

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

JÉSSICA RODRIGUES ASSUNÇÃO BEZERRA

Bases genéticas e regulatórias da variação no perfil de atividade de voo associada à reprodução em machos de *Aedes aegypti*.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadoras: Prof. Dra. Rafaela Vieira Bruno
Prof. Dra. Luciana Ordunha Araripe

RIO DE JANEIRO
2020

Rodrigues Assunção Bezerra, Jéssica .

Bases genéticas e regulatórias da variação no perfil de atividade de voo associada à reprodução em machos de *Aedes aegypti*. / Jéssica Rodrigues Assunção Bezerra. - Rio de Janeiro, 2020.

83 f.

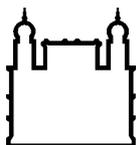
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2020.

Orientadora: Rafaela Vieira Bruno.

Co-orientadora: Luciana Ordunha Araripe.

Bibliografia: f. 75-83

1. *Aedes aegypti*. 2. Relógio circadiano. 3. Comportamento . 4. Reconhecimento pre-cópula. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: JÉSSICA RODRIGUES ASSUNÇÃO BEZERRA

Bases genéticas e regulatórias da variação no perfil de atividade de voo associada à reprodução em machos de *Aedes aegypti*.

ORIENTADORAS: Prof. Dra. Rafaela Vieira Bruno
Prof. Dra. Luciana Ordunha Araripe

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Otacilio da Cruz Moreira – **Presidente**

FIOCRUZ / Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dra. Daniele Pereira de Castro

FIOCRUZ / Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dra. Gisele Akemi Oda

USP / Instituto de Biociências

Prof. Dr. Márcio Zikán Cardoso

UFRN / Centro de Biociências

Prof. Dr. Márcio Galvão Pavan

FIOCRUZ / Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro, 13 de maio de 2020

Dedico esta dissertação aos meus pais
Rosangela Lima Rodrigues e
Marco Antonio A. Bezerra.



Laboratório de Biologia Molecular de Insetos
Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz

APOIO:



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ser minha força e por ter permitido que eu ultrapassasse todos os obstáculos encontrados ao longo desses anos.

Aos meus pais Rosângela Rodrigues e Marco Assunção, por todo apoio, suporte e confiança. Obrigada por todo carinho e por sempre acreditarem em mim e incentivarem os meus sonhos e planos.

Aos meus familiares, que estão sempre torcendo por mim. Obrigada pelo carinho e por entenderem as minhas ausências durante esses anos. Em especial gostaria de agradecer a Tia Dorinha, Tia Bida, Tia Lola, Tio Zinho, Tia Luiza, Tio Guilherme e aos meus primos.

Às minhas orientadoras, Dra. Rafaela Bruno e Dra. Luciana Araripe, pela oportunidade e confiança. Obrigada por terem me acolhido no LABIMI desde a iniciação científica, sou muito grata a todos os ensinamentos, conselhos e incentivos que vocês me deram ao longo de todos esses anos.

À toda equipe LABIMI: Andresa, Rayanne, Duda, Aline, Lourdinha, Robson, Leticia, Gabi, Karine e Luana. Vocês foram fundamentais nessa caminhada. Obrigada por todos os momentos de aprendizado, por todas as vezes que vocês me ajudaram e por todos os momentos de descontração.

Às minhas amigas: Aline, Graciana, Marcelly, Pamela e Hanna. Obrigada por não desistirem de mim depois de tantos furos. Vocês podem não ter noção da importância que vocês têm nessa conquista, mas cada palavra de apoio, cada preocupação de vocês comigo e o carinho nos momentos difíceis foram essenciais durante essa jornada.

Ao meu namorado Thales Xavier, por todo amor e paciência. Foram dois anos desafiadores e com períodos difíceis, seu carinho e paciência foram essenciais durante essa jornada. Muito obrigada por estar sempre ao meu lado e fazendo o seu máximo para me ver feliz.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro, às agências de fomento CNPq, FAPERJ, LABIMI e Instituto Oswaldo Cruz.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Comportamento Reprodutivo em Mosquitos	1
1.2 Comportamento Rítmico e o Relógio Circadiano.....	4
1.3 Regulação do Relógio Circadiano no organismo modelo <i>Drosophila melanogaster</i>	6
1.3.1 As três alças regulatórias do relógio circadiano em <i>D. melanogaster</i>	7
1.4 Organização do Relógio circadiano em <i>Drosophila melanogaster</i>	10
1.5 O Relógio Circadiano em <i>Aedes aegypti</i>	11
1.6 Atividade locomotora/voo em machos de <i>Ae. aegypti</i>	15
2 OBJETIVOS	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Criação de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> até o estágio adulto	19
3.2 Remoção de antenas dos machos	20
3.3 Desenho experimental do sistema de confinamento de fêmeas	20
3.4 Experimentos de exposição de machos à presença de fêmeas	21
3.5 Coleta de machos para dissecação.....	22
3.6 Extração de RNA.....	23
3.7 Síntese de cDNA	23
3.8 PCR quantitativo em Tempo Real	24

