gel de poliacrilamida 12% para identificação das mutações *cyc<sup>0</sup>* e *Clk<sup>irk</sup>*. **(A)** Digestão de produto da PCR com HPY188I, gerando para o mutante *cyc<sup>0</sup>* duas bandas, uma com 320 pb e outra com 340 pb. Para moscas que não carregavam a mutação o padrão obtido foi de uma banda de 320 pb, uma de 270 pb e uma terceira banda de 70pb (não é visível nessa foto). **(B)** Digestão de produto da PCR com BFAI, gerando para o mutante *Clk<sup>irk</sup>* uma banda de 500pb, uma de 300pb e uma de 228pb. Para moscas que não carregavam a mutação o padrão obtido foi de uma banda de 800pb e uma de 228pb.

### 3.4 Amplificação do gene *cyc* de *Lutzomyia longipalpis*

A sequência do gene *cyc* de *L. longipalpis* (*llcyc*) foi obtida através do GenBank, número de acesso DQ841151 (Meireles-Filho *et al.*, 2006a). A partir dela, foram desenhados iniciadores específicos com o auxílio do programa “Primer Premier” (*PREMIER Biosoft International*), para amplificar a região codificante de *llcyc* com aproximadamente 2000 pares de bases através da técnica da PCR. A esses iniciadores foram acrescentadas seqüências de sítios alvo de enzimas de restrição, destacados entre colchetes (XbaI - 3'11CYC 5'TTT[TCTAGA]TTATGGAAGTGGCCATGGGA3' e NotI - 5'11CYC2 5'TTT[GCGGCCGC]ACATGGCCAGAGGACATCAGAGG3'), para facilitar a posterior clonagem no vetor pUAST.

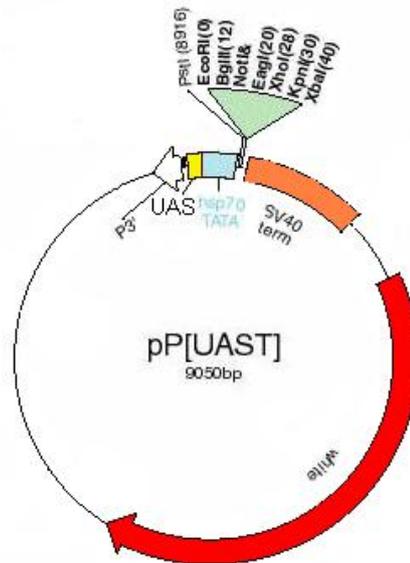
O mRNA foi extraído com o QuickPrep™ Micro mRNA Purification kit (Amersham Biosciences), realizado a partir de um pool de *L. longipalpis*. A síntese do cDNA foi feita utilizando-se para isso uma transcriptase reversa, de acordo com o protocolo do kit *First Strand cDNA Synthesis* (Amersham Bioscience), usando iniciador oligo-dT. Esse material foi usado como molde para a amplificação da região codificante do gene *cyc* de aproximadamente 2000 pb com o kit *Expand High Fidelity System* (Roche). Conforme sugestão do protocolo do fabricante, foram utilizadas as seguintes concentrações: dNTPs, 200µM; iniciadores 300µM; tampão 1x; MgCl<sub>2</sub> 1,5µM; *Expand High Fidelity Enzyme Mix* 2,6 U e 3µl de cDNA (concentração não determinada). As amostras foram devidamente acondicionadas em um termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) e submetidas as seguintes condições: 94°C por 4 minutos; 10 ciclos de 94°C por 15 segundos, 66°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 15 segundos, 66°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos (com acréscimo de 5 segundos a cada ciclo); 72°C por 7 minutos. Ao final da reação as amostras eram armazenadas a -20°C.

### 3.5 Clonagem e análise da seqüência do gene *cyc* de *Lutzomyia longipalpis*

O fragmento amplificado com a técnica de PCR foi excisado do gel de agarose 1% após corrida eletroforética, e então purificado com o *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Bioscience), de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento foi ligado no vetor pCR® Blunt que integra o *Zero Blunt® PCR Cloning Kit* (Invitrogen; seguindo instruções do fabricante), a fim de aumentar a quantidade de DNA para a etapa de ligação no vetor de transformação pUAST (Figura 3.3). As ligações foram transformadas em células competentes de *Escherichia coli* DH5-α segundo Sambrook



PDTIS-FIOCRUZ. As seqüências geradas foram analisadas no programa Bioedit versão 7.0.5 (Hall, Ibis Therapeutics) disponível no site <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>.

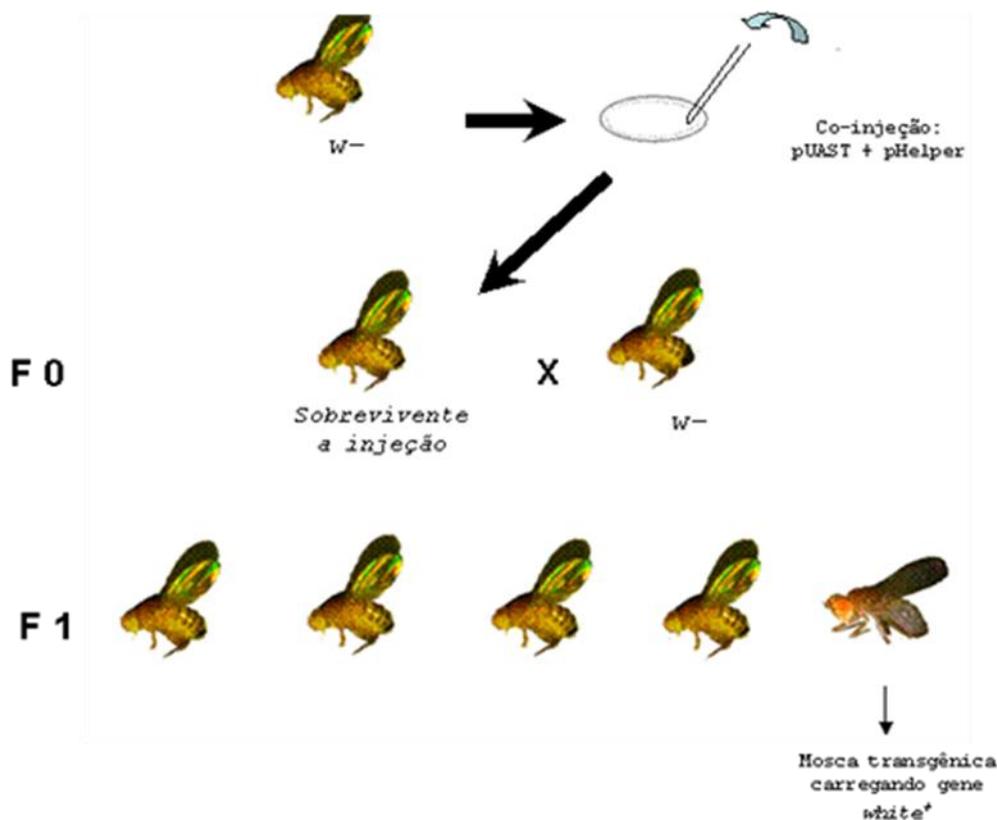


**Figura 3.3.** Plasmídeo de transformação pUAST. Em vermelho, o mini gene *white*, um marcador dominante para inserção, conferindo coloração vermelha às moscas mutantes *w<sup>-</sup>* que carregam a construção. As extremidades das setas indicam o sítio de clivagem da “*transposase P*”. Em amarelo, a região alvo de GAL4 - UAS. As regiões regulatórias hsp70 TATA e SV40 estão representadas em azul e laranja respectivamente. Em verde, o *polylinker* com o sítio de inserção do gene de interesse (modificado de Ashburner, 2005).

### 3.6 Obtenção de moscas transgênicas carregando gene *cycle* de flebotomíneos

Inicialmente, as moscas foram acondicionadas em potes, que eram fechados com placas de Petri (60 mm de diâmetro e 10 mm de altura), contendo meio de oviposição. Esse meio tem a cor vermelha e contrasta com os ovos, que são brancos, facilitando sua visualização. As moscas permaneceram nesses recipientes em uma sala com temperatura ajustada para 18°C, por 40 minutos, quando então a placa contendo meio de oviposição era trocada por uma nova. A placa retirada foi lavada com Triton X-100 diluído em água (0,02%) e, com o auxílio de um pincel, os ovos eram delicadamente soltos do meio. O líquido foi coado em uma rede com malha de 0,1 mm e os ovos retidos, lavados com água destilada. O excesso de líquido foi escorrido em papel absorvente e os ovos mergulhados em hipoclorito de sódio 50% por dois minutos, para retirada do córion. Em seguida os ovos foram imediatamente lavados com água destilada e alinhados em uma lâmina de microscopia, permanecendo aderidos à ela por uma fita dupla face (ADELBRAS®). Para evitar vazamento de conteúdo citoplasmático dos embriões quando fossem perfurados pela agulha de injeção, os mesmos eram ligeiramente dessecados inserindo-se a lâmina que os continha por 2 minutos em uma placa de Petri (100 mm de diâmetro e 15 mm de altura) contendo sílica. Finalmente, os embriões foram cobertos de Halocarbono Óleo 700 (SIGMA) e, levados a um microscópio invertido, que por sua vez estava acoplado ao sistema de microinjeção *InjectMan*® NI 2 (Eppendorf).

O DNA foi injetado na região posterior dos embriões, local onde ocorre o desenvolvimento das gônadas, a fim de que a construção contendo *llcyc* fosse inserida de forma estável nas células germinativas. O plasmídeo pUAST, contendo o mini gene *White* (marcador dominante) e a construção, foi então injetado no embrião na concentração de 500 ng/μl, junto a outro plasmídeo (pHELPER, que codifica a transposase) na concentração de 50 ng/μl (Figura 3.4). As moscas que sobreviviam a injeção, eram cruzadas com estirpes mutantes para o gene *white* (*w*<sup>-</sup>), mutação que confere olho branco. Após o cruzamento, os indivíduos que carregavam o transgene eram identificados pela cor vermelha dos olhos, conferida pela expressão do marcador contido no vetor pUAST. Após a identificação dos transgênicos, foram realizados retrocruzamentos para que fossem estabelecidas linhagens homozigotas no laboratório.



**Figura 3.4.** Esquema de microinjeção realizada em embriões de *D. melanogaster*. Foi co-injetado o plasmídeo pUAST contendo *llcyc* e o plasmídeo pHelper que codifica a transposase P. As moscas que sobreviveram a injeção foram cruzadas com outras de uma estirpe mutante para cor de olho (*white-w<sup>-</sup>*). Após o cruzamento, foi possível identificar as moscas que carregavam o transgene pela expressão do marcador dominante - mini gene *White* - contido no vetor pUAST.

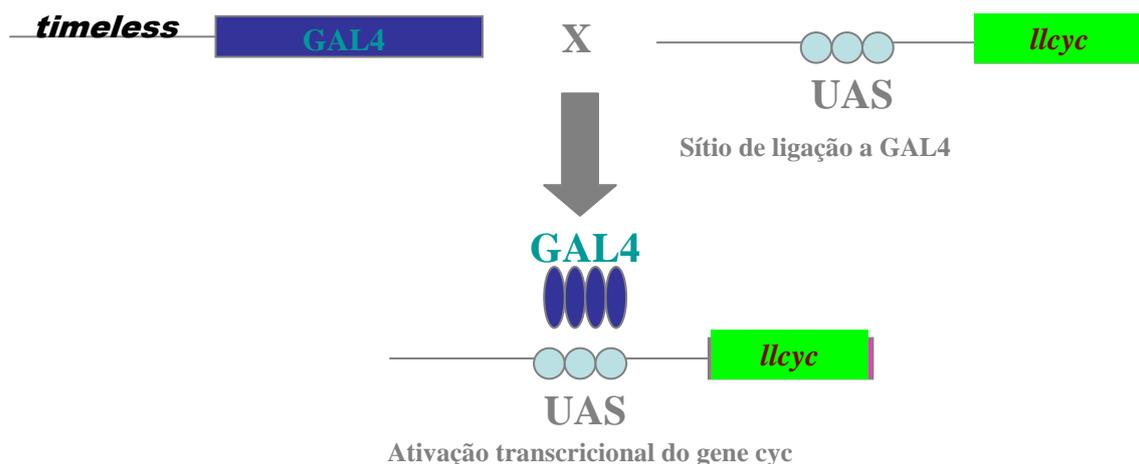
### 3.7 Sistema UAS - GAL4

O sistema UAS-GAL4 é um sistema binário que consiste basicamente de um ativador transcricional (GAL4) dirigido pelo promotor de escolha, e uma seqüência alvo de GAL4 chamada de UAS controlando a expressão do gene de interesse (Brand & Perrimon, 1993).

Gal4 codifica uma proteína de 881 aminoácidos, identificados em leveduras *Sacharomyces cerevisiae* como um regulador de genes (GAL10 e GAL1, por exemplo), induzido por galactose (Laughton *et al.*, 1984; Laughton & Gesteland, 1984; Oshima, 1982). Gal4 regula a transcrição de GAL10 e GAL1 por se ligar diretamente aos quatro sítios de 17 pb localizados entre esses loci (Giniger *et al.*, 1985). Esses sítios definem o elemento UAS, que é essencial para a ativação transcricional desses genes regulados por GAL4 (Duffy, 2002).

No sistema bipartido UAS-GAL4, a expressão do gene de interesse fica sob o controle da seqüência-alvo UAS que, na ausência de GAL4, não será expresso. Para ativar sua transcrição, é necessário cruzar as moscas que carregam a construção (*uas-gene de interesse*) com outras que expressam GAL4 em um padrão particular, determinado pelo promotor a ele fusionado, usualmente específico de um determinado tecido (Figura 3.5) (Duffy, 2002). Essa abordagem permite o controle temporal e espacial de um gene inserido em *Drosophila* (Brand & Perrimon, 1993).

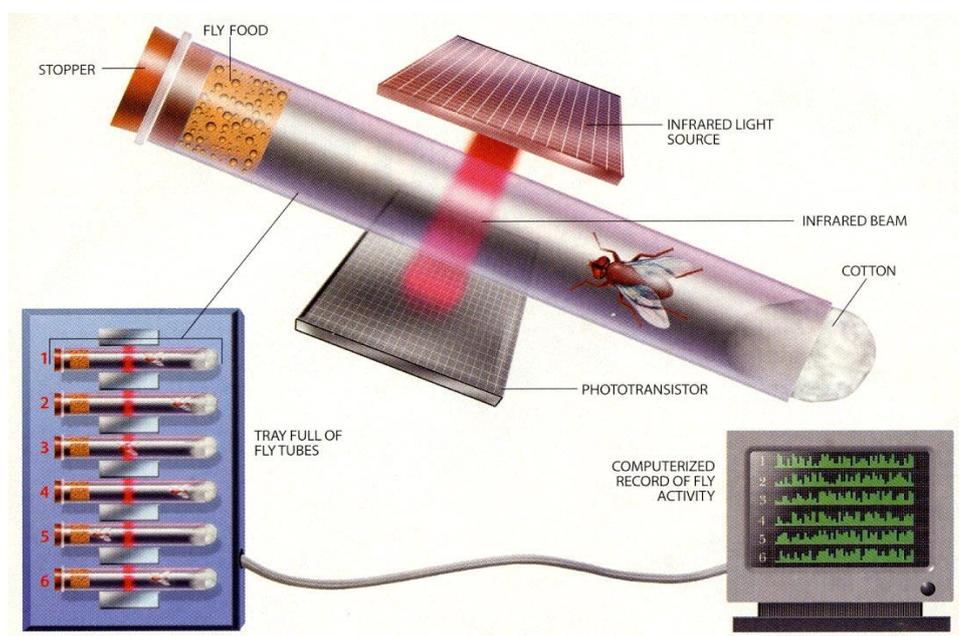
Moscas selvagens transformadas com *llcyc* dirigido por UAS (*uasllcyc*) foram cruzadas com estirpes contendo GAL4 sob o controle dos promotores dos genes *timeless*, *elav* e *pdf*. A construção *pdfgal4* tem 2,4 Kb da região a 5' do início de transcrição de *pdf*, fusionado ao GAL4 (Renn *et al.*, 1999), como *pdf* é expresso apenas nos pequenos e grandes neurônios ventro-laterais, a expressão de *uasllcyc* e *uasdmcyc* ficará restrita a esse grupo de células (Helfrich-Foster & Homberg, 1993). O acentuador *elavgal4* é proveniente do locus *elav* (*embryonic lethal abnormal vision*), que é expresso em todo sistema nervoso de moscas, está envolvido no desenvolvimento neuronal, além da regulação negativa e processamento de mRNA. *Timgal4* corresponde a um fragmento de 6 Kb contendo a seqüência *upstream* de *tim*, onde a terminação 3' é o início de tradução de *tim*, fusionado a GAL4 (Emery *et al.*, 1998). O gene *tim* é um dos principais reguladores do ritmo circadiano, sendo expresso nos grupos neuronais requeridos para essa função. A ORF do gene *cyc* de *D. melanogaster* fusionada a UAS (*uasycyc*), foi utilizada como controle da expressão de *llcyc* em moscas selvagens.