3.9	Análise estatística.....	27
4	RESULTADOS.....	28
4.1	Perfis de expressão dos genes de relógio em amostras de cabeças, antenas e pontas de abdômen de machos de <i>Ae. aegypti</i> , expostos ou não a fêmeas	28
4.1.1	Expressão do gene <i>period</i> em cabeças de machos com antenas e sem antenas expostos ou não à presença de fêmeas	28
4.1.2	Expressão do gene <i>period</i> em pontas de abdômen de machos com antenas e sem antenas expostos ou não à presença de fêmeas.....	31
4.1.3	Expressão do gene <i>period</i> em antenas de machos expostos ou não à presença de fêmeas	33
4.1.4	Expressão do gene <i>cycle</i> em cabeças de machos com antenas e sem antenas expostos ou não à presença de fêmeas.....	34
4.1.5	Expressão do gene <i>cycle</i> em pontas de abdômen de machos com antenas e sem antenas expostos ou não à presença de fêmeas.....	36
4.1.6	Expressão do gene <i>cycle</i> em antenas de machos expostos ou não à presença de fêmeas.....	38
4.1.7	Expressão do gene <i>cryptochrome 2</i> em cabeças de machos com antenas e sem antenas expostos ou não à presença de fêmeas.....	39
4.1.8	Expressão do gene <i>cryptochrome 2</i> em pontas de abdômen de machos com antenas e sem antenas expostos ou não à presença de fêmeas.....	41
4.1.9	Expressão do gene <i>cryptochrome 2</i> em antenas de machos expostos ou não à presença de fêmeas	43
4.2	Perfis de expressão dos genes <i>orco</i> e <i>fruitless</i> em amostras de cabeças, antenas e pontas de abdômen de machos de <i>Ae. aegypti</i> expostos ou não a fêmeas.....	44
5	DISCUSSÃO	49
5.1	Expressão dos genes de relógio <i>period</i> , <i>cycle</i> e <i>cryptochrome 2</i>	50
5.2	Expressão dos genes <i>Orco</i> e <i>fruitless</i>	55

6	CONCLUSÕES	58
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1:	Representação do experimento realizado por Jean Jacques d'Ortous de Mairan.	5
Figura 1.2:	Representação da primeira alça do Relógio Circadiano, no organismo modelo <i>D. melanogaster</i>	8
Figura 1.3:	Representação da segunda e terceira alça do Relógio Circadiano, no organismo modelo <i>D. melanogaster</i>	9
Figura 1.4:	Perfil de expressão dos principais genes do relógio circadiano em <i>Ae. aegypti</i> e <i>C. quinquefasciatus</i>	13
Figura 1.5:	Perfil de expressão dos genes <i>cry1</i> e <i>cry2</i> , em <i>Ae. aegypti</i> e <i>C. quinquefasciatus</i>	14
Figura 1.6:	Média da atividade locomotora/voo de machos e fêmeas de <i>Ae. aegypti</i>	15
Figura 1.7:	Média da atividade locomotora/voo de machos de <i>Ae. aegypti</i> , em diferentes condições.	16
Figura 3.1:	Desenho experimental do Sistema de Tubos de Confinamento	20
Figura 3.2:	Fotos do Sistema de Tubos de Confinamento.	21
Figura 4.1:	Expressão do gene <i>period</i> , ao longo de 24 horas, em cabeças de machos de <i>Ae. aegypti</i>	30
Figura 4.2:	Expressão do gene <i>period</i> , ao longo de 24 horas, em pontas de abdômen de machos de <i>Ae. aegypti</i>	32
Figura 4.3:	Expressão do gene <i>period</i> , ao longo de 24 horas, em antenas de machos de <i>Ae. aegypti</i>	33
Figura 4.4:	Expressão do gene <i>cycle</i> , ao longo de 24 horas, em cabeças de machos de <i>Ae. aegypti</i>	35
Figura 4.5:	Expressão do gene <i>cycle</i> , ao longo de 24 horas, em pontas de abdômen de machos de <i>Ae. aegypti</i>	37
Figura 4.6:	Expressão do gene <i>cycle</i> , ao longo de 24 horas, em antenas de machos de <i>Ae. aegypti</i>	38
Figura 4.7:	Expressão do gene <i>cry2</i> , ao longo de 24 horas, em cabeças de machos de <i>Ae. aegypti</i>	40
Figura 4.8:	Expressão do gene <i>cry2</i> , ao longo de 24 horas, em pontas de abdômen de machos de <i>Ae. aegypti</i>	42

Figura 4.9: Expressão do gene <i>cry2</i> , ao longo de 24 horas, em antenas de machos de <i>Ae. aegypti</i>	43
Figura 4.10: Expressão do gene <i>Orco</i> , ao longo de 24 horas, em cabeças de machos de <i>Ae. aegypti</i>	45
Figura 4.11: Expressão do gene <i>Orco</i> , ao longo de 24 horas, em antenas de machos de <i>Ae. aegypti</i>	46
Figura 4.12: Expressão do gene <i>fruitless</i> , ao longo de 24 horas, em cabeças de machos de <i>Ae. aegypti</i>	47
Figura 4.13: Expressão do gene <i>fruitless</i> , ao longo de 24 horas, em pontas de abdômen de machos de <i>Ae. aegypti</i>	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Concentração e volume dos reagentes utilizados na síntese de cDNA das amostras.....	24
Tabela 3.2: Concentração e volume dos componentes utilizados nas reações de PCR quantitativo em Tempo Real	24
Tabela 3.3: Primers utilizados nas reações de PCR quantitativo em Tempo Real. ..	26

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BCTR = do inglês *BMAL (Brain and Muscle Arnt-Like) C-terminal region* – região C-terminal de BMAL.

cDNA = do inglês *complementary Deoxyribonucleic Acid* – DNA complementar.

CK2 = proteína CASEIN KINASE 2.

clk = gene *Clock*.

CLK = proteína CLOCK.

cry1 = gene *cryptochrome 1*.

CRY = proteína CRYPTOCHROME.

cry2 = gene *cryptochrome 2*.

CT = do inglês *Circadian time* - tempo medido em horas de um período sem variações ambientais.

C_T = *threshold cycle*.

cwo = gene *clockwork orange*.

CWO = proteína CLOCKWORK ORANGE.

cyc = gene *cycle*.

CYC = proteína CYCLE.

DBT = proteína DOUBLE-TIME.

DNs = do inglês dorsal neurons - neurônios dorsais.

DD = do inglês *Dark/Dark*. Regime artificial de escuro constante.

dNTP = do inglês *Deoxyribonucleotide triphosphate* - Desoxirribonucleotídeo trifosfato.

E-box = do inglês *Enhancer Box*.

FRU = proteína FRUITLESS.

LD = do inglês *Light/Dark* – regime claro/escuro.

LN_s = do inglês lateral neurons - neurônios laterais.

l-LNVs = do inglês large ventrolateral neurons - neurônios ventro-laterais grandes.

s-LNVs = do inglês small ventrolateral neurons - neurônios ventro-laterais pequenos

mRNA = do inglês *messenger RNA* - RNA mensageiro.

n = número de indivíduos testados.

Orco = co-receptor olfativo.

ORx = receptor olfativo.

P = probabilidade de que um resultado seja falso positivo, ou seja, que uma diferença entre grupos seja atestada sem que seja verdadeira.

PCR = do inglês *Polimerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase.

Pdp1 = gene *PAR domain protein 1*.

PDP1 = proteína PAR DOMAIN PROTEIN 1.

per = gene *period*.

PER = proteína PERIOD.

RNA = do inglês *Ribonucleic Acid* – Ácido Ribonucleico.

SGG = proteína SHAGGY.

tim = gene *timeless*.

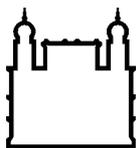
TIM = proteína TIMELESS.

V/P-box = VRI/PDP-box.

vri = gene *vrille*.

VRI = proteína VRILLE.

ZT = *Zeitgeber time* – Qualquer estímulo externo ou ambiental que sincronize o relógio biológico de organismos vivos em um período de 24 horas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

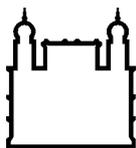
Bases genéticas e regulatórias da variação no perfil de atividade de voo associada à reprodução em machos de *Aedes aegypti*.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jéssica Rodrigues Assunção Bezerra

O estudo de características comportamentais e fisiológicas em mosquitos tem sido feito principalmente em fêmeas, já que os machos não são hematófagos e por isso não são vetores de parasitas que causam doenças na população humana. No entanto, o estudo do comportamento reprodutivo de machos é de grande importância, já que dele depende o sucesso reprodutivo e a perpetuação da espécie. O reconhecimento e a corte configuram a comunicação pré-cópula entre machos e fêmeas e são etapas essenciais para que a cópula seja bem-sucedida. Portanto, qualquer fator que altere o reconhecimento pré-cópula pode afetar o crescimento populacional dessas espécies. O conhecimento acerca desse tema tem potencial de gerar informações úteis para o avanço de estratégias de controle de vetores. Funções como reprodução, alimentação e oviposição estão associadas com a atividade locomotora, e algumas dessas funções ocorrem em ciclos rítmicos. Quando estes ciclos se mantêm em condições de claro/escuro e escuro constante, estão sob a regulação de um marca-passo endógeno, chamado de relógio circadiano. Em Araripe *et al.* (2018), nosso grupo estudou o comportamento de machos de *Aedes aegypti* e foi encontrado que os machos têm sua atividade locomotora significativamente alterada quando expostos a fêmeas virgens confinadas. A partir disso, os objetivos deste projeto foram investigar se a alteração comportamental observada em machos expostos a fêmeas está associada com alterações em nível de expressão de alguns dos principais genes do relógio circadiano e genes envolvidos com a percepção olfativa e com o comportamento reprodutivo, ao longo de 24 horas (LD12:12). Reações de PCR Quantitativo em Tempo Real foram realizadas para os genes *period*, *cycle*, *cryptochrome 2*, *Orco* e *fruitless* em amostras de cabeças, antenas e pontas de abdômen de machos nas seguintes condições: “machos sozinhos”, “machos com fêmeas”, “machos sem antenas sozinhos” e “machos sem antenas com fêmeas”. O gene *period* apresentou um padrão de expressão conservado em todas as tecidos e condições. O gene *cycle* apresentou uma variação no pico de expressão, dentro da fase clara, em todos tecidos, enquanto o vale foi bem definido. O gene *cryptochrome 2* apresentou diferenças entre as condições, sugerindo que a presença de fêmeas tem efeito sobre a expressão. Em cabeças, pontas de abdômen e antenas de machos com fêmeas, o perfil de expressão de *cry2* apresentou uma maior diferença entre a amplitude da expressão no início da fase clara e o pico de expressão na fase escura, do que a diferença observada nos machos sozinhos. Já para os genes *Orco* e *fruitless* foram observados perfis arrítmicos. A ablação de antenas não afetou o perfil de expressão dos genes estudados, sugerindo que machos sem antenas conseguem perceber a presença de fêmeas por outros sentidos que não a audição e o olfato (ex: visão e tato).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Bases genéticas e regulatórias da variação no perfil de atividade de voo associada à reprodução em machos de *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jéssica Rodrigues Assunção Bezerra