**Figura 3.5.** Exemplo do funcionamento do sistema UAS-GAL4 em *D. melanogaster*. O gene *cyc* de *L. longipalpis* (*llcyc*) está sob o controle da seqüência UAS e o ativador transcricional GAL4 sob o controle do promotor do gene *timeless* (*tim*). A construção *uasllcyc* não é expressa na ausência de GAL4, por isso as moscas carregando as construções *uasllcyc* e *timgal4* precisam ser cruzadas. Após o cruzamento, *llcyc* será expresso no momento e nas células em que a proteína Timeless (Tim) normalmente é expressa. Adaptado de Brand e Perrimon, 1993.

### 3.8 Atividade Locomotora

Para avaliar a atividade locomotora das moscas, utilizamos um Sistema de Monitoramento de Atividade de *Drosophila* (*Trikinetcs*). De acordo com as instruções do fabricante, as moscas foram individualmente acondicionadas em tubos de vidro, contendo meio de cultura a base de aveia em uma extremidade e fechados com algodão na outra. Esse tubo foi posicionado em um monitor de atividade locomotora, de tal forma que na região central do tubo passasse um feixe de luz infravermelha e, cada vez que a mosca interrompia a passagem da luz, era computado um evento de atividade (Figura 3.6). As contagens realizadas por esse equipamento foram registradas em um computador em intervalos de 30 minutos e, posteriormente, analisadas no programa Microsoft Excel versão 2003 (*Microsoft*) e na versão *on-line* do teste de qui-quadrado para cálculo do período (<http://www.circadian.org/periodogram.html>). Os monitores foram acondicionados em incubadoras a temperatura constante de 25° C, e submetidos a ciclos de doze horas de luz e doze horas de escuro (LD) por cinco dias, seguidos de 10 dias em escuro constante (DD).



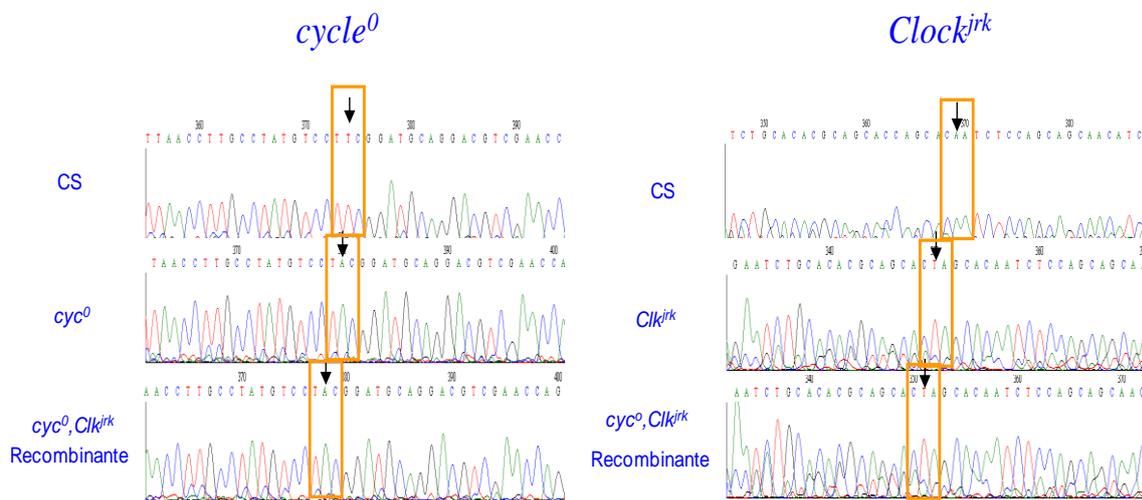
**Figura 3.6.** Sistema de monitoramento de Atividade Locomotora de *Drosophila* (*Trikinetcs*). As moscas foram individualmente acondicionadas em tubos de vidro, contendo alimento de um lado e fechado com algodão na face oposta. Os movimentos dentro da câmara são contados a cada interrupção do feixe de luz infravermelha que passa através do tubo. As contagens acumuladas em intervalos de 30 minutos foram armazenadas em um computador para análises nos programas apropriados (retirado de Young, 2000).

## 4. Resultados:

### 4.1 Obtenção do duplo-mutante *Clock<sup>irk</sup>* e *cyc<sup>0</sup>*

Para obter uma linhagem de *D. melanogaster* que carregaria de forma estável as duas mutações de relógio circadiano *Clk<sup>irk</sup>* e *cyc<sup>0</sup>*, foram realizados cruzamentos entre estirpes com mutações simples, disponíveis em nosso laboratório (ver Material e Métodos).

As mutações *Clk<sup>irk</sup>* e *cyc<sup>0</sup>* não conferem fenótipos visíveis, por isso foram identificadas através de digestão enzimática de produtos da PCR (ver Material e Métodos). Posteriormente, as linhagens que carregavam as duas mutações foram confirmadas por sequenciamento (Figura 4.1). De 122 linhagens testadas no fim dos cruzamentos, apenas uma era recombinante.

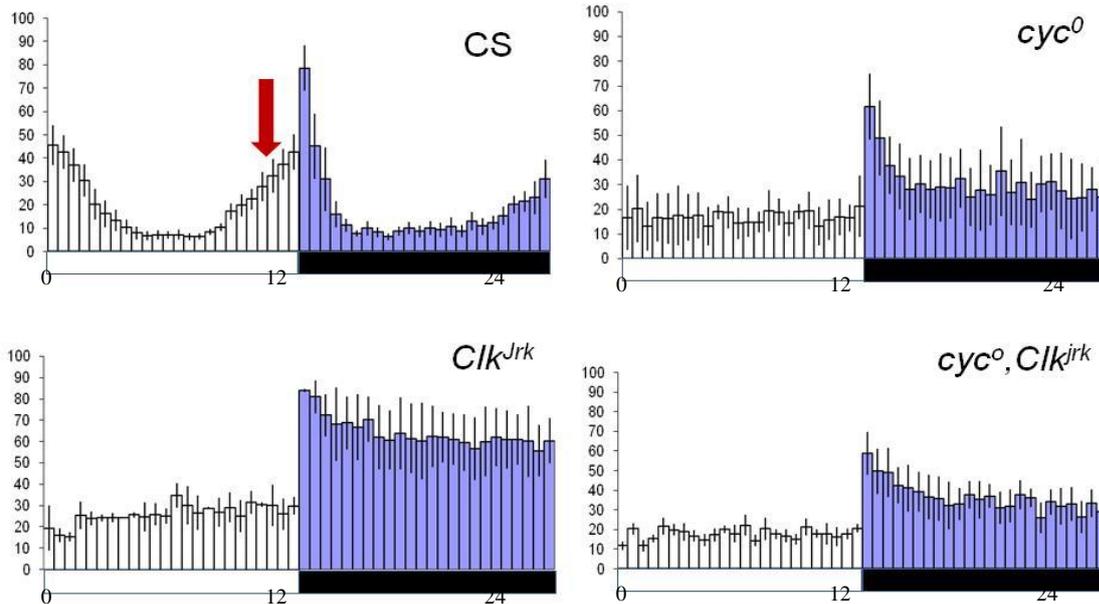


**Figura 4.1.** Confirmação de moscas recombinantes através de sequenciamento. Os eletroferogramas apresentam as regiões dos genes *Clock* e *cycle* de *D. melanogaster* onde se localizam as mutações *Clk<sup>irk</sup>* e *cyc<sup>0</sup>*. Setas pretas indicam o alelo selvagem em CS, e os sítios das mutações pontuais em *Clk<sup>irk</sup>* e *cyc<sup>0</sup>*. Embora o sequenciamento direto do fragmento de PCR do gene *Clk* não tenha ficado bom, ainda assim é possível confirmar os genótipos de interesse.

### 4.2 Comportamento do duplo mutante *Clk<sup>irk</sup>* e *cyc<sup>0</sup>*

A atividade locomotora dos recombinantes obtidos foi avaliada através do Sistema de Monitoramento de Atividade de *Drosophila* (Trikinetics Inc). Em ciclos de claro (fotofase) e escuro (escotofase) (LD 12:12), a linhagem recombinante (*Clk<sup>irk</sup>, cyc<sup>0</sup>*) e os mutantes simples (*Clk<sup>irk</sup>* ou *cyc<sup>0</sup>*) não apresentaram antecipação das transições, quando comparado com moscas selvagens (CS) (Figura 4.2). Além disso, o duplo mutante aparenta ter um perfil de atividade locomotora intermediário entre os mutantes simples *Clk<sup>irk</sup>* e *cyc<sup>0</sup>*, com um nível de atividade

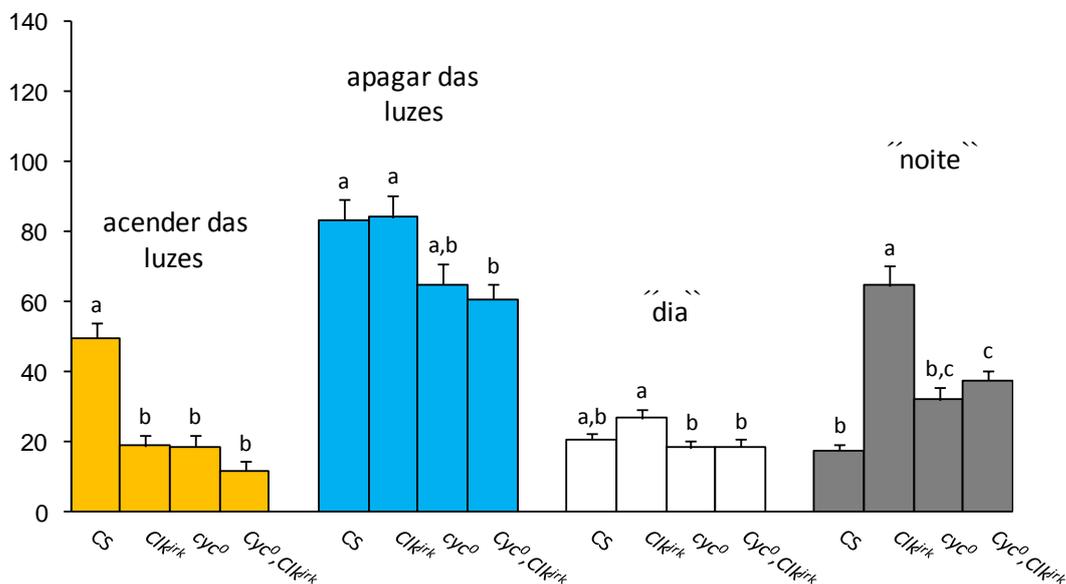
na escotofase semelhante a  $cyc^0$ , mas com um decréscimo mais suave na atividade após o desligar das luzes como observado em  $Clk^{jrk}$ .



**Figura 4.2.** A linhagem recombinante ( $Clk^{jrk}$ ,  $cyc^0$ ) não apresentou a antecipação das transições. Padrão de atividade locomotora em LD de CS (selvagem), n=52;  $Clk^{jrk}$ , n=33;  $cyc^0$ , n=33; duplo mutante, n=56. Barras horizontais brancas, fotofase; barras pretas, escotofase. Abaixo das barras horizontais, o tempo em horas. Cada barra do histograma representa meia hora de atividade locomotora, barras brancas, fotofase; barras azuis escotofase. Apenas CS apresenta o padrão bimodal, com predomínio da atividade na fase clara, além da antecipação das transições (seta vermelha).

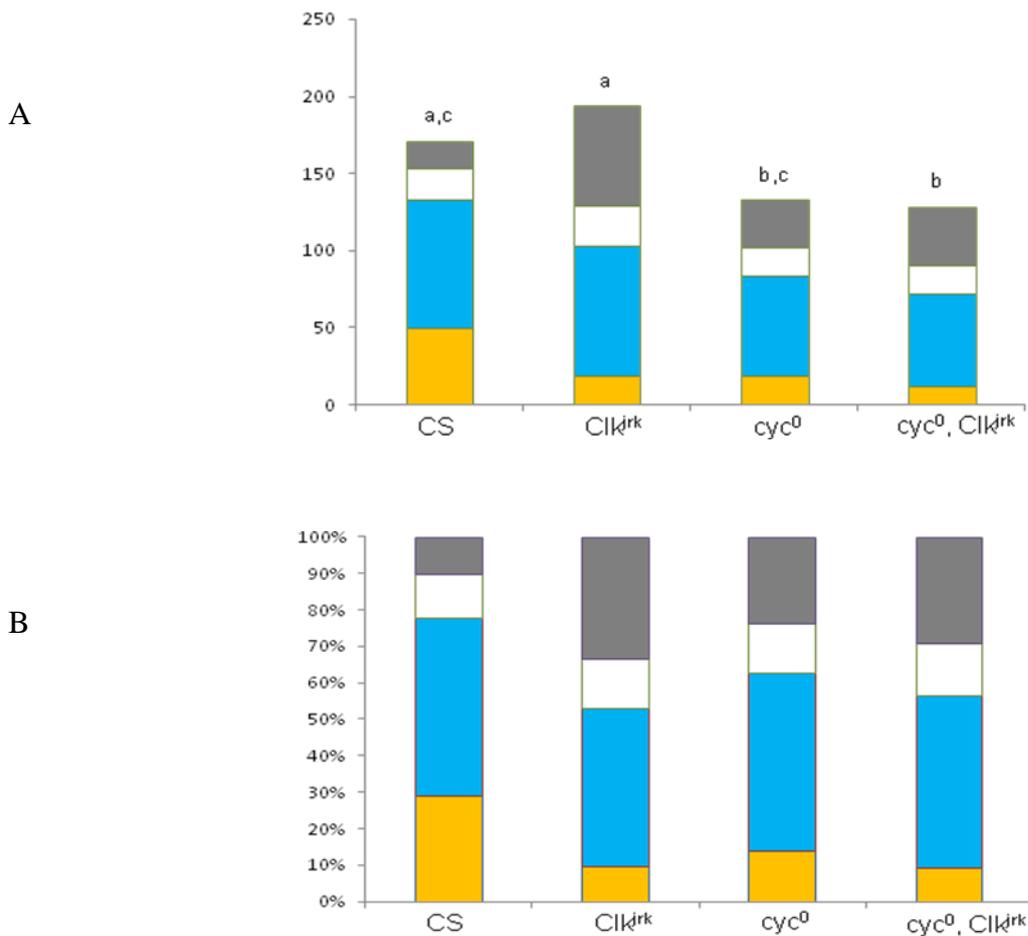
O padrão de atividade locomotora, em LD, indicou que os mutantes poderiam estar mais ativos durante a escotofase (Figura 4.2). Para avaliar se isso de fato estava ocorrendo, foram calculadas as médias da atividade locomotora diurna e noturna, excluindo-se a meia hora logo após o ligar e apagar das luzes (ver abaixo). Foi observado que tanto as linhagens com mutações simples, quanto as que carregavam ambas as mutações foram mais ativas que CS na escotofase (Figura 4.3). Além disso,  $Clk^{jrk}$  se mostrou aproximadamente três vezes mais ativo nessa fase do que CS.

Adicionalmente, foi quantificado o *startle response*, que corresponde a um reflexo das moscas ao acender e ao apagar das luzes. Geralmente, observa-se essa resposta a um estímulo inesperado, nos primeiros 30 minutos após as transições. Os mutantes apresentaram o *startle response* ao acender das luzes significativamente menor que o de moscas selvagens, ao passo que o *startle response* ao apagar das luzes foi menor no duplo mutante e em  $cyc^0$ , do que o observado em CS e  $Clk^{jrk}$  (Figura 4.3).



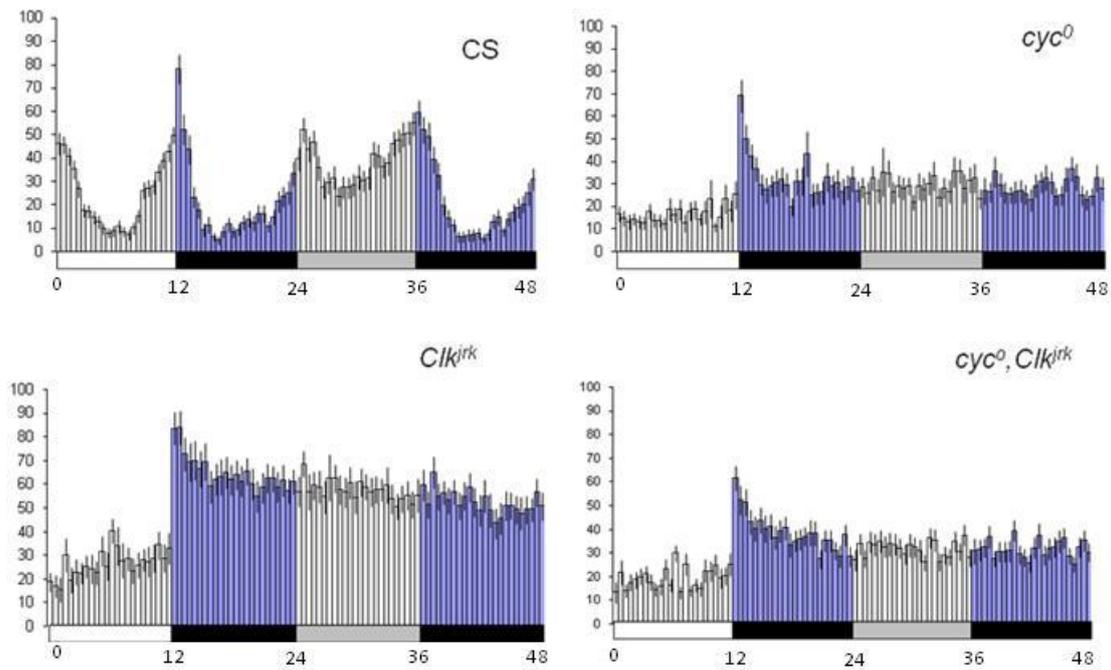
**Figura 4.3.** Gráficos representam as médias de atividade diurna (excluindo a meia hora após o ligar das luzes; barras brancas) e noturna (excluindo a meia hora após o desligar das luzes; barras cinzas), e o *startle response* ao acender (barras laranjas) e apagar das luzes (barras azuis). CS (selvagem), n=52; *Clk<sup>jrk</sup>*, n=33; *cyc<sup>0</sup>*, n=32; *Clk<sup>jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>* (recombinante), n=54. A comparação entre os 4 genótipos indicou diferenças significativas nas quatro medidas de atividade (ANOVA,  $p < 0,05$  em todos os casos). Letras iguais acima das barras assinalam os grupos de valores que não são significativamente diferentes no teste de Tukey.

Através da soma do *startle response* ao acender e ao apagar das luzes, e das médias diurna e noturna, obtêm-se a atividade total das moscas. Em LD, a atividade total de *Clk<sup>jrk</sup>* é a maior das quatro testadas, contudo é próxima de CS, que mostrou atividade total intermediária entre *Clk<sup>jrk</sup>* e *cyc<sup>0</sup>* (Figura 4.4A). O menor valor observado foi no duplo mutante (*cyc<sup>0</sup>, Clk<sup>jrk</sup>*). O aumento da atividade na escotofase foi o fator que mais contribuiu para o aumento da atividade total em *Clk<sup>jrk</sup>* (Figura 4.4B).



**Figura 4.4.** Atividade locomotora total da linhagem recombinante (duplo mutante), dos mutantes *Clk<sup>jrk</sup>* e *cyc<sup>0</sup>* e da linhagem selvagem. **(A)** O gráfico mostra a soma do *startle response* ao acender e ao apagar das luzes, e das médias diurna e noturna de cada linhagem. A comparação entre os 4 genótipos indicou diferenças significativas na atividade total (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Letras iguais acima das barras assinalam os grupos de valores que não são significativamente diferentes no teste de Tukey. **(B)** O gráfico mostra o quanto cada parâmetro contribuiu para a atividade locomotora total das linhagens. Nos dois gráficos, em laranja, *startle response* ao acender das luzes; azul, *startle response* ao apagar das luzes; branco, média diurna; cinza, média noturna. CS (selvagem),  $n=52$ ; *Clk<sup>jrk</sup>*,  $n=33$ ; *cyc<sup>0</sup>*,  $n=32$ ; *Clk<sup>jrk</sup>, cyc<sup>0</sup>* (recombinante),  $n=54$ .

Em escuro constante (DD), *D. melanogaster* apresentou o padrão bimodal diurno, mantendo a antecipação às transições e um período endógeno muito próximo a 24h (Figura 4.5 e Tabela 4.1). Tanto os mutantes simples *cyc<sup>0</sup>* e *Clk<sup>jrk</sup>*, quanto o duplo mutante (*cyc<sup>0</sup>, Clk<sup>jrk</sup>*) foram arrítmicos nesta condição (Figura 4.5), exceto por um indivíduo duplo-mutante que apresentou alguma ritmicidade com período curto (~19h).



**Figura 4.5.** Os gráficos mostram o padrão de atividade locomotora por dois dias, um de LD 12:12 seguido de um de DD (escuro constante). Em LD, barras horizontais brancas, fotofase (12h); barras horizontais pretas, escotofase (12h). Em DD, barras horizontais de cor cinza, dia subjetivo (12h); barras pretas, noite subjetiva (12h). Cada barra do histograma representa meia hora de atividade locomotora, barras brancas, fotofase; barras azuis escotofase. CS (selvagem), n=52; *Clk*<sup>irk</sup>, n=33; *cyc*<sup>0</sup>, n=32; *Clk*<sup>irk</sup>, *cyc*<sup>0</sup> (recombinante), n=54. Abaixo das barras horizontais, o tempo em horas.

Tabela 4.1. Análise da ritmicidade das linhagens.

Genótipo	período (h) +/- EPM	% de arritmicos	n
CS	24,05 +/- 0,05	-	41
<i>Clk</i> <sup>irk</sup>	-	100	42
<i>cyc</i> <sup>0</sup>	-	100	33
<i>cyc</i> <sup>0</sup> , <i>Clk</i> <sup>irk</sup>	19,50 +/- 0,00	98	53

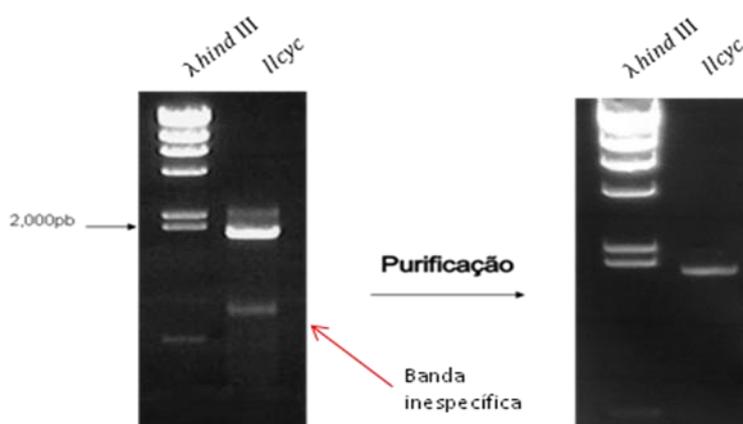
n - número de indivíduos testados.

h - horas.

EPM – erro padrão da média.

## 4.2 Clonagem e sequenciamento da ORF do gene *cyc* de *L. longipalpis*

Através da técnica da PCR utilizando uma polimerase de alta fidelidade, foi amplificada a ORF (*open reading frame*, fase de leitura aberta) do gene *cyc* de *L. longipalpis*, um fragmento de aproximadamente 2000 pb (Figura 4.6). Apesar do uso de iniciadores específicos, após eletroforese em gel de agarose, verificou-se a presença de uma banda possivelmente inespecífica, com aproximadamente 500 pb. Por esse motivo, optou-se por excisar a banda de tamanho esperado do gel (2000 pb) e purificá-la. O produto obtido, foi ligado inicialmente no vetor pCR<sup>®</sup> Blunt (Invitrogen) e posteriormente, foi transferido para o vetor utilizado em transformação de *D. melanogaster* - pUAST.



**Figura 4.6.** A foto mostra o fragmento correspondente a ORF do gene *cyc* de *L. longipalpis*, de aproximadamente 2000 pb. Seta vermelha aponta para a banda possivelmente inespecífica eliminada após a purificação.  $\lambda$  *Hind* III (Promega), padrão de peso molecular; *llyc*, produto da PCR do gene *cyc* de *L. longipalpis*.

Após confirmação por digestão enzimática de que o fragmento de 2000 pb tinha sido clonado no vetor pUAST, foi realizado o sequenciamento, para avaliar se esse, corresponderia a ORF de *llyc*. As seqüências obtidas, foram comparadas com a que estava depositada no GeneBank, número de acesso DBQ841151, confirmado-se que o fragmento clonado em pUAST era *llyc* e que nenhuma mutação não sinônima foi introduzida durante a PCR.

### 4.3 Obtenção de moscas transgênicas carregando *llcyc*

Para obter moscas transgênicas carregando *llcyc*, 230 embriões da linhagem  $w^-$  (mutação que confere olho branco) foram injetados com o plasmídeo pUAST contendo a construção (*llcyc*), e o pHELPER que codifica a transposase. Sobreviveram as injeções 88 indivíduos, que foram numerados e cruzados com moscas  $w^-$ . Através da coloração vermelha dos olhos, conferida pelo marcador dominante ( $w^+$ ) presente no vetor (pUAST), foram identificadas 26 moscas transgênicas, com quatro inserções independentes. Três indivíduos no cruzamento #1, dezenove indivíduos no cruzamento #2, um no cruzamento #3 e dois no cruzamento #24. Após identificação, cada mosca foi cruzada com outras, da linhagem  $w^-$  para que, posteriormente, fossem realizados endocruzamentos com o objetivo de estabelecer estirpes homozigotas no laboratório. Apenas o indivíduo nascido do cruzamento #3 não pôde ser cruzado para estabelecer linhagem, por ter nascido sem genitália.

Um mapeamento preliminar através da análise de segregação do marcador  $w^+$ , indicou que pelo menos duas linhagens (*uasllcyc2B* e *uasllcyc24A*) não estavam no cromossomo X, o que facilitaria os cruzamentos. Sendo assim, estas foram utilizadas nos experimentos descritos abaixo. Como os resultados obtidos com as duas linhagens foram muito semelhantes elas foram agrupadas.

### 4.4 Efeito de *llcyc* em moscas selvagens

O efeito do gene *llcyc* foi inicialmente testado em moscas selvagens. Para dirigir sua expressão, foram utilizadas três linhagens de Gal4: *elavgal4* (com expressão pan-neural), *timgal4* (expresso em todas as células do relógio circadiano) e *pdfgal4* (expresso nos s-LN<sub>v</sub> e l-LN<sub>v</sub>). Através de cruzamentos de moscas *uasllcyc*, com as que carregavam gal4, foi possível avaliar o efeito do transgene em diferentes tecidos.

Nas linhagens de *D. melanogaster* em que *uasllcyc* estava sob o controle de *elavgal4*, foi observado que a antecipação e o decréscimo da atividade ocorreram mais rapidamente, do que no controle expressando uma dose extra do gene *cyc* de *D. melanogaster* - *elavgal4/uasdmcyc*. (Figura 4.7A). Além disso, a antecipação à transição escuro/claro vista em *elavgal4/uasllcyc*, aparentemente não ocorre no controle *elavgal4/uasdmcyc*.

Quando a expressão de *llcyc* foi localizada somente em células do relógio circadiano, ocorreu o adiantamento do pico da noite, no controle *timgal4/uasdmcyc* ocorreu o inverso, o pico da manhã foi antecipado (Figura 4.7B). Adicionalmente, foi observado que a redução da

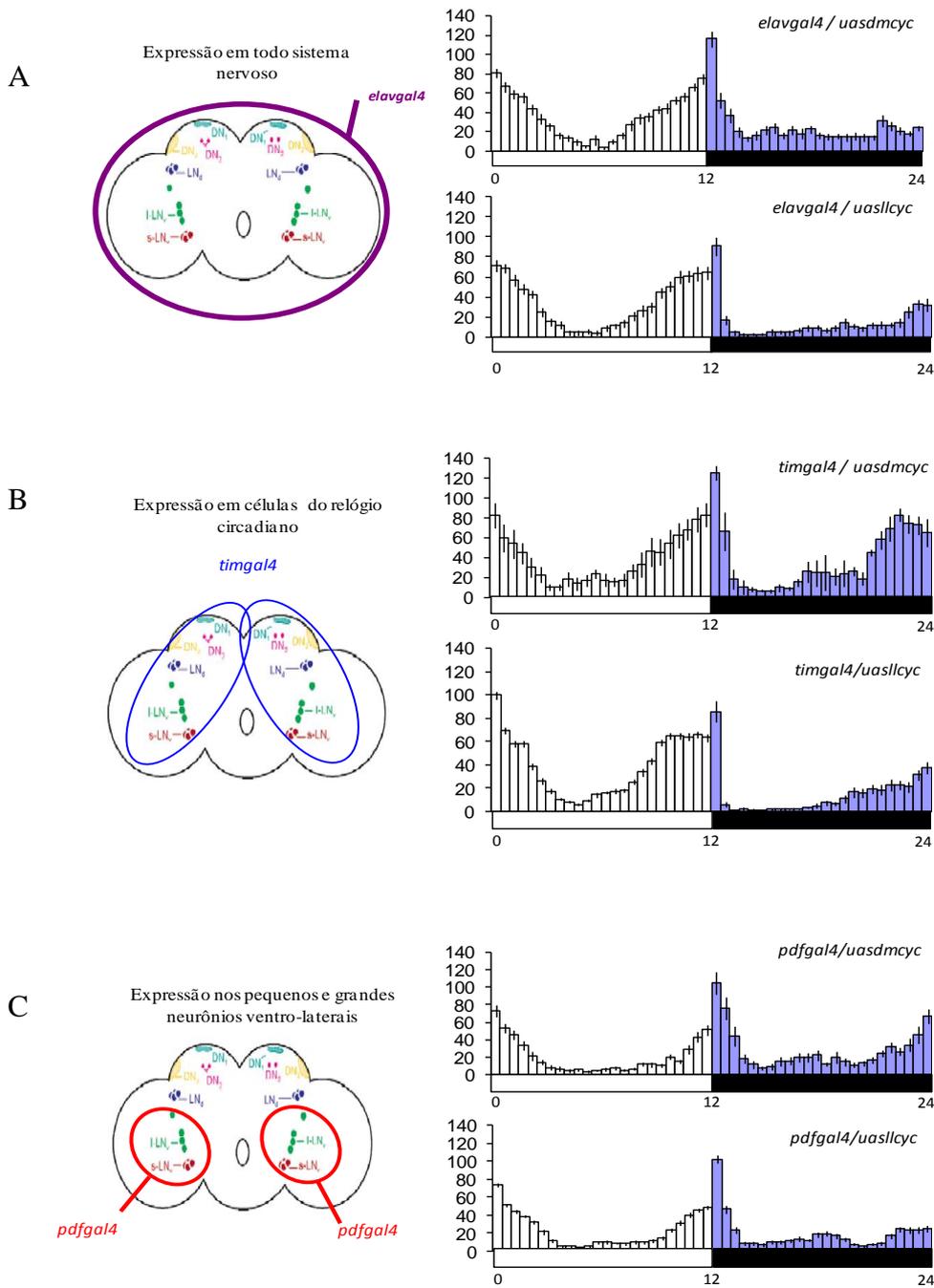
atividade após a entrada na escotofase foi mais abrupta em *timgal4/uasllcyc*, do que em *timgal4/uasdmcyc* (Figura 4.7B).

Ao restringir a expressão de *llcyc* somente nos pequenos e grandes neurônios ventrolaterais, foi visto que a antecipação da transição em *pdfgal4/uasllcyc*, também ocorreu mais cedo (Figura 4.7C). Além disso, moscas *pdfgal4/uasdmcyc* mostraram antecipação à transição escuro/claro, o que não foi observado em *pdfgal4/uasllcyc* (Figura 4.7C).

O *startle response* (ao acender e ao apagar das luzes) e as médias noturnas e diurnas, também foram avaliados em linhagens selvagens expressando *llcyc*, sob o controle de *elavgal4*, *timgal4* e *pdfgal4*.

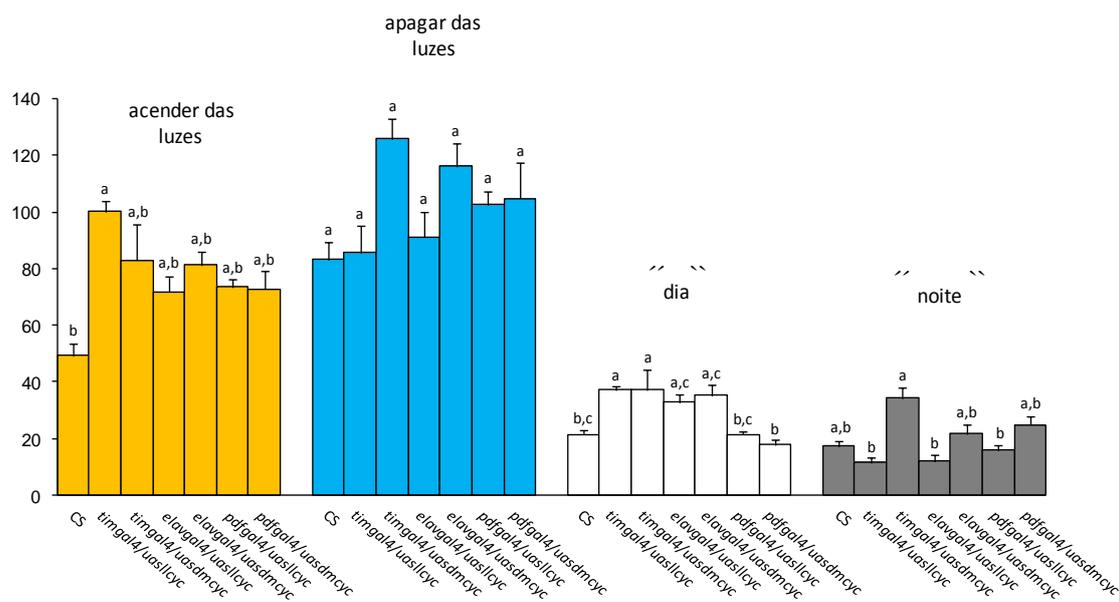
A estirpe *timgal4/uasllcyc* apresentou valor do *startle response* ao acender das luzes maior do que CS, enquanto *timgal4/uasdmcyc* apresentou um valor intermediário entre *timgal4/uasllcyc* e CS (Figura 4.8). As linhagens dirigidas por *timgal4* (*timgal4/uasllcyc* e *timgal4/uasdmcyc*) ficaram, aproximadamente, duas vezes mais ativas durante o dia, do que moscas selvagens. Além disso, a expressão em células de relógio (*timgal4/uasllcyc*) reduziu sutilmente a atividade noturna das moscas, acentuando a diferença entre a atividade diurna e noturna dessa linhagem.