The study of behavioral and physiological traits in mosquitoes has been performed mainly in females, since males are not hematophagous and thus, do not transfer the parasites that cause diseases in human populations. However, the study of male reproductive behavior is important because the reproductive success and the perpetuation of the species also depend on the performance of male mosquitoes. Both recognition and courtship compose the pre-copulatory communication between males and females and are essential steps for the success of copulation. Therefore, any factor that leads to a recognition failure can interfere with the growth of mosquito populations. The knowledge about this topic has the potential to generate useful information for the improvement of vector control strategies. Functions like reproduction, feeding and oviposition are associated with locomotor activity, and some of these functions occur in rhythmic cycles. When these cycles are stable in light/dark and constant dark conditions, they are under the regulation of an endogenous pacemaker, called circadian clock. In Araripe et al. (2018), we studied the behavior of *Aedes aegypti* male mosquitoes and found that males in the presence of virgin females have their locomotor activity significantly altered. Given these previous results, the goals of this project were to investigate whether the alteration in the locomotor activity of males exposed to females is associated with changes in the expression level of some of the main circadian clock genes and genes involved with olfactory perception and reproductive behavior, over 24 hours (LD12:12). Real-time Quantitative PCR reactions were performed for the genes *period*, *cycle*, *cryptochrome 2*, *Orco* and *fruitless* in samples of heads, antennae and abdominal tips of males in the following conditions: "solitary males", "males with females", "solitary males with ablated antennae" and "males with ablated antennae in the presence of females". The gene *period* showed a conserved expression pattern in all tissues and conditions. The gene *cycle* showed a variable peak of expression, within the light phase, in all tissues, whereas the trough was well defined across conditions. The gene cryptochrome 2 (*cry2*) showed variation among conditions, suggesting that female presence affects gene expression. In heads, abdominal tips and antennae of males exposed to females, the expression profile of *cry2* showed a greater difference between the amplitude of expression in the beginning of the light phase and the expression peak in the dark phase, when compared to the difference found in solitary males. For the genes *Orco* and *fruitless*, arrhythmic profiles were found. The ablation of antennae did not cause a significant effect on the expression profile of the genes, suggesting that males with ablated antennae are able to detect the presence of females by other senses than hearing and olfaction (eg: vision and touch).

1 INTRODUÇÃO

1.1 Comportamento Reprodutivo em Mosquitos

O estudo de características comportamentais e fisiológicas em mosquitos tem sido feito principalmente em fêmeas e negligenciado em machos (Klowden, 1999; Ferguson et al., 2005; Diabaté & Tripet, 2015; Vaníčková et al., 2016). O principal motivo para os machos não serem tão estudados quanto as fêmeas é porque os machos não são hematófagos, e por isso não transmitem parasitas que causam doenças na população humana (Diabaté & Tripet, 2015). No entanto, aspectos da biologia dos machos garantem o sucesso reprodutivo e a perpetuação de sua espécie. Dentre os eventos que garantem o sucesso reprodutivo, o reconhecimento e a corte configuram a comunicação pré-cópula entre machos e fêmeas. Portanto qualquer fator que altere o reconhecimento pré-cópula poderá comprometer o sucesso reprodutivo do indivíduo e o crescimento populacional. Logo, o estudo do comportamento de reconhecimento tem potencial de gerar informações úteis para o avanço de estratégias de controle de vetores (Ferguson et al., 2005; Benelli, 2015; Vaníčková et al., 2016)

Em *Drosophila melanogaster*, que é o organismo modelo para o estudo de insetos, o comportamento de corte compreende as seguintes etapas: a orientação do macho em direção à fêmea, o toque, o canto ou sonorização através da vibração das asas, o toque da genitália com o aparelho bucal e a tentativa de cópula. Durante essas etapas, a comunicação entre machos e fêmeas acontece através dos sentidos de audição, olfato, visão, tato e paladar (revisado em Yamada & McGraw, 2010). Nesse organismo, aspectos do comportamento de corte dos machos são regulados pelo gene *fruitless*. Machos mutantes para esse gene exibem comprometimento em quase todas as etapas da corte e conseqüentemente se tornam estéreis. Além disso, mesmo com o comportamento de corte comprometido, esse machos exibem elevados níveis de cortejo com outros machos selvagens, ou seja, o gene *fruitless* também é importante para a orientação sexual nesse organismo (Ryner et al., 1996; Demir & Dickson, 2005; revisado em Yamada & McGraw, 2010). A ocorrência de homólogos de *fruitless* já foi descrita em diversos dípteros, no entanto, o papel desse gene no

comportamento de corte dos mosquitos ainda precisa ser elucidado (Meier et al., 2013).