Em *elavgal4/uasllcyc* e *elavgal4/uasdmcyc*, o *startle response* ao acender das luzes e a atividade diurna foram intermediários entre o maior (*timgal4/uasllcyc* e *timgal4/uasdmcyc*) e o menor (CS). Foi visto também que *elavgal4/uasllcyc* diminuiu a média noturna, ao passo que em *elavgal4/uasdmcyc* não houve diferença com CS. Curiosamente, a superexpressão de *dmcyc* nos pequenos e grandes neurônios ventrolaterais (*pdfgal4/uasdmcyc*), tornou as moscas mais noturnas, pois elas apresentaram a média noturna maior que a média diurna, invertendo o comportamento em relação a moscas selvagens, o que não ocorre em *pdfgal4/uasllcyc* (Figura 4.8). Não foram observadas diferenças significativas no *startle response* ao apagar das luzes entre todas as moscas testadas.



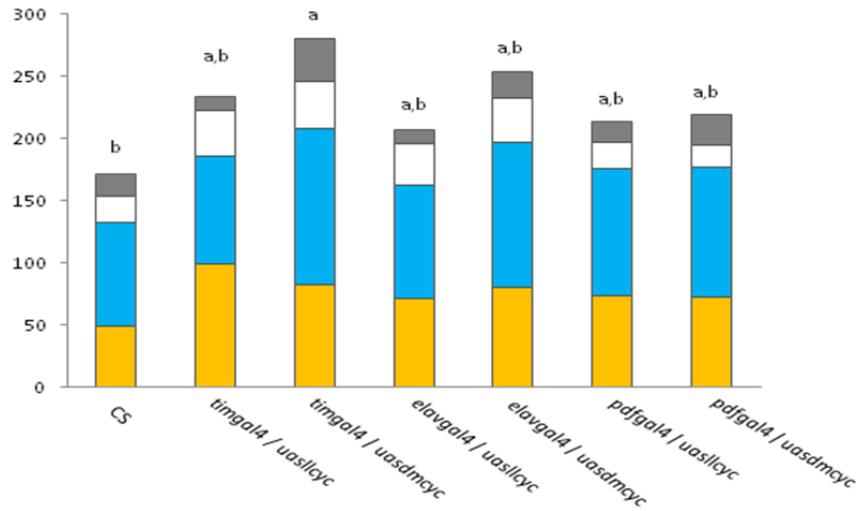
**Figura 4.7.** Padrão de Atividade locomotora em LD de moscas selvagens expressando o gene *cyc* de *L. longipalpis* (*llcyc*). **(A)** A construção *elavgal4* dirigiu a expressão de *uasllcyc* e *uasdmcy* em todo o sistema nervoso de *D. melanogaster*. **(B)** A construção *timgal4* localizou a expressão de *uasllcyc* e *uasdmcy* em células do relógio circadiano de *D. melanogaster*. **(C)** *pdfgal4* restringiu a expressão de *uasllcyc* e *uasdmcy* aos pequenos e grandes neurônios ventro-laterais. Barras horizontais brancas, fotofase (12h); barras horizontais pretas, escotofase. A esquerda dos gráficos, representação do local da expressão de *llcyc* no cérebro de *D. melanogaster*. *timgal4/uasllcyc*, n=25; *timgal4/uasdmcy*, n=4; *elavgal4/uasllcyc*, n=11; *elavgal4/uasdmcy*, n=11; *pdfgal4/uasllcyc*, n=28; *pdfgal4/uasdmcy*, n=9. Abaixo das barras horizontais, o tempo em horas.

A linhagem *timgal4/uasdmcy* apresentou a atividade total superior ao selvagem, as demais linhagens apresentaram valores intermediários entre o maior (*timgal4/uasdmcy*) e o menor valor (CS) (Figura 4.9A). Os parâmetros que mais contribuíram para esse aumento foram o *startle response* ao apagar das luzes e a média de atividade noturna (Figuras 4.8 e 4.9B).

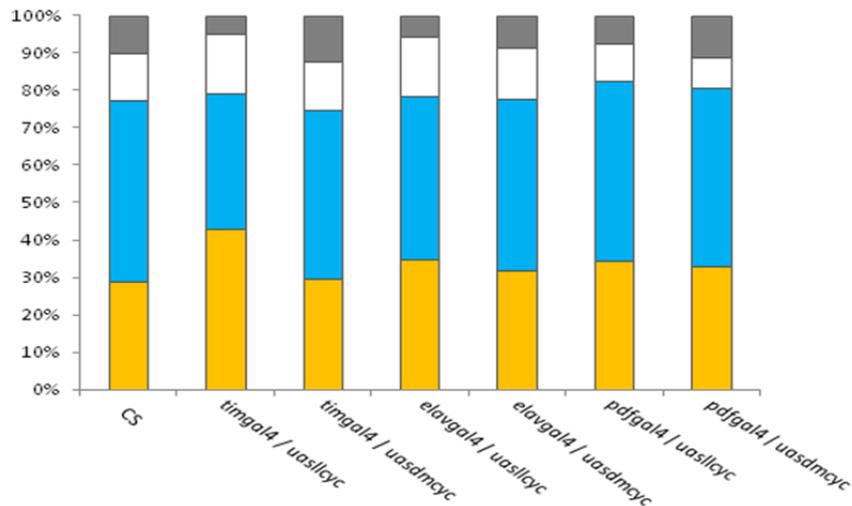


**Figura 4.8.** O *startle response* (ao acender e ao apagar das luzes) e as médias noturnas e diurnas de linhagens selvagens expressando *llcyc*, sob o controle de *elavgal4*, *timgal4* e *pdfgal4*. Barras verticais de cor laranja, *startle response* ao acender das luzes; barras verticais azuis, *startle response* ao desligar das luzes; barras verticais brancas, média da atividade locomotora diurna; barras verticais pretas, média da atividade locomotora noturna. CS (selvagem), n=52; *timgal4/uasllcyc*, n=25; *timgal4/uasdmcy*, n=4; *elavgal4/uasllcyc*, n=11; *elavgal4/uasdmcy*, n=11; *pdfgal4/uasllcyc*, n=28; *pdfgal4/uasdmcy*, n=9. A comparação entre os genótipos indicou diferenças significativas nas medidas de atividade (ANOVA,  $p < 0,05$ ), exceto no caso do *startle response* ao desligar das luzes. Letras iguais acima das barras assinalam os grupos de valores que não são significativamente diferentes no teste de Tukey.

A



B



**Figura 4.9.** Atividade locomotora total de linhagens selvagens carregando *llyc* sob o controle de *elavgal4*, *timgal4* e *pdfgal4*. **(A)** As linhagens *timgal4/uasdmcyt* e *elavgal4/uasdmcyt* apresentaram um aumento na atividade total em relação a CS. A comparação entre os genótipos indicou diferenças significativas na atividade total (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Letras iguais acima das barras assinalam os grupos de valores que não são significativamente diferentes no teste de Tukey. **(B)** A contribuição de cada parâmetro para a atividade total. Em cor laranja, *startle response* ao acender das luzes; azul, *startle response* ao apagar das luzes; branco, média diurna; preto, a média noturna.

O período endógeno dessas moscas também foi calculado, onde *elavgal4/uasllcyc* mostrou redução do período de 2,8h em relação ao selvagem (24,1h), e de 1,2h em relação à *elavgal4/uasdmcyc* (22,5h), deixando arrítmicas 18% das moscas, porcentagem duas vezes superior a *elavgal4/uasdmcyc* (9%) (Tabela 4.2). A linhagem *timgal4/uasllcyc* reduziu o período para 22,0h e tornou 8% das moscas arrítmicas, enquanto *timgal4/uasdmcyc* apresentou período de 23,4h. Em *pdfgal4/uasllcyc* o período foi de 21,8h, com 8% de moscas arrítmicas, quase duas horas inferior ao observado em *pdfgal4/uasdmcyc* (23,42h). Contudo, o número total de moscas contendo as duas construções de *cyc* ainda é pequeno e a diferença na proporção de indivíduos arrítmicos entre *uasdmcyc* e *uasllcyc*, combinando todos os cruzamentos com linhagens *gal4*, não chega a atingir significância ( $X^2$ ;  $p = 0.065$ ).

**Tabela 4.2.** Análise da ritmicidade das linhagens transgênicas.

Genótipo	período (h) +/- EPM	% de arrítmicos	N
CS	24,10 +/- 0,05	-	41
<i>timgal4 / uasllcyc</i>	22,00 +/- 0,11	43	21
<i>timgal4 / uasdmcyc</i>	23,40 +/- 0,12	-	4
<i>elavgal4 / uasllcyc</i>	21,30 +/- 0,15	18	11
<i>elavgal4 / uasdmcyc</i>	22,50 +/- 0,00	9	11
<i>pdfgal4 / uasllcyc</i>	21,80 +/- 0,07	8	25
<i>pdfgal4 / uasdmcyc</i>	23,42 +/- 0,08	-	6

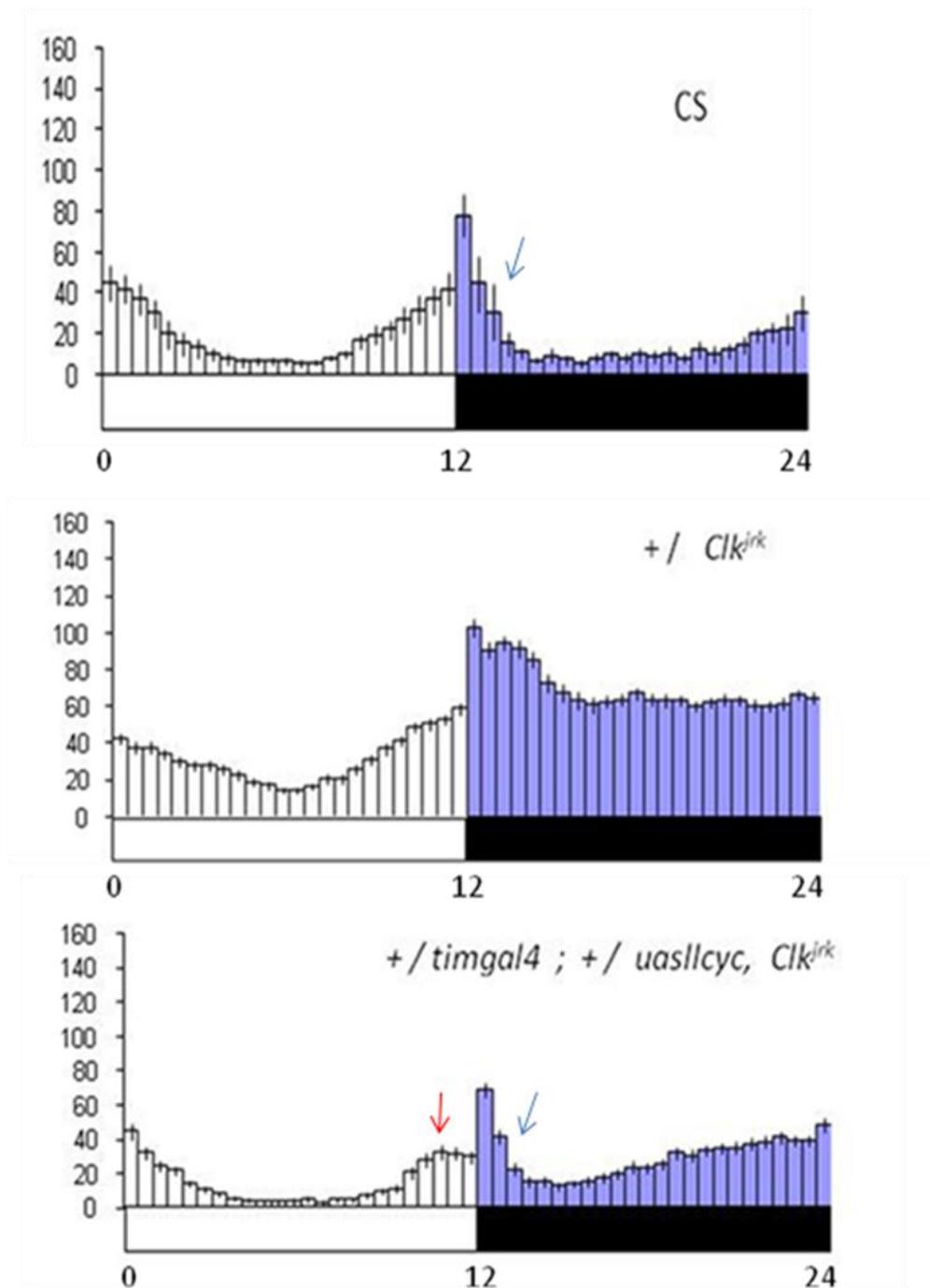
n - número de indivíduos testados.

h - horas.

EPM – erro padrão da média.

#### 4.5 Efeito de *llcyc* no mutante nulo *Clk<sup>irk</sup>* em heterozigose

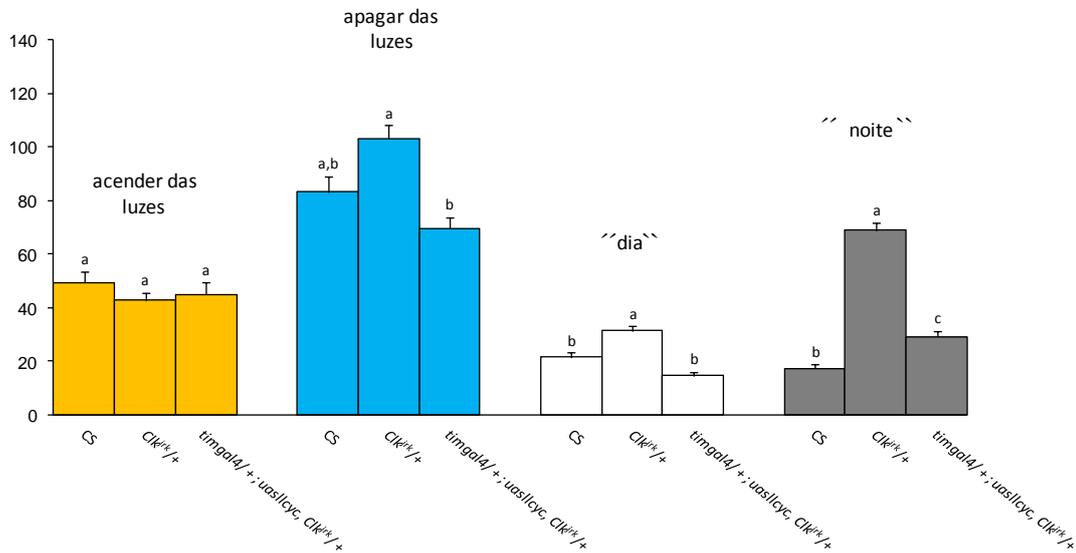
Para avaliar se *llcyc* seria capaz de ativar a transcrição, substituindo a cópia ausente de *Clk* no mutante *Clk<sup>irk</sup>* (região de transativação ausente) em heterozigose, foi testada a expressão de *uasllcyc* sob o controle de *timgal4*. Em LD, moscas *+Clk<sup>irk</sup>* expressando *llcyc* em células do relógio circadiano adiantaram o pico da noite em relação a indivíduos sem a construção. Além disso, o decréscimo da atividade logo após a transição foi mais definido em moscas com a construção, tornando-as mais parecidas com CS (Figura 4.10). Infelizmente não conseguimos ainda analisar moscas *+Clk<sup>irk</sup>* contendo *uasdmcyc* sob o controle de *timgal4*.