Em mosquitos, é proposto que a comunicação entre os machos e fêmeas acontece através dos sons emitidos pelo batimento das asas, que são percebidos pelas antenas (Göpfert et al., 1999; Gibson et al., 2010). Estruturalmente, as antenas dos mosquitos são divididas em duas partes. A primeira parte consiste nos segmentos flagelares e geralmente sua forma depende do sexo do mosquito. Os machos possuem mais pelos na porção flagelar do que as fêmeas, e por isso as antenas dos machos são chamadas de plumosas, enquanto as das fêmeas são chamadas de pilosas. A segunda parte das antenas, consiste no órgão de Johnston, que é localizado na parte basal das antenas e é responsável pela transdução das vibrações captadas pelos flagelos (Roth, 1948; Consoli & Lourenço-De-Oliveira, 1994; Göpfert and Robert 2000). Nos últimos anos, diversos estudos demonstraram que os machos parecem não só detectar as fêmeas através dos sons emitidos pelo batimento de asas, mas também responder ativamente a esses sons alterando a sua própria frequência e resultando numa convergência harmônica (Cator et al., 2009; Warren et al., 2009; Pennetier et al., 2010). Em relação ao comportamento de cópula, em *Ae. aegypti* também já foi descrito um padrão. Esse comportamento começa com a orientação do macho em direção à fêmea, que pode ser em voo ou pousado, depois o contato tátil entre eles, em seguida o macho se move para a frente da fêmea, nessa posição ele segura o tarso da fêmea, eles se alinham ventralmente e fazem contato genital para a tentativa de cópula (Aldersley & Cator, 2019). Geralmente as fêmeas de *Ae. aegypti* possuem comportamento monogâmico (Craig, 1967), tornando-se refratárias a novas tentativas de cópula durante algum tempo após a cópula (Degner & Harrington, 2016), e os machos possuem comportamento poligâmico (Clements, 1999).

Outra característica que tem um importante papel na biologia dos mosquitos é a sua capacidade olfativa, ou seja, a capacidade de detectar odores. Para responder a uma diversidade de sinais químicos, com a finalidade de localizar hospedeiros, fontes de alimentos e parceiros reprodutivos, os insetos necessitam de receptores químicos especializados (receptores olfativos, receptores ionotrópicos e receptores gustativos) (Bohbot & Pitts, 2015). A transdução desses sinais químicos pode configurar as decisões comportamentais, que vão determinar o sucesso de sobrevivência e reprodução. Os receptores olfativos funcionais são formados por duas

subunidades, o co-receptor (*Orco*) e o receptor (*ORx*), e são encontrados nos anexos periféricos como antenas e aparelho bucal (revisado em Guidobaldi et al., 2014).

Curiosamente, em um estudo de Pitts e colaboradores (2014), foram identificados alguns receptores olfativos e o co-receptor *Orco* expressos em tecidos não-olfativos, como os testículos de mosquitos *Anopheles gambiae*. A presença desses receptores nos testículos levantou a hipótese de eles exercerem alguma função nos espermatozoides, mediando a resposta a sinais químicos. A fim de explorar a função desses receptores nos testículos, eles analisaram os movimentos dos flagelos dos espermatozoides em resposta a uma variedade de compostos naturais e sintéticos. Os batimentos dos flagelos aumentaram significativamente quando eles foram expostos a dois agonistas de *Orco*. No entanto, quando eles foram expostos a um antagonista de *Orco* os movimentos dos flagelos não foram ativados. Além disso, a resposta dos espermatozoides expostos aos dois agonistas diminuiu significativamente na presença do antagonista. Entre alguns experimentos, os autores analisaram a ação de alguns odorantes ligantes de receptores olfativos e encontraram que alguns compostos químicos ativaram os movimentos dos flagelos dos espermatozoides, dependendo da concentração utilizada. Além disso, a atividade dos compostos foi inibida na presença do antagonista de *Orco*, sugerindo que essa resposta dos receptores olfativos aos compostos necessita do co-receptor *Orco* (Pitts et al., 2014). Nesse estudo os autores também utilizaram uma linhagem de *Ae. aegypti*, onde os indivíduos foram modificados por mutagênese para não expressarem o co-receptor *Orco*. Os espermatozoides de indivíduos da linhagem selvagem responderam a aplicação do agonista de *Orco*, enquanto os indivíduos da linhagem mutante não responderam. Esses resultados sugerem que receptores olfativos funcionais, ou seja, o complexo formado pelo receptor olfativo e o co-receptor *Orco*, participam da ativação dos espermatozoides. Assim, além de sua importância nos tecidos olfativos, os receptores olfativos podem estar, diretamente, desempenhando um papel na reprodução.

Como foi abordado acima, a capacidade olfativa é importante para uma diversidade de funções como por exemplo a busca por hospedeiro, por alimento, por parceiros reprodutivos e por sítios de oviposição. Como os insetos exibem ciclos rítmicos de atividade locomotora, e essas funções ocorrem quando estão ativos, é possível que os mecanismos moleculares que regulam o comportamento rítmico

também possam ter um papel importante na regulação dos receptores de sinais químicos ambientais e biológicos.

1.2 Comportamento Rítmico e o Relógio Circadiano

A maioria dos organismos estão expostos a variações ambientais periódicas, como ciclos diários de luz e escuro e ciclos estacionais de temperatura. Essas variações são fenômenos inerentes ao movimento de rotação da Terra em torno de seu próprio eixo, e ao longo da evolução, levaram os organismos a desenvolverem estratégias para ajustarem seus processos fisiológicos e comportamentais a esses ciclos. Assim, diversas espécies passaram a apresentar oscilações diárias desses processos com um período de aproximadamente 24 horas. Essas oscilações diárias foram denominadas de “ritmos circadianos” (do latim *circa* = cerca e *diem* = dia) (Moore-Ede et al., 1982; Marques & Menna-Barreto, 2003).