**Figura 4.10.** Padrão de atividade locomotora em LD de moscas em heterozigotas para  $Clk^{jrk}$  expressando  $llcyc$ . Barras brancas, fotofase; barras pretas, escotofase. Seta vermelha aponta para o adiantamento do pico da noite observado no duplo mutante expressando  $llcyc$ . Seta azul aponta para o decréscimo da atividade logo após a transição. CS (selvagem),  $n=52$ ;  $+ / Clk^{jrk}$ ,  $n=36$ ;  $[+ / timgal4 ; + / uasllcyc, Clk^{jrk}]$ ,  $n=36$ . Abaixo das barras horizontais, o tempo em horas. Os dados de CS são os mesmos mostrados anteriormente e são apresentados aqui para efeito de comparação.

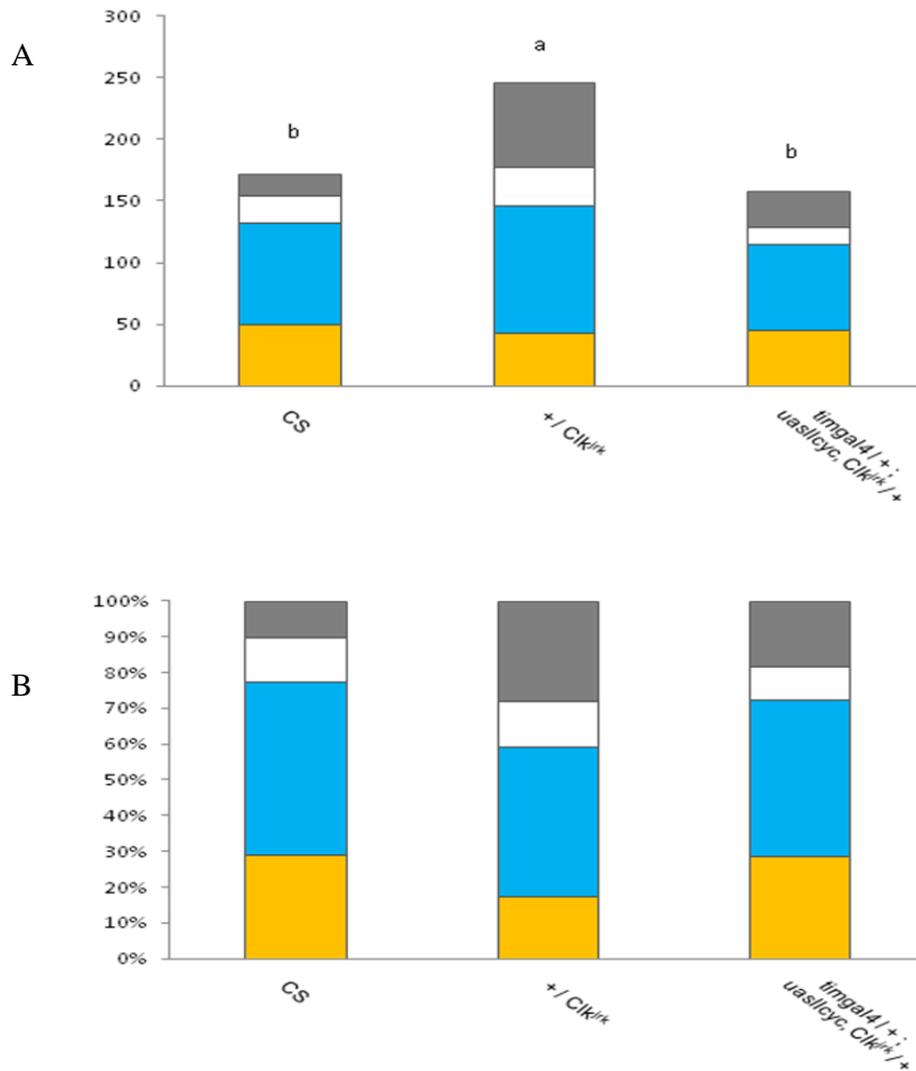
No *startle response* ao acender das luzes, não foram encontradas diferenças significativas entre moscas heterozigotas para  $Clk^{jrk}$ , expressando ou não  $llcyc$  em células do relógio (Figura 4.11). Contudo, o *startle response* ao apagar das luzes, foi menor em  $[+ / timgal4 ; + / uasllcyc, Clk^{jrk}]$  do que em  $+ / Clk^{jrk}$  e CS, que por sua vez apresentou um valor

intermediário entre  $+/Clk^{jrk}$  e  $[+/timgal4 ; +/uasllcyc, Clk^{jrk}]$ . As médias diurna e noturna de  $+/Clk^{jrk}$  foram maiores que as do selvagem, porém a expressão de *llcyc* causou a redução de ambas, entretanto a média diurna foi reduzida ao mesmo nível de CS.



**Figura 4.11.** O *startle response* (ao acender e ao apagar das luzes) e as médias noturnas e diurnas de linhagens heterozigotas para  $Clk^{jrk}$  expressando *llcyc*, sob o controle de *timgal4*. Barras verticais de cor laranja, *startle response* ao acender das luzes; barras verticais azuis, *startle response* ao desligar das luzes; barras verticais brancas, média diurna; barras verticais pretas, média noturna. A comparação entre os genótipos indicou diferenças significativas nas medidas de atividade (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Letras iguais acima das barras assinalam os grupos de valores que não são significativamente diferentes no teste de Tukey.

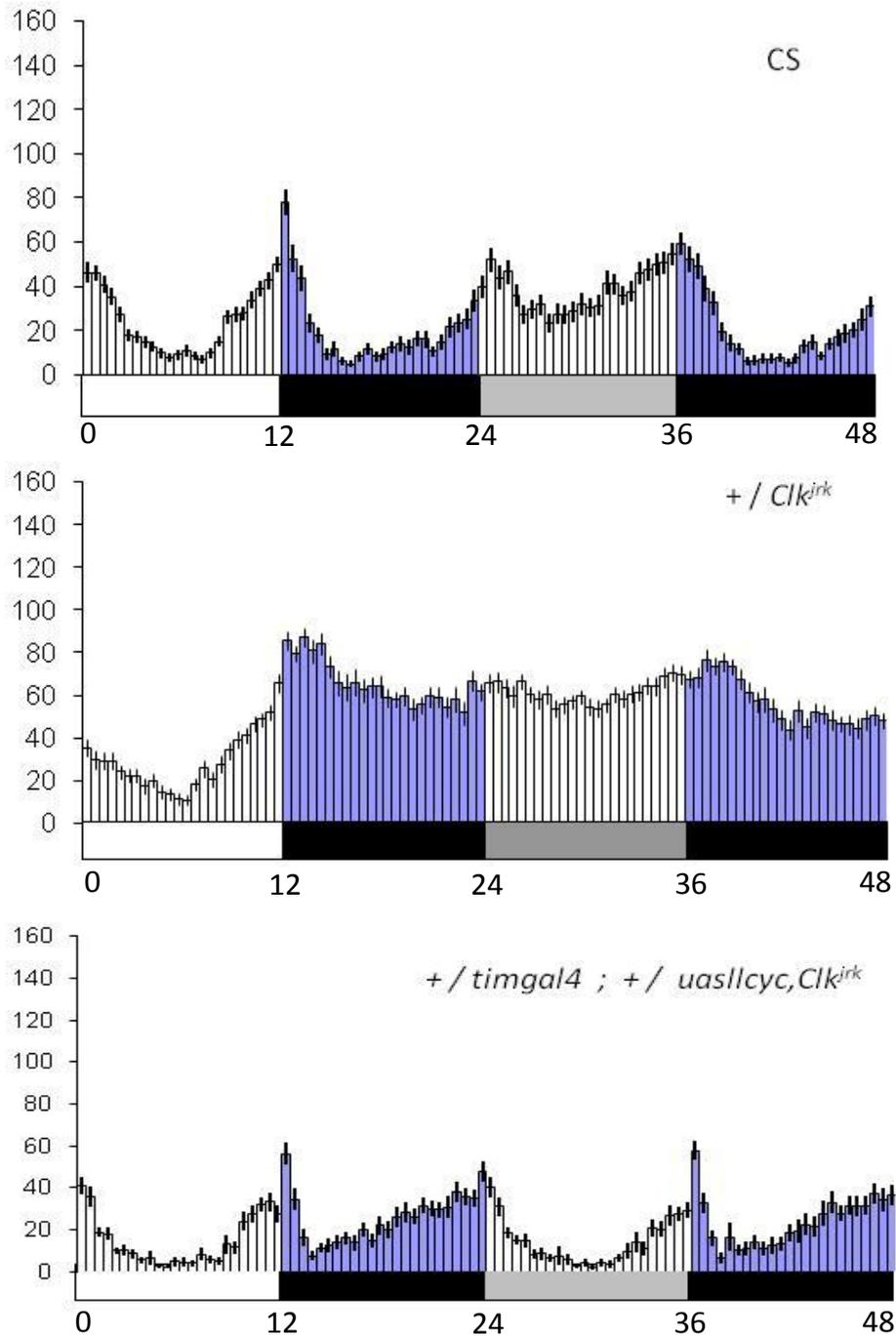
A atividade total das moscas  $+/Clk^{jrk}$  foi maior que de moscas selvagens, porém quando estas linhagens expressaram *llcyc* sob o controle de *timgal4* ( $+/timgal4 ; +/uasllcyc, Clk^{jrk}$ ), elas reduziram a atividade, tornando-se mais próximas de CS (Figura 4.12A). As Figuras 4.11 e 4.12B mostram que, com exceção do *startle response* ao acender das luzes, houve redução em todos os demais parâmetros (*startle response* ao apagar das luzes, média de atividade noturna e diurna) em relação a  $+/Clk^{jrk}$ .



**Figura 4.12.** O efeito de *llcyc* na atividade locomotora total de moscas heterozigotas para a mutação *Clk<sup>rk</sup>*. **(A)** Gráfico mostra a atividade total das linhagens CS, *+/Clk<sup>rk</sup>* e [*+/timgal4* ; *+/uasllcyc*, *Clk<sup>rk</sup>*]. A comparação entre os genótipos indicou diferenças significativas nas medidas de atividade (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Letras iguais acima das barras assinalam os grupos de valores que não são significativamente diferentes no teste de Tukey. **(B)** Gráfico mostra a contribuição de cada fator para a atividade total. Em laranja, *startle response* ao acender das luzes; azul, *startle response* ao apagar das luzes; branco, média diurna; preto, média noturna.

Em DD, CS continuou a apresentar padrão bimodal diurno com as transições bem marcadas. O mutante *Clk<sup>rk</sup>* em heterozigose não mostrou a antecipação às transições na entrada do dia ou da noite subjetivos (Figura 4.13). A expressão de *llcyc* em *+/Clk<sup>rk</sup>* aparentemente levou a um padrão de DD muito parecido com LD, com as antecipações bem definidas, próximo do que foi observado no selvagem. Apesar da melhora aparente no padrão de atividade locomotora, essas moscas apresentaram o período de 21,94h, aproximadamente 2h menor que *+/Clk<sup>rk</sup>* (24h). Além disso, o número de indivíduos arrítmicos dobrou (50%),

em relação ao heterozigoto sem a construção (25%) (Tabela 4.3), sendo esta diferença significativa ( $X^2$ ;  $p = 0.025$ ).



**Figura 4.13.** Comportamento de heterozigotos para  $Clk^{jrk}$  expressando  $l1cyc$ , na entrada em DD. Nos gráficos estão representados dois dias de atividade locomotora, um em LD12:12, seguido de um em DD. No primeiro dia, barras horizontais brancas, fotofase (12h); barras horizontais pretas, escotofase (12h). No dia subsequente, barras horizontais de cor cinza, dia subjetivo (12h); barras pretas, noite subjetiva (12h). Abaixo das barras horizontais, o tempo em horas. Os dados de CS são os mesmos mostrados anteriormente e são apresentados aqui para efeito de comparação.

**Tabela 4.3.** Análise da ritmicidade de heterozigotos para  $Clk^{jrk}$  expressando  $llyc$ .

Genótipo	período (h) +/- EPM	% de arritmicos	N
CS	24,10 +/- 0,05	-	41
$Clk^{jrk} / +$	24,00 +/- 0,08	25	36
$timgal4 / +; uasllyc, Clk^{jrk} / +$	21,94 +/- 0,13	50	36

n - refere-se ao número de indivíduos testados.

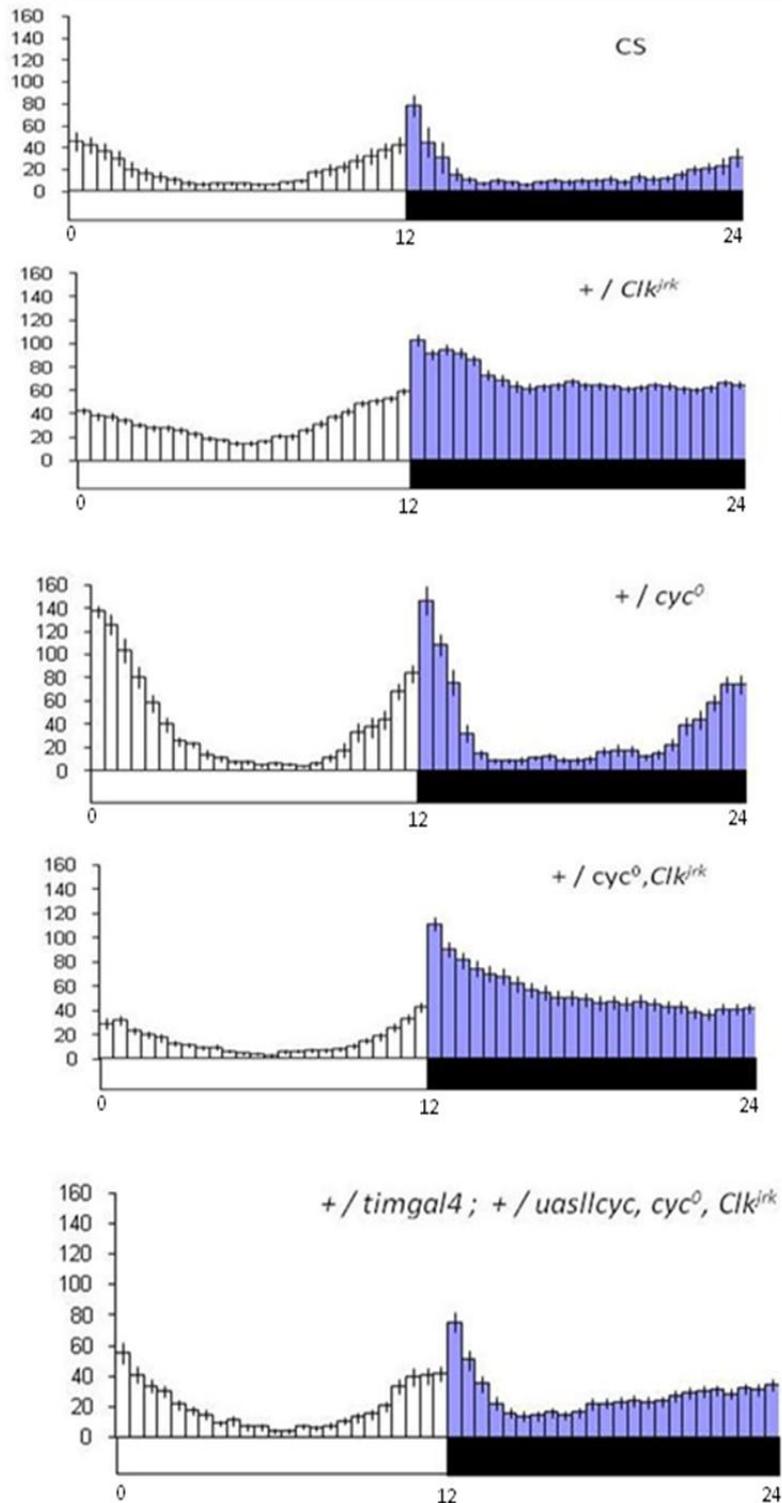
h - período endógeno medido em horas.

EPM – erro padrão da média.