Embora alguns estudiosos já tivessem sugerido a importância desses ritmos, foi o astrônomo francês Jean Jacques d’Ortous de Mairan que evidenciou pela primeira vez, a existência de um mecanismo endógeno controlando o ritmo circadiano, em 1729. Analisando o comportamento da planta *Mimosa pudica* (“dormideira”), de Mairan observou que ela abria suas folhas durante o dia e fechava durante a noite. A partir dessa observação, ele isolou espécimes dessa planta de indicadores ambientais, e observou que, mesmo na ausência de luz, o comportamento de abrir e fechar das folhas permaneceu. Tal observação, indicou que a planta mantinha uma ritmicidade de abertura e fechamento de suas folhas mesmo na ausência de pistas ambientais (Figura 1.1) (Moore-Ede et al., 1982; Marques & Menna-Barreto 2003).



Figura 1.1: Representação do experimento realizado por Jean Jacques d’Ortous de Mairan. Nesse experimento, de Mairan isolou espécimes de *Mimosa pudica*, de pistas ambientais e comparou com espécimes expostos a luz natural. Ele observou que, mesmo na ausência de pistas ambientais o comportamento de abrir e fechar da folhas persistiram. (Fonte: Amoretty et al., 2013).

Em outro estudo, o botânico Augustin de Candolle, em 1832, observou que o movimento foliar da *Mimosa pudica*, em escuro constante, não só persistia, mas também ocorria a cada dia mais cedo, apresentando um ciclo de 22 a 23 horas de duração. Este período próximo a 24 horas, que é observado na ausência de indicadores ambientais, foi definido como “período em livre-curso” e foi considerado a primeira propriedade do relógio circadiano (Moore-Ede et al., 1982; Marque & Mena-Barreto, 2003).

Embora a ritmicidade persista na ausência de indicadores ambientais, a sincronização do relógio endógeno é feita através desses fatores ambientais externos, como a luz e a temperatura. Os indicadores ambientais externos que acertam o relógio endógeno são chamados de *Zeitgebers* (do alemão: “doador de tempo”) e essa propriedade foi denominada de “arrastamento”. Portanto, a segunda propriedade do relógio circadiano tem como função ajustar o ritmo em livre-curso, mantendo um período de exatas 24 horas (Moore-Ede et al., 1982; Pittendrigh, 1993; Marques & Menna-Barreto, 2003).

Outra contribuição importante sobre o relógio, começou a ser explorada na década de 50, pelo pesquisador Colin Pittendrigh. Ele observou que o período de eclosão da mosca *Drosophila pseudoobscura*, que geralmente ocorre ao amanhecer, não se alterava em escuro constante, mesmo quando a temperatura ambiente diminuía em torno de 10° C (Pittendrigh, 1954). Essa propriedade em que o período em livre-curso se mantém uniforme mesmo em diferentes temperaturas constantes, que são aceitáveis para a fisiologia, foi denominada de termo-compensação (Moore-Ede et al., 1982; Johnson et al., 2003).

1.3 Regulação do Relógio Circadiano no organismo modelo *Drosophila melanogaster*

Na década de 70, os estudos sobre o relógio circadiano começaram a ser aprofundados, no nível molecular. Em 1971, Ronald Konopka e Seymour Benzer realizaram experimentos de mutagênese química em moscas *D. melanogaster*. Com isso, eles isolaram três linhagens com diferentes padrões nos ritmos de emergência de adultos e de atividade locomotora. Tais mutações foram encontradas todas num mesmo *locus*, que foi denominado de *period*. Enquanto as linhagens selvagens apresentavam um período, em livre curso, de aproximadamente 24 horas, as linhagens mutantes apresentaram variações em relação ao período e ritmicidade. A primeira linhagem apresentou um período em livre curso de 19 horas e foi chamada de *per^{Short}* (*per^S*). A segunda linhagem apresentou um período de 29 horas e recebeu o nome de *per^{Long}* (*per^L*). Por último, a terceira linhagem apresentou-se arritmica e foi chamada de *per⁰¹* (Konopka & Benzer, 1971; Saunders, 2002).

Após cerca de 12 anos, os cientistas Michael Young, Michael Rosbash e Jeffrey Hall clonaram *period* e identificaram as mutações das linhagens de Konopka & Benzer, (Bargiello & Young, 1984; Reddy et al., 1984; Zehring et al., 1984). Posteriormente, outras descobertas sobre o funcionamento do relógio foram feitas, como por exemplo a identificação dos genes *timeless* (Sehgal et al., 1994), *Clock* (Allada et al., 1998), *cycle* (Rutila et al., 1998), *vriille* (Glossop et al., 2003), *PAR domain protein 1 ε e δ* (Cyran et al., 2003; Zheng et al., 2009) e *clockwork orange* (Kadener et al., 2007; Lim et al., 2007; Matsumoto et al., 2007).

Em outubro de 2017, os cientistas Michael Young, Michael Rosbash e Jeffrey Hall foram premiados com o Nobel de Fisiologia ou Medicina, em virtude de suas descobertas sobre os mecanismos moleculares que controlam o relógio circadiano.