#### 4.6 Expressão de $llyc$ no duplo mutante recombinante em heterozigose

No recombinante em heterozigose ( $+ / cyc^0, Clk^{jrk}$ ) estão ausentes uma dose da cauda de ativação (poli-Q), presente em  $Clk$ , e uma dose da proteína  $Cyc$  (Allada *et al.*, 1998; Rutila *et al.*, 1998). Então, ao expressar  $llyc$  nesse *background* genético, duas peças importantes serão introduzidas: a cauda de ativação do tipo BCTR, e a proteína  $Cyc$ , que possui grande identidade com seu ortólogo em *D. melanogaster* (Meireles-Filho *et al.*, 2006). Infelizmente não conseguimos ainda analisar moscas contendo  $uasdmcy$  sob o controle de  $timgal4$  no *background* duplo mutante em heterozigose

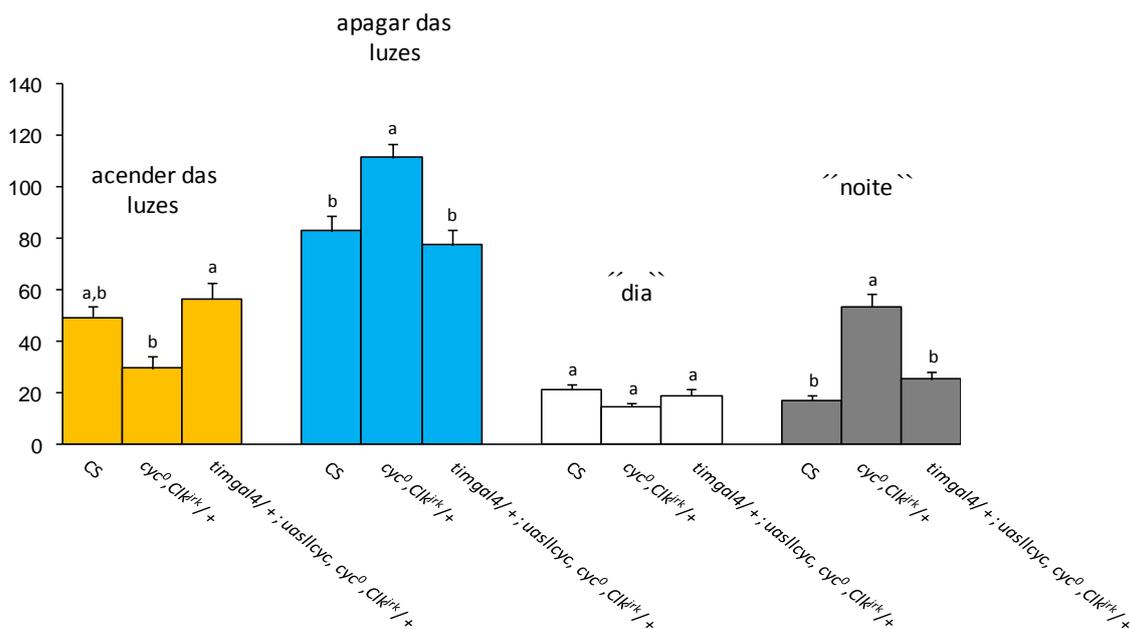
Como mostrado anteriormente, em LD a linhagem  $+ / Clk^{jrk}$  apresentou a antecipação à transição claro/escuro, mas não mostrou antecipação à transição escuro/claro (Figura 4.14). Em  $+ / cyc^0$ , a falta de uma dose de  $cyc$  não atrapalhou a capacidade de antecipar as transições, contudo a atividade locomotora aparentemente teve uma amplitude superior às demais linhagens testadas. O duplo mutante em heterozigose apresentou a antecipação da transição claro/escuro, porém a ausência de uma das cópias de  $Clk$  e  $cyc$  parece ter prejudicado as moscas em antecipar a transição escuro/claro. A expressão de  $llyc$  em moscas  $+ / cyc^0, Clk^{jrk}$ , levou ao adiantamento do pico da noite em relação a CS e ao duplo mutante sem a construção, porém não apresentou antecipação da transição escuro/claro (Figura 4.14).



**Figura 4.14.** Efeito da expressão de *llcyc* no duplo mutante em heterozigose, em LD. Barras brancas, fotofase; barras pretas, escotofase. CS (selvagem), n=52; +/*Clk<sup>irk</sup>*, n=36; +/*cyc<sup>0</sup>*, n=16; duplo mutante (+/*cyc<sup>0</sup>, Clk<sup>irk</sup>*), n=44; (+/*timgal4; + / uasllcyc, Clk<sup>irk</sup>, cyc<sup>0</sup>*), n=32. Abaixo das barras horizontais, o tempo em horas. Os dados de CS e +/*Clk<sup>irk</sup>* são os mesmos mostrados anteriormente e são apresentados aqui para efeito de comparação.

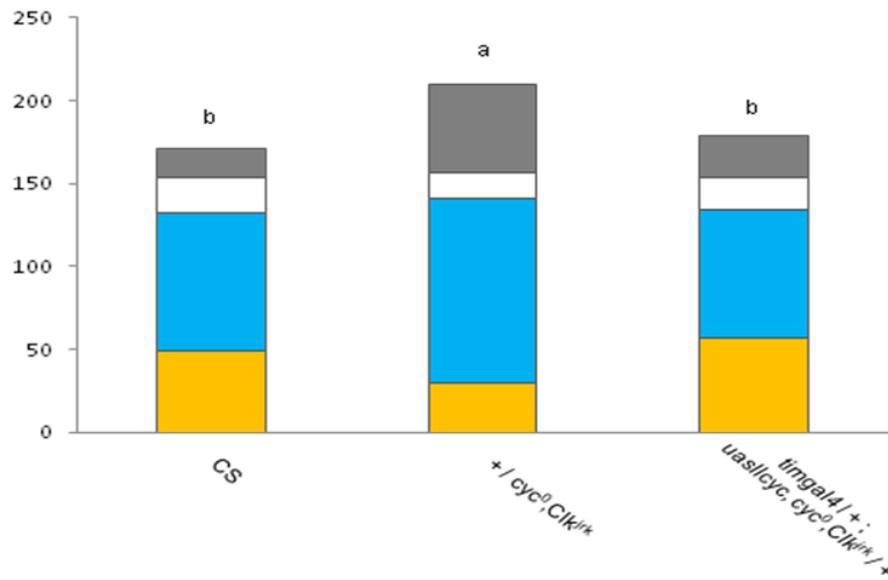
Moscas heterozigotas para as duas mutações expressando *llcyc* aumentam o *startle response* ao acender das luzes, além de reduzirem o *startle response* ao apagar, em relação aquelas sem a construção (Figura 4.15). A média de atividade noturna do heterozigoto duplo mutante com a construção foi menor do que a linhagem que não carregava a construção. Não houve diferença na média diurna entre as linhagens heterozigotas duplo mutantes com e sem a construção. A expressão de *llcyc* no duplo mutante aproximou todos os valores dos parâmetros analisados, ao selvagem.

A atividade acumulada do heterozigoto duplo mutante expressando *llcyc* foi menor do que os recombinantes que não o expressavam, mostrando que houve um resgate do padrão de atividade tornando o recombinante duplo mutante mais parecido com CS (Figura 4.16A). Os parâmetros que mais contribuíram para isso foram a atividade noturna, e o *startle response* ao apagar das luzes, ambos menores que o apresentado no heterozigoto duplo mutante sem a expressão de *llcyc* (Figuras 4.15 e 4.16B).

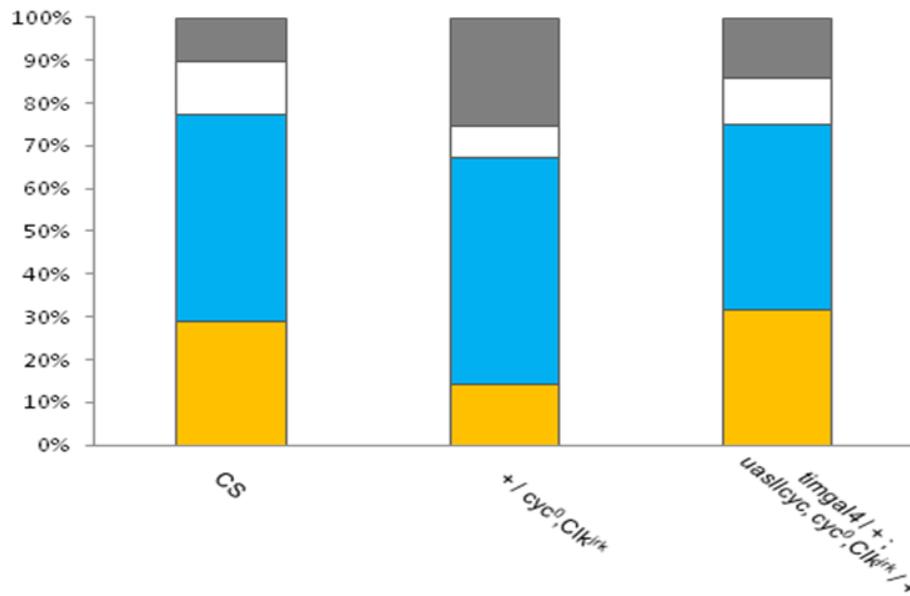


**Figura 4.15.** O *startle response* (ao acender e ao apagar das luzes) e as médias noturnas e diurnas do duplo-mutante em heterozigose expressando *llcyc*, sob o controle de *timgal4*. Barras verticais de cor laranja, *startle response* ao acender das luzes; barras verticais azuis, *startle response* ao desligar das luzes; barras verticais brancas, média da atividade locomotora diurna; barras verticais pretas, média da atividade locomotora noturna. A comparação entre os genótipos indicou diferenças significativas nas medidas de atividade (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Letras iguais acima das barras assinalam os grupos de valores que não são significativamente diferentes no teste de Tukey.

A



B



**Figura 4.16.** Atividade total do duplo mutante expressando *llcyc*. **(A)** A expressão de *llcyc* reduziu a atividade total de  $+/cyc^0, Clk^{jk}$ , tornando-a mais próxima do que foi observado em CS. A comparação entre os genótipos indicou diferenças significativas na atividade total (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Letras iguais acima das barras assinalam os grupos de valores que não são significativamente diferentes no teste de Tukey. **(B)** Gráficos representam a contribuição de cada fator para a atividade total. Em laranja, *startle response* ao acender das luzes; azul, *startle response* ao apagar das luzes; branco, média diurna; preto, a média noturna.

Em DD, o padrão bimodal diurno de CS persistiu mesmo no dia e noite subjetivos (Figura 4.17). Os mutantes *Clk<sup>irk</sup>* e *cyc<sup>0</sup>* em heterozigose não mostraram a antecipação às transições no primeiro dia de escuro constante. A expressão de *llcyc* em *+/Clk<sup>irk</sup>,cyc<sup>0</sup>* aparentemente levou a um adiantamento do pico da noite, além disso o padrão de DD tornou-se muito parecido com LD, com as antecipações bem definidas, como observado no selvagem (Figura 4.17). Embora tenha sido recuperada parte do padrão selvagem de atividade locomotora, o período endógeno dessas moscas foi reduzido em 2,5h, além de 63% dos indivíduos tornarem-se arrítmicos. Em moscas com a dupla mutação em heterozigose sem construção o período foi de 25,0h, com 5% de moscas arrítmicas (Tabela 4.4). A diferença na proporção de moscas arrítmicas nos dupla mutantes em heterozigose com e sem a construção *uasllcyc* é altamente significativa ( $X^2$ ;  $p < 0.001$ ).

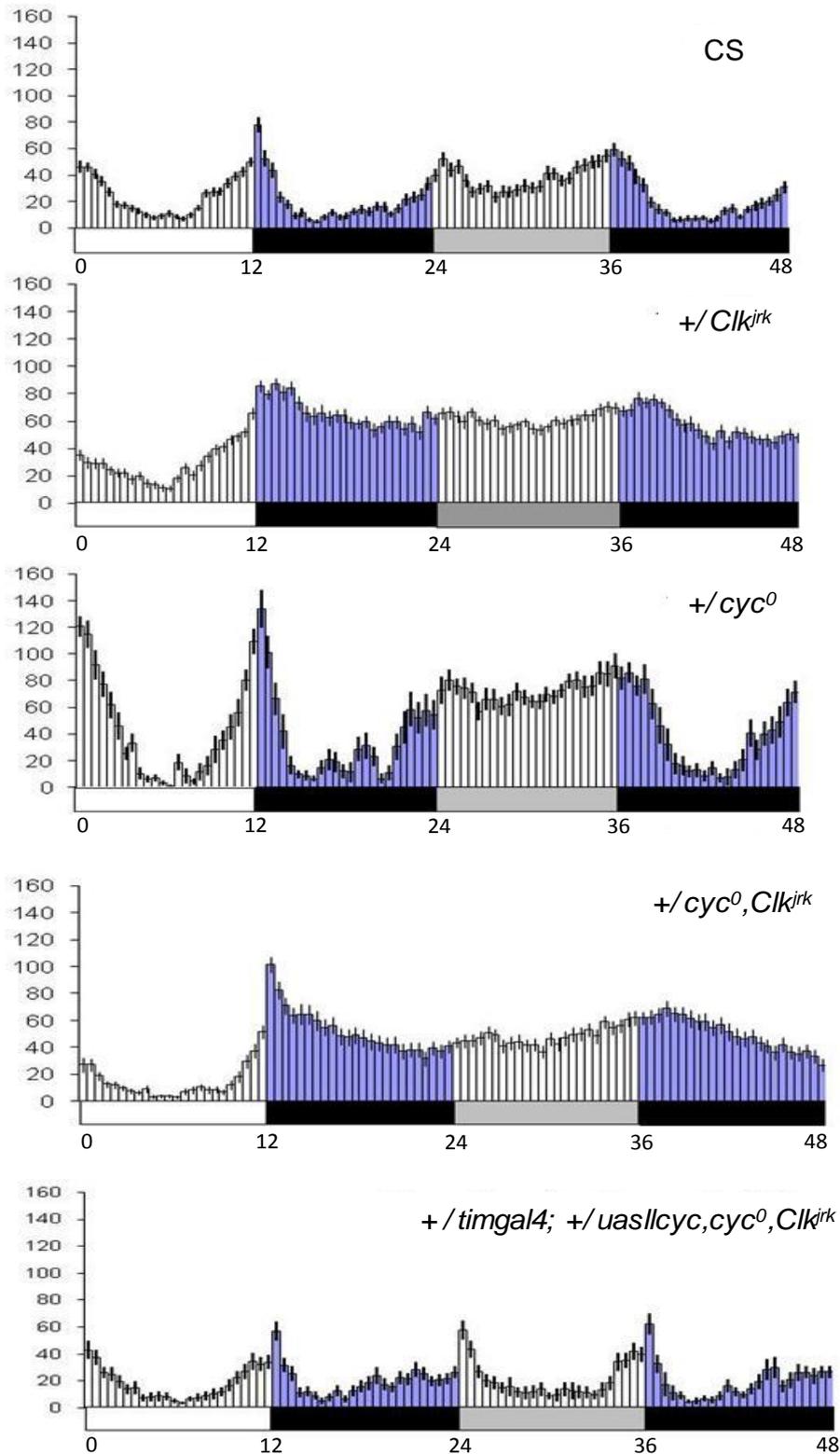
**Tabela 4.4** Análise da ritmicidade do duplo-mutante em heterozigose expressando *llcyc*.

Genótipo	período (h) +/- EPM	% de arrítmicos	n
CS	24,10 +/- 0,05	-	41
<i>cyc<sup>0</sup>,Clk<sup>irk</sup> / +</i>	25,00 +/- 0,14	5	44
<i>timgal4 / +; uasllcyc, cyc<sup>0</sup>, Clk<sup>irk</sup> / +</i>	22,50 +/- 0,13	63	24

n - refere-se ao número de indivíduos testados.

h - período endógeno medido em horas.

EPM – erro padrão da média.



**Figura 4.17.** Efeito da expressão de *llcyc* no duplo mutante em heterozigose, na entrada em DD. Padrão de dois dias de atividade locomotora, um em LD (12:12), seguido de um em DD (escuro constante). No primeiro dia, barras horizontais brancas, fotofase (12h); barras horizontais pretas, escotofase (12h). No dia subsequente, barras horizontais de cor cinza, dia subjetivo (12h); barras pretas, noite subjetiva (12h). CS (selvagem), n=52;  $+/Clk^{irk}$ , n=36;  $+/cyc^0$ , n=16;  $(+/timgal4; +/uasllcyc, Clk^{irk}, cyc^0)$ , n=32. Abaixo das barras horizontais, o tempo em horas.

## 5. Discussão

Neste trabalho avaliamos moscas da espécie *D. melanogaster* carregando o gene *cyc* de *L. longipalpis*, em diferentes *backgrounds* genéticos. Foram examinados diferentes aspectos da atividade locomotora dessas moscas e os resultados obtidos são discutidos a seguir.