1.3.1 As três alças regulatórias do relógio circadiano em *D. melanogaster*

No organismo modelo *D. melanogaster*, o relógio é sustentado por três alças regulatórias de retroalimentação negativa. A primeira alça, envolve a transcrição dos genes *period* (*per*) e *timeless* (*tim*), através da ligação dos fatores de transcrição CLOCK (CLK) e CYCLE (CYC) nas regiões E-box (CACGTG) desses genes. Enquanto as proteínas PERIOD (PER) e TIMELESS (TIM) vão se acumulando no citoplasma, a quinase DOUBLETIME (DBT) fosforila PER e induz sua degradação via proteassoma. Entretanto, no meio da noite, com o aumento nos níveis de TIM, ocorre também a estabilização de PER. Isso acontece porque PER começa a se associar a TIM, formando o heterodímero PER-TIM (Figura 1.2) (Price et al., 1998; Kloss et al., 2001; revisado em Hardin, 2011).

Um novo complexo é formado, pela associação de DBT ao heterodímero PER-TIM, formando o complexo PER-TIM-DBT. Com a fosforilação de PER por CASEIN KINASE 2 (CK2) e a fosforilação de TIM por SHAGGY (SGG), o complexo PER-TIM-DBT é deslocado para o núcleo. Dentro do núcleo, esse complexo interage com CLK-CYC, fazendo com que CLK seja fosforilado por DBT. Essa fosforilação de CLK por DBT, faz com que o complexo CLK-CYC não se associe mais às regiões promotoras do genes *per* e *tim*, ou seja, reprimindo a transcrição desses genes (Figura 1.2) (Yu et al., 2006; revisado em Hardin, 2011).

No início da manhã, uma flavoproteína chamada CRYPTOCHROME (CRY), tem sua conformação alterada pela presença da luz, o que faz com que ela se associe a TIM. Essa associação leva TIM a degradação, via proteassoma, e como consequência faz com que o nível de PER também diminua, já que em baixos níveis de TIM, a proteína PER perde estabilidade por não formar heterodímero com TIM. Com isso, o complexo PER-TIM-DBT não se forma e não consegue reprimir a transcrição de *per* e *tim*, recomeçando o ciclo da primeira alça do relógio (Figura 1.2) (Emery et al., 1998; Stanewsky, 2003; revisado em Hardin, 2011).

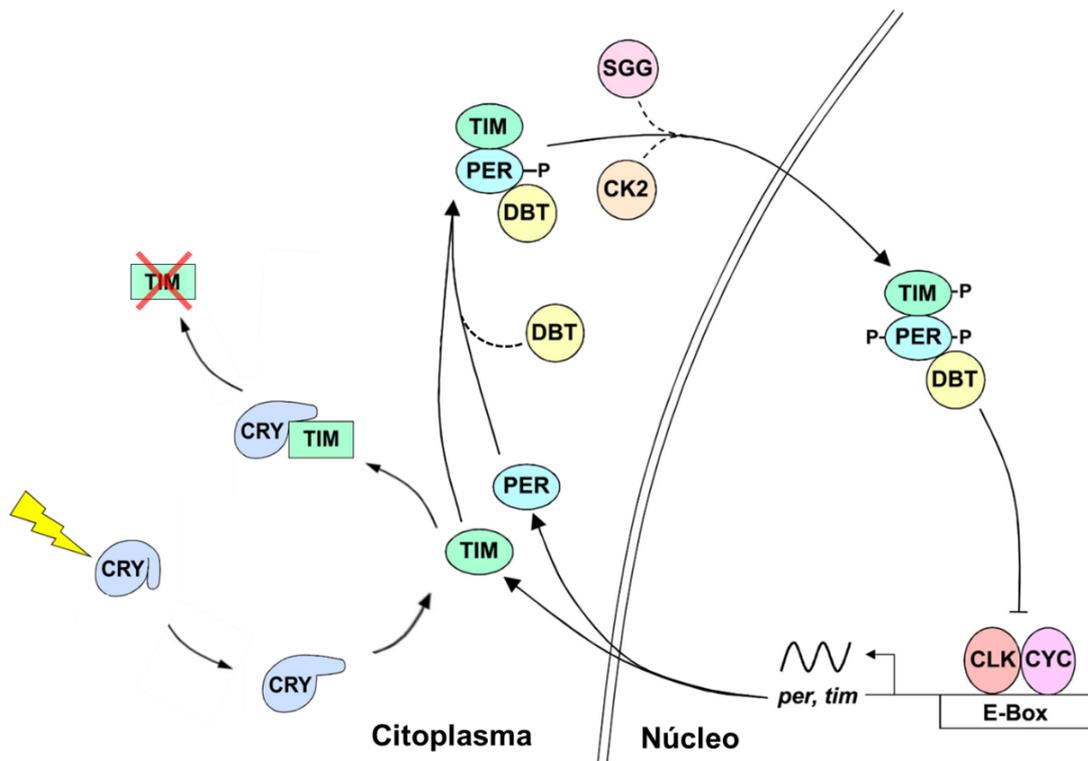


Figura 1.2: Representação da primeira alça do Relógio Circadiano, no organismo modelo *D. melanogaster*. Nessa alça, os fatores de transcrição CLK-CYC se ligam às regiões E-box dos genes *per* e *tim*, ativando a transcrição deles. No início da noite, as proteínas PER e TIM se acumulam, formam um complexo com DBT e após passarem por modificações pós-traducionais, entram no núcleo e interagem com CLK-CYC, reprimindo a própria transcrição. Na presença de luz, a flavoproteína CRY é ativada, interage com TIM e induz a sua degradação, via proteassoma. Assim, o complexo PER-TIM-DBT não se forma e, portanto, não consegue reprimir a atividade de CLK-CYC, reiniciando o ciclo do relógio (Fonte: Esquema modificado de Hardin, 2011).