### 5.1 Padrão de atividade locomotora e período endógeno.

Nossos resultados indicam que a expressão da ORF do gene *cyc* de *L. longipalpis* (*llcyc*) sob o controle de *timgal4* altera o padrão de atividade locomotora do duplo mutante recombinante (*cyc*<sup>0</sup>, *Clk*<sup>jr<sup>k</sup>) e do mutante *Clk*<sup>jr<sup>k</sup> em heterozigose. Além disso, provoca o adiantamento do pico do final da tarde (fotofase) e início da noite (escotofase), que chamamos aqui simplesmente de pico da noite. Este resultado sugere que *llcyc* estaria ativando a transcrição de *per* e *tim*.</sup></sup>

O duplo mutante heterozigoto (+/*cyc*<sup>0</sup>, *Clk*<sup>jr<sup>k</sup>) possui apenas uma cópia selvagem dos genes *Clk* e *cyc* (Fig 5.1A). Com isso, estão ausentes nessa linhagem uma dose da cauda de ativação (poli-Q), perdida em *Clk*<sup>jr<sup>k</sup> (Fig 5.1B), e uma dose da proteína Cyc, ausente no mutante *cyc*<sup>0</sup> (Fig 5.1C) (Allada *et al.*, 1998; Rutila *et al.*, 1998). Ao expressar *llcyc* nessas moscas, duas peças importantes são introduzidas: a proteína Cyc de *L. longipalpis* que possui grande identidade com seu ortólogo em *D. melanogaster* e a cauda de ativação BCTR, não existente no Cyc desta espécie (Meireles-Filho *et al.*, 2006), que em tese poderia substituir a cauda de ativação de *Clk*, ausente no mutante *Clk*<sup>jr<sup>k</sup> (Fig 5.1D). Na figura 4.13, observa-se que no primeiro dia de DD ocorre a recuperação da ritmicidade no duplo mutante carregando o *llcyc*, contudo 63% dessas moscas tornaram-se arrítmicas. A possível inconsistência entre a recuperação da ritmicidade do duplo mutante no primeiro dia de DD carregando *llcyc* e o grande número de arrítmicos, poderia ser explicada pela perda de ritmo desses insetos nos dias subsequentes de DD. De fato, análises preliminares do ritmo em DD, mostrou que a partir do segundo dia nesta condição, grande parte das moscas não apresentam mais o padrão rítmico do primeiro dia. Ao nível molecular, foi visto em cultura de células S2 (*Drosophila* - Schneider), que a expressão de uma construção (*dmcycaaCT*) codificando uma proteína quimérica contendo Cyc de *D. melanogaster* e a região C-terminal do Cyc de *Aedes aegypti*, que possui a cauda de ativação BCTR, pode se ligar a *Clk*<sup>jr<sup>k</sup> e ativar a transcrição de um gene repórter, porém ao se ligar a *Clk*, a transcrição ocorre em menor intensidade (Meireles-Filho,</sup></sup></sup></sup>

2009). Uma explicação plausível é que a presença dos dois domínios de ativação no sistema (BCTR e poli-Q) dificulte a função de ativador transcricional desempenhada pelo dímero Clk-Cyc. Isso também é condizente com a grande quantidade de moscas arrítmicas observadas no recombinante (63%) expressando o transgene.

Quando *llcyc* foi expresso no *Clk<sup>irk</sup>* em heterozigose, talvez fosse esperado que o oscilador funcionasse um pouco melhor, uma vez que esse *background* é mais “próximo” de moscas normais, onde as duas doses da proteína Cyc selvagem estariam presentes. De fato, foi observado que a atividade locomotora do mutante *Clk<sup>irk</sup>* carregando a construção ficou próxima ao padrão apresentado por CS em LD e no primeiro dia de DD, apesar disso, ainda era possível observar o adiantamento do pico da noite. Além disso, em *Clk<sup>irk</sup>*, o número de indivíduos arrítmicos foi menor que no recombinante, em torno de 50%, próximo ao que foi observado no selvagem expressando a construção sob o controle de *timgal4* (43%), sugerindo que as cópias selvagens de *cyc* estariam contribuindo para o correto funcionamento do oscilador.

Em moscas selvagens, sob o controle de *timgal4*, *elavgal4* e *pdfgal4*, *llcyc* causou efeitos diferentes daqueles apresentados pela expressão de uma dose extra de *dmcyc* nos mesmos tecidos, provavelmente em função da cauda de ativação presente em *llcyc*. Controlado por *elavgal4*, *llcyc* causou um adiantamento do pico da noite, e manteve a antecipação no final da escotofase, *dmcyc* por outro lado levou a um aumento da amplitude e um adiantamento menor que o observado em *elavgal4/uasllcyc*, além disso, não apresentou antecipação no fim da escotofase (Figura 4.7). Moscas *timgal4/uasllcyc* apresentaram o adiantamento do pico da noite enquanto *timgal4/uasdmcyc* adianta o pico da manhã. *Pdfgal4/uasllcyc* também adianta o pico da noite, além de aparentemente ter perdido a capacidade de antecipar a transição escuro/claro. Contudo, é importante ressaltar que estes resultados são preliminares já que um número relativamente pequeno de indivíduos de cada genótipo foi analisado.

O período de moscas mutantes e selvagens também foi afetado por *llcyc*. Quando expresso em células do relógio de moscas selvagens (*timgal4/uasllcyc*), o período foi encurtado para 22h, além de tornar 43% das moscas arrítmicas (Tabela 4.2). A dose extra de Cyc (*dmcyc*) encurtou o período para 23,4h, em torno de 1,2h a mais que *llcyc*, indicando que a região de ativação poderia ser a razão do encurtamento do período em 2h em relação a moscas selvagens (24h).

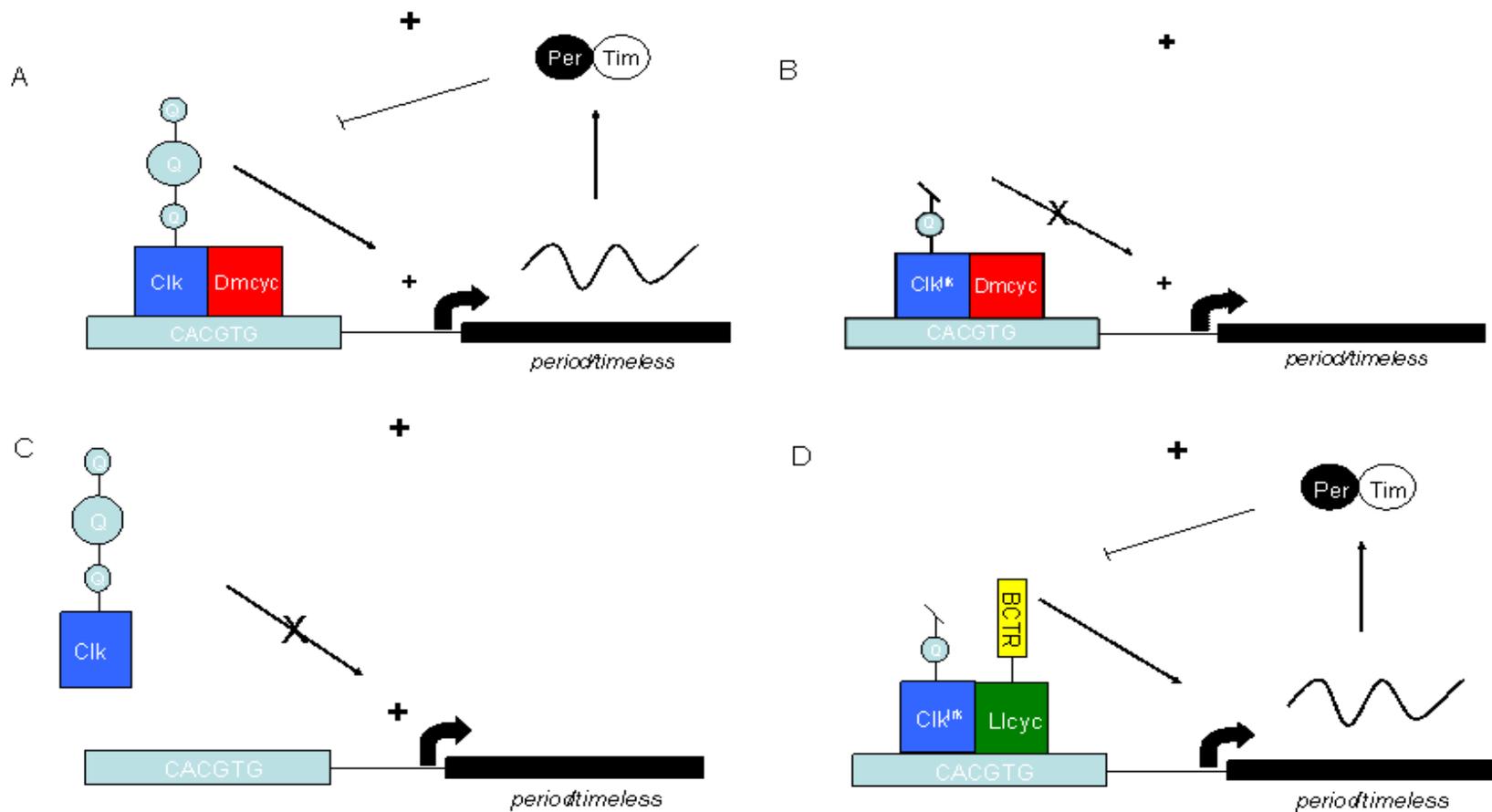
Em um estudo recente, para avaliar o potencial de ativação transcricional do heterodímero Clk-Cyc, foi gerada uma proteína quimérica entre Cyc (*D. melanogaster*) e um forte e bem caracterizado ativador transcricional viral VP16 (Kadener *et al.*, 2008). Os autores observaram que *cyc-vp16*, quando expresso em células de relógio de moscas selvagens (*timgal4/uascyc-vp16*), encurtava o período para 22,04h, causando 10% de arritmicidade. Comparação desta construção com *llcyc* sugere que a proteína de *L. longipalpis* estaria funcionando de maneira análoga a *cyc-vp16*, porém o domínio de ativação BCTR teria um efeito mais acentuado do que o ativador VP16, uma vez que a expressão de *llcyc* em células de relógio aumenta em torno de quatro vezes a proporção de indivíduos arrítmicos, em relação a *cyc-vp16*. Contudo, é preciso observar esses dados com cautela, porque, embora as sequências do gene *cyc* mostrem grande homologia entre *D. melanogaster* e *L. longipalpis*, em alguns domínios importantes (84% na região bHLH), elas não são idênticas (67% de identidade na proteína inteira), sendo assim os efeitos observados podem, de certa forma, serem atribuídos a estas diferenças. Além disso, alguma diferença na proporção de moscas arrítmicas pode ser causada pelo método de análise. Todavia, como a expressão de *dmcyc* mostrou um efeito menor no período do que *llcyc* e *cyc-vp16*, é provável que grande parte do efeito observado, seja uma consequência da presença da região de C-terminal nessas proteínas - BCTR e VP16, respectivamente.

Em *D. melanogaster*, o efeito da construção *cyc-vp16* no período foi atribuído ao aumento da transcrição e o consequente avanço de fase de repressão de *per* (Kadener *et al.*, 2008). No entanto, em nosso sistema, além do aumento do repressor, é possível que a presença do domínio BCTR, favoreça a repressão do heterodímero Clk<sup>jdk</sup>-Llcyc (ver abaixo).

Recentemente foi descrito em diversos insetos o gene *cryptochrome2* (*cry2*), que está ausente em drosofilídeos (Zhu *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2007) e apresenta maior homologia com os genes *cryptochrome* de vertebrados, do que com o de *D. melanogaster*, chamado também de *cry1*. Nesses insetos não-drosofilídeos, como borboletas e mosquitos, esta proteína mostrou-se um potente repressor do dímero Clk-Cyc (Zhu *et al.*, 2008), essa repressão provavelmente ocorre através da ligação de Cry2 a cauda BCTR de Cyc, como observado em mamíferos (Griffin *et al.*, 1999; Kume *et al.*, 1999).

Em *D. melanogaster* foi visto que a superexpressão de Cry1 e Per nos olhos das moscas, reprime Clk-Cyc, sugerindo que Cry1 também poderia funcionar como um repressor transcricional do oscilador circadiano em tecidos periféricos (Collins *et al.*, 2006). Contudo, é importante ressaltar que essa função de repressor transcricional de Cry1 foi dependente da co-

expressão de *Per* (Yuan *et al.*, 2008). Curiosamente, nos experimentos com células S2 mencionados anteriormente (Meireles-filho, 2009) foi demonstrado que Cry1, mesmo na ausência de *Per*, reduz a expressão do gene repórter, quando ativado pela proteína quimérica contendo a cauda de ativação BCTR, o que não foi observado com a proteína *Cyc* de *D. melanogaster*. Deste modo, é plausível que a maior redução no período e o grande número de arritmicos observados em *uasllcyc* quando comparado a *dmcyc*, tenha ocorrido, não apenas pelo aumento da expressão de *Per*, mas também, pela interação de Cry1 (ou alguma outra proteína) ao domínio BCTR. Isto sugere também que a cauda BCTR, quando introduzida em *D. melanogaster* permite a Cry1 atuar como repressor do dímero Clk-Ll*cyc* de forma semelhante a observada em Cry2 em outros insetos.



**Figura 5.1.** Diagrama esquemático do provável funcionamento de LlcyC em *D. melanogaster*. **(A)** Em moscas selvagens Clk e Cyc formam um heterodímero e ativam a transcrição de *per* e *tim*. Posteriormente as proteínas Per e Tim entram no núcleo e reprimem a transcrição mediada por Clk e Cyc. **(B)** A mutação *Clk<sup>rk</sup>* causa um códon de parada prematuro impedindo a tradução da região de ativação poli-Q, por isso abole a transcrição de *per* e *tim*. **(C)** A mutação *cyc<sup>0</sup>* causa um códon de parada no início da tradução, dando origem a uma proteína truncada e não funcional, abolindo também a transcrição de *per* e *tim*. **(D)** LlcyC poderia se ligar a proteína codificada por *Clk<sup>rk</sup>* e substituir o domínio de ativação ausente nesse mutante, por possuir o domínio BCTR. Setas indicam a transcrição, linhas cortadas por uma barra indicam repressão.

## 5.2 Atividade noturna versus diurna

Moscas selvagens possuem padrão de atividade locomotora bimodal, com predominância na fotofase (Meireles-Filho *et al.*, 2006), entretanto, estudos anteriores mostraram que indivíduos com a mutação  $Clk^{jrk}$ , tornavam-se mais ativos durante a noite (Allada *et al.*, 1998). De fato, nós observamos que esses mutantes ficam três vezes mais ativos na escotofase do que CS (Figura 4.3). O duplo mutante e  $cyc^0$  também apresentaram comportamento parecido, embora em menor intensidade.

Em heterozigose seria esperado que as moscas recuperassem parte da ritmicidade uma vez que os mutantes  $Clk^{jrk}$  e  $cyc^0$  sofrem efeito de dosagem (Allada *et al.*, 2006 ; Rutila *et al.*, 2006), isso de fato foi observado na atividade locomotora, e no período (próximo de 24h em  $Clk^{jrk}$ , e 25h no duplo mutante). Embora esses resultados indiquem que apenas uma cópia desses genes possa sustentar o funcionamento do oscilador circadiano, a atividade noturna continuou prevalecendo sobre a diurna.

A expressão de  $llcyc$  em linhagens heterozigotas para  $Clk^{jrk}$  reduziu as médias de atividade locomotora na fase escura e clara, recuperando parte da ritmicidade dessas moscas, sugerindo que  $llcyc$  estaria contribuindo para o correto funcionamento do relógio circadiano desses mutantes (Figura 4.11). No entanto, aparentemente os indivíduos permaneceram mais ativos na escotofase.

No duplo mutante heterozigoto com a construção  $llcyc$ , a média de atividade noturna foi reduzida em quase três vezes em relação ao mesmo genótipo sem a construção (Figura 4.15). Além disso, é possível perceber um aparente aumento na média diurna embora não significativo neste caso. Isso indica que  $llcyc$  está, em certo grau, recuperando o padrão de atividade normal, em ciclos de claro-escuro do duplo mutante heterozigoto, pois nas duas médias existe uma tendência de aproximação dos valores àqueles observados em moscas selvagens (CS). Será importante verificar, no entanto, se a construção  $dmcyc$  no mesmo *background* genético apresentará resultados semelhantes, o que indicaria que este efeito se deve simplesmente a cópia extra de  $cyc$ .

Em moscas selvagens, a expressão de  $llcyc$  sob o controle de  $timgal4$  e  $elavgal4$  torna as moscas mais diurnas, pois aumenta a atividade diurna em relação a CS, além de e diminuir a média noturna, acentuando a diferença entre as duas (Figura 4.8). Curiosamente, o controle da expressão de  $llcyc$  por  $pdfgal4$  teve um efeito distinto, causando apenas uma leve diminuição da média noturna. Contudo, o uso do mesmo *driver* causando a superexpressão de

*dmyc* nos pequenos e grandes neurônios ventro laterais, leva a uma inversão de fase, deixando as moscas mais ativas durante a noite. O neuropeptídeo PDF é produzido nos pequenos e grandes neurônios ventro laterais e é requerido para as atividades diárias do marcapasso circadiano (Helfrich-Föster *et al.*, 2000; Blanchardon *et al.*, 2001). A produção de PDF se mantém constante durante o dia, mas sua liberação pelos neurônios laterais é rítmica, o que pode explicar seu efeito no ritmo de atividade das moscas (Inge *et al.*, 2007). Tem sido proposto que PDF tenha a função de mediar a sincronia entre grupos de neurônios importantes no funcionamento do relógio (Lin *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2003). Portanto, ao localizar a expressão de *llcyc* e *dmyc* nos neurônios ventro-laterais, é plausível que a liberação de PDF tenha sido atrapalhada, causando inversão de fase em *pdfgal4/uasdmyc*, e arritmicidade em *pdfgal4/uasllcyc*.

### 5.3 Startle response e atividade total

O *startle response* corresponde a um reflexo das moscas ao acender e ao apagar das luzes. O uso de incubadoras em que as transições (acender ou apagar das luzes) são realizadas bruscamente nos permite avaliar se os genes do relógio interferem nesse parâmetro. Moscas selvagens apresentaram *startle response* ao acender das luzes em torno de duas vezes maior que os mutantes (Figura 4.3). Como as mutações *Clk<sup>jr</sup>* e *cyc<sup>0</sup>* não causam dificuldades visuais no comportamento optomotor, a redução na resposta ao acender das luzes pode ter sido causada pela perda de *per*, uma vez que os mutantes abolem a transcrição de *per* e *tim* (Figura 5.1B,C) (Allada *et al.*, 1998; Rutila *et al.*, 1998).

Estudos anteriores mostraram que mutações em alguns genes podem reduzir o potencial de moscas a responder a estímulos, entre eles estão *shaggy* (*sgg*) e *per* (Engel & Wu, 2009). Então, se *llcyc* estiver aumentando os níveis de Per, como foi observado em *cyc-vp16*, seria esperado que moscas expressando *llcyc* aumentassem o *startle response* em relação a moscas que não têm a construção. De fato, tanto estirpes selvagens, quanto recombinantes expressando *llcyc* aumentaram o *startle response* ao acender das luzes, sugerindo que o transgene, talvez estivesse agindo de forma semelhante a *cyc-vp16*, elevando os níveis de Per (Figuras 4.8 e 4.15). Para confirmar tal efeito seria necessário quantificar os níveis de Per, através da técnica de *western blot*.

O *startle response* ao apagar das luzes é maior no mutante *Clk<sup>jr</sup>* e CS do que no duplo mutante e *cyc<sup>0</sup>* (Figura 4.3). Em moscas selvagens expressando *llcyc* sob o controle dos

promotores *timgal4*, *elavgal4* e *pdfgal4* não são observadas diferenças significativas entre eles e CS. Contudo, no duplo mutante heterozigoto sob o controle de *timgal4*, a expressão de *llcyc* recupera parcialmente o padrão de atividade normal, tornando-o mais parecido com CS (Figura 4.15). Em *Clk<sup>irk</sup>* foi visto um efeito semelhante, *llcyc* também causa a redução do *startle response* ao apagar das luzes, aproximando esse parâmetro ao que é observado em CS (Figura 4.11). Isso sugere que a expressão de *llcyc* também influencia no *startle response* ao apagar das luzes.

Uma das principais características do relógio é adaptação temporal, que permite ao organismo organizar sua fisiologia e atividade locomotora para os momentos adequados (Pittendrigh, 1960). É provável que nos mutantes, essa capacidade tenha sido perdida, uma vez que o oscilador circadiano não está funcionando corretamente, deixando os indivíduos mais, ou menos ativos do que o selvagem. De fato, foi observado que o mutante *Clk<sup>irk</sup>* é mais ativo do que moscas selvagens, contudo *cyc<sup>0</sup>* e o recombinante foram menos ativos que CS (Figura 4.4). A expressão de *llcyc* em moscas com a mutação *Clk<sup>irk</sup>*, assim como no duplo mutante, reduziu a atividade total. Essas linhagens passaram a apresentar um nível de atividade mais próxima do que é observado em moscas selvagens (Figuras 4.15 e 4.16), o que provavelmente reflete uma recuperação da ritmicidade.

## 6. Conclusões e Perspectivas

Os dados indicam que a proteína *Cyc* de *L. longipalpis* é capaz de atuar no relógio circadiano de *D. melanogaster*, provavelmente aumentando os níveis de *Per*. Não obstante, a presença do domínio de ativação BCTR, pode ainda fornecer um possível sítio de ligação para *Cry1*, permitindo que essa proteína funcione nas moscas como repressor do heterodímero  $Clk^{jrk}$ -*LLCyc*, da mesma forma que *Cry2* atua em mamíferos e insetos não-drosofilídeos (Griffin *et al.*, 1999; Kume *et al.*, 1999). Esse efeito sinérgico, provavelmente foi determinante para a redução do período e o grande número de indivíduos arrítmicos.

Apesar de *L. longipalpis* ser um inseto crepuscular noturno, a expressão de *llcyc* não tornou as moscas menos diurnas. É possível que outros níveis de controle estejam atuando na determinação do padrão de atividade circadiana dessas moscas. Nas sequências de *llcyc* foram identificados potenciais sítios de regulação pós-traducional, como sumoilação e fosforilação, também presentes em *dmcyc* (Meiros-Filho *et al.*, 2006). No entanto em um transcrito alternativo raro de *llcyc* foi evidenciada a falta de uma arginina, sugerindo que outros níveis de regulação, como *splicing* alternativo, por exemplo, podem ocorrer em *L. longipalpis* (Meiros-Filho *et al.*, 2006).

Uma abordagem interessante e geneticamente simples que pretendemos aplicar no futuro é aumentar as doses de *llcyc* em *D. melanogaster*, para examinar o efeito de dosagem. Isto tem sido estudado desde 1982, quando Smith & Konopka usaram métodos de genética clássica de *Drosophila* para mostrar que o aumento na dose do gene *period* encurtava o período (Smith & Konopka, 1982). Recentemente, foi visto que um modesto decréscimo na dose do gene *vri* (*vri*) diminui o tamanho do período (Blau & Young, 1999), e um modesto aumento da dose de *Clk*, também diminui o período (Kadener *et al.*, 2008). Um aumento do ortólogo a *Clk* em mamíferos tem um efeito similar (Antoch *et al.*, 1997). Isso sugere que a taxa de transcrição dos genes de relógio são limitantes para o período circadiano (Rosbash, 2009). Desta forma seria interessante avaliar o efeito de dosagem de *llcyc* em *D. melanogaster*.

Ampliaremos também as análises principalmente de linhagens em que não conseguimos um bom número de indivíduos e confirmar que as inserções *timgal4*, *elavgal4* e *pdfgal4* não afetam por si só alguns dos parâmetros que avaliamos. Além disso, iremos testar a construção *uasdmcyc* nos mesmos *backgrounds* genéticos de *uasllcyc*, ainda não testados,

para se certificar de que o efeito observado se deve a presença do domínio BCTR presente em *llcyc*.

No futuro pretendemos realizar a quantificação dos níveis de expressão de *llcyc* sob o controle de *timgal4*, *elavgal4* e *pdfgal4*, utilizando a técnica de PCR em tempo-real. Além disso, como mencionado anteriormente, seria interessante realizar *western-blots* com um anticorpo anti-Per para verificar se os níveis desta proteína estão aumentados nas moscas carregando a construção *llcyc*. Testaremos também a expressão de *llcyc* no mutante simples  $Clk^{jrk}$  e no duplo,  $Clk^{jrk},cyc^0$  em homozigose, para avaliar se a construção é capaz de recuperar completamente o ritmo nessas moscas.

Por fim, as linhagens geradas durante a realização deste projeto, como o duplo mutante ( $Clk^{jrk},cyc^0$ ) e os transgênicos de *D. melanogaster* carregando *llcyc*, serão ferramentas úteis no estudo de outros aspectos do relógio circadiano de *L. longipalpis* e de outros insetos vetores.

## Referências:

Allada R, White NE, So WV, Hall JC, Rosbash M. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell*. 1998. 93: 791-804.

Antoch MP, Song EJ, Chang AM, Vitaterna MH, Zhao Y, Wilsbacher LD, Sangoram AM, King DP, Pinto LH, Takahashi JS. Functional identification of mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell*. 1997; 89: 655-67.

Aschoff J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symp*. 1960. *Quant. Biol.*, 25: 11-18.

Ashburner M, Golic KG, Hawley RS. *Drosophila – a laboratory handbook*. 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005.

Bachleitner W, Kempinger L, Wülbeck C, Rieger D, Helfrich-Förster C. Moonlight shifts the endogenous clock of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104:3538-3543.

Blanchardon E, Grima B, Klarsfeld A, Chelot E, Hardin PE, Preat T, et al. Defining the role of *Drosophila* lateral neurons in the control of circadian rhythms in motor activity and eclosion by targeted genetic ablation and PERIOD protein overexpression. *Eur J Neurosci*. 2001;13: 871–88.

Blau J, Young MW. Cycling *vrille* expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell*. 1999; 99:661–71.

Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 1993; 118: 401-415.

Circadian Rhythm Laboratory. X2 periodogram [Internet]. USA: University of South Carolina. [atualizado em 2010 Abr; acesso em 2010 Jan]. Disponível em <http://www.circadian.org/periodogram.html>

Citri Y, Colot HV, Jacquier AC, Yu Q, Hall JC, Baltimore D, Rosbash M. A family of unusually spliced biologically active transcripts encoded by a *Drosophila* clock gene. *Nature*.1987; 326: 42-47.

Collins B, Mazzoni EO, Stanewsky R, Blau J. *Drosophila* CRYPTOCHROME is a circadian transcriptional repressor. *Curr. Biol*.2006; 16:441–9.

Daan S, Pittendrigh CS. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and lability of spontaneous frequency. *J. Comp. Physiol*. 1976; 106A:223-252.

Dubruille R, Emery P. A plastic clock: how circadian rhythms respond to environmental cues in *Drosophila*. *Molecular Neurobiology*. 2008; 38: 129–145.

Duffy, JB. GAL4 System in *Drosophila*: A Fly Geneticist's Swiss Army Knife. *Genesis*. 2002; 34: 1–15.

Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC, Rosbash M. CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*. 1998; 95:669–679.

Emery P, Stanewsky R, Helfrich-Förster C, Emery-Le M, Hall JC, Rosbash M. *Drosophila* CRY is a deep brain circadian photoreceptor. *Neuron*. 2000; 26:493–504.

Engel JE, Wu CF. Neurogenetic approaches to habituation and dishabituation in *Drosophila*. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2009; 92: 166-75.

Gesto, JSM. Genética molecular do gene Clock em insetos vetores [dissertação]. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, mestrado, pós-graduação em biologia celular e molecular; 2008.

Giniger E, Varnum SM, Ptashne M. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell*. 1985; 40: 767–774.

Griffin EA, Staknis A, Weitz CJ. Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science*. 1999; 286: 768–71.

Hardin PE, Hall JC, and Rosbash M Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*. 1990; 343:536-540.

Hardin PE. The Circadian Timekeeping System of *Drosophila*. *Curr Biol*. 2005; 15:R714-R22.

Helfrich-Förster C, Homberg U. Pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the nervous system of wildtype *Drosophila melanogaster* and of several mutants with altered circadian rhythmicity. *J. Comp. Neurol*. 1993; 337: 177–190.

Helfrich-Förster C, Tauber M, Park JH, Muhlig-Versen M, Schneuwly S, Hofbauer A. Ectopic expression of the neuropeptide pigment dispersing factor alters behavioral rhythms in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci*. 2000; 20: 3339–53.

Indiana University. Fly base - A Database of *Drosophila* Genes & Genomes [Internet]. USA: Indiana University, Indiana. [atualizado em 2010 Mar 23; acesso em 2008]. Disponível em <http://flybase.org/>.

Jackson FR. The isolation of biological rhythm mutations on the autosomes of *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet*. 1983;1:3–15.

Kadener S, Menet JS, Schoer R, Rosbash M. Circadian transcription contributes to core period determination in *Drosophila*. *PLOS Biology*. 2008; 6, issue 5, e119.

Kaneko M, Hall JC. Neuroanatomy of cells expressing clock genes in *Drosophila*: transgenic manipulation of the period and timeless genes to mark the perikarya of circadian pacemaker neurons and their projections. *J. Comp. Neurol*. 2000; 422: 66–94.

Kaneko M. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1998; 8: 652–658.

Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1971; 68: 2112–2116.

Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell.* 1999; 98: 193–205.

Laughon A, Gesteland RF. Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Mol Cell Biol.* 1984; 4: 260–267.

Laughon A, Driscoll R, Wills N, Gesteland RF. Identification of two proteins encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Mol Cell Biol.* 1984. 4: 268–275.

Lin F-J, Song W, Meyer-Bernstein E, Naidoo N, Sehgal A. Photic signaling by cryptochrome in the *Drosophila* circadian system. *Mol Cell Biol.* 2001; 21:7287–7294.

Lin Y, Stormo GD, Taghert PH. The neuropeptide pigmentdispersing factor coordinates pacemaker interactions in the *Drosophila* circadian system. *J Neurosci* 2004; 24: 7951–7.

Meirelles-Filho AC. Análise Funcional Comparativa do Relógio Circadiano de *Drosophila melanogaster* e insetos vetores [tese]. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, doutorado, pós-graduação em biologia celular e molecular; 2008.

Meirelles-Filho AC, Amoretty PR, Souza NA, Kyriacou CP, Peixoto AA. Rhythmic expression of the cycle gene in a hematophagous insect. *BMC Molecular Biology.* 2006a; 7: 7-38.

Meirelles-Filho AC, Rivas GBS, Gesto JS, Machado RC, Britto C, Souza NA, Peixoto AA: The biological clock of an hematophagous insect: locomotor activity rhythms, circadian expression and downregulation after a blood meal. *FEBS Letters.* 2006b, 580:2-8.

Menna-Barreto L, Marques N. *Cronobiologia: Princípios e Aplicações.* 3<sup>a</sup> ed, Edusp, 2003.

Mertens I, Husson SJ, Janssen T, Lindermans M, Schoofs L. PACAP and PDF signaling in the regulation of mammalian and insect circadian rhythms. *Peptides*. 2007; 28: 1775-83.

Moore-Ede MC, Sulzman FM, Fuller CA. *The clock that time us – Physiology of circadian timing system*, Harvard University Press. 2ed.1984.

Oshima Y. *Regulatory circuits for gene expression: the metabolism of galactose and phosphate*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1982.

Park JH, Helfrich-Förster C, Lee G, Liu L, Rosbash M, Hall JC. Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97: 3608–3613.

Peng Y, Stoleru D, Levine JD, Hall JC, Rosbash M. *Drosophila* free-running rhythms require intercellular communication. *PLoS Biol*. 2003; 1: E13.

Petri B, Stengl M. Phase response curves of a molecular model oscillator: implications for mutual coupling of paired oscillators. *J Biol Rhythms*. 2001; 16:125-141.

Picot M, Cusumano P, Klarsfeld A, Ueda R, Rouyer F. Light activates output from evening neurons and inhibits output from morning neurons in the *Drosophila* circadian clock. *PLoS Biol*. 2007; 5: e315.

Pittendrigh CS. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold spring harbor Symp*. 1960. *Quant. Biol.*, 25: 159-184.

Pittendrigh CS. Entrainment. In: Aschoff J. (org.). *Handbook of Behavioral Neurobiology – Circadian Rhythms*, vol4. New York: Plenum Press; 1981. 95-124.

Renn, SC, Park JH, Rosbash M, Hall JC, Taghert PH. A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell*. 1999; 99: 791–802.

Rieger D, Shafer OT, Tomioka K, Helfrich-Forster C. Functional analysis of circadian pacemaker neurons in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* 2006; 26:2531–2543.

Roberts D.B. *Drosophila, A Practical Approach*. 2<sup>a</sup> Ed. New York, NY: Oxford University Press; 1998.

Rosbash, M. The implications of multiple circadian clock origins. *PLOS Biology*. 2009; 7(3): 421-425.

Rutila JE, Suri V, Le M, So WV, Rosbash M, Hall JC. Cycle is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell*. 1998 May 29; 93: 805–814.

Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Smith, RF, Konopka, RJ. Effects of dosage alterations at the per locus on the period of the circadian clock of *Drosophila*. *Mol. Gen. Genet.* 1982; 189: 30–36.

Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, Kay SA, Rosbash M, Hall JC. The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*. 1998; 95:681–692.

Yoshii T, Todo T, Wulbeck C, Stanewsky R, Helfrich-Forster C. Cryptochrome is present in the compound eyes and a subset of *Drosophila*'s clock neurons. *J. Comp. Neurol.* 2008; 508: 952–966.

Young, M. The Tick-Tock of the Biological Clock. *Scientific American*. 2000; 64-71.

Yuan Q, Metterville D, Briscoe AD, and Reppert SM. Insect cryptochromes: Gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *Mol Biol Evol.* 2007; 24: 948-55.

Yuan Q, Metterville D, Briscoe AD, Reppert SM. Insect Cryptochromes: Gene Duplication and Loss Define Diverse Ways to Construct Insect Circadian Clocks. *Mol. Biol. Evol.* 2008; 24(4): 948–55.

Zhu H, Yuan Q, Briscoe AD, Froy O, Casselman A, Reppert SM. The two CRYs of the butterfly. *Curr Biol.* 2005; 15: 953-4.

Zhu H, Sauman I, Yuan Q, Casselman A, Emery-Le M, Emery P, and Reppert SM. Cryptochromes define a novel circadian clock mechanism in monarch butterflies that may underlie sun compass navigation. *PLoS Biol.* 2008; 6:e4.