Na segunda alça do relógio, CLK-CYC ativa a transcrição dos genes *vri* (*vri*) e *Partitioning-defective-domain-protein-1ε* (*PAR-domain-protein-1ε* ou *Pdp1ε*). As proteínas VRILLE (VRI) e PAR DOMAIN PROTEIN 1 ε (PDP1ε) reprimem ou ativam a transcrição de *Clk*, em diferentes horários. No início da noite, VRI interage com o sítio V/P-box (VRI/PDP-box) de *Clk*, e promove a sua repressão. Já PDP1ε, se acumula no citoplasma apenas 4 horas depois de VRI. Nesse momento, PDP1ε se liga a região V/P-box de *Clk* e ativa a sua transcrição. Provavelmente, essa variação no horário de ativação e repressão de *Clk*, faz com que sua expressão tenha uma modulação cíclica. (Figura 1.3) (Cyran et al., 2003; Benito et al., 2007; Zheng et al., 2009; revisado em Hardin, 2011).

Ainda em *D. melanogaster*, foi observado que a proteína CLK não possui um perfil cíclico. Entretanto, acontece uma fosforilação rítmica nessa proteína. Nos momentos de maior repressão dos genes *per* e *tim* é quando CLK está hiperfosforilado e nos momentos em que CLK está mais ativo é quando ele está hipofosforilado. Em relação ao gene *cycle*, nesse organismo sua expressão é constitutiva (Rutila *et al.*, 1998).

Na terceira alça do relógio, acontece ativação da transcrição do gene *clockwork-orange* (*cwo*), através da ligação de CLK-CYC a região E-box desse gene. A proteína CLOCKWORK-ORANGE (CWO), parece atuar inibindo as transcrições dos genes de relógio, ao competir com o heterodímero CLK-CYC para se ligar aos sítios E-box desses genes (Figura 1.3) (Kadener *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2007).

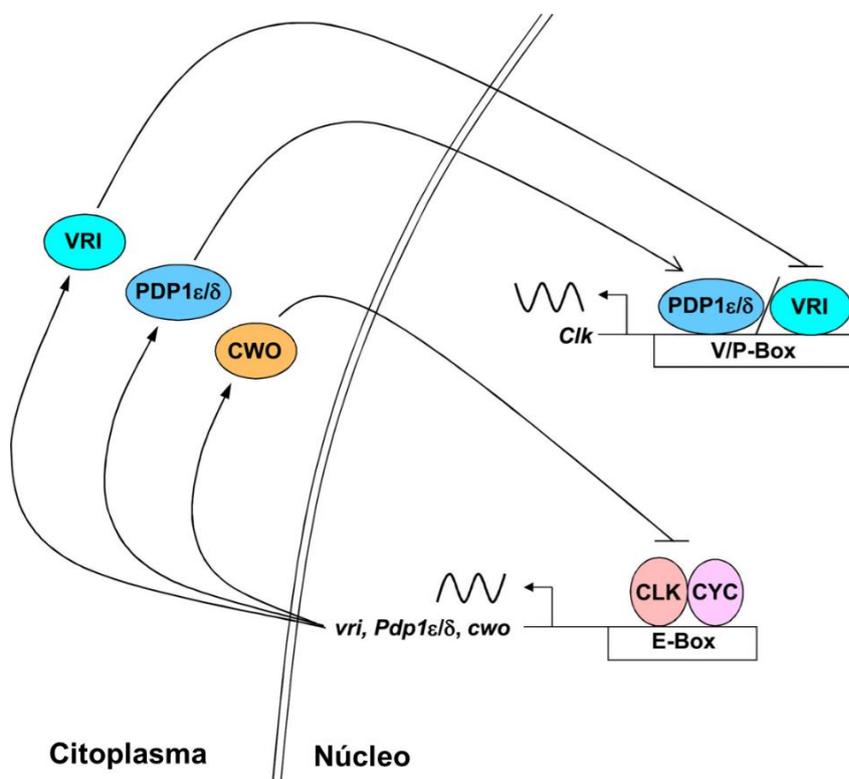


Figura 1.3: Representação da segunda e terceira alça do Relógio Circadiano, no organismo modelo *D. melanogaster*. A segunda alça envolve as transcrições dos genes *vri* e *Pdp1ε*, que são ativadas pelos fatores de transcrição CLK-CYC, ao se ligar na região promotora desses genes. Enquanto, VRI atua como repressor transcrricional de *Clk*, PDP1ε atua como ativador transcrricional. Na terceira alça, CLK-CYC ativam a transcrição de *cwo*. A proteína CWO parece atuar inibindo a ação de CLK-CYC. Assim, CWO atuaria competindo com CLK-CYC para se ligar aos sítios E-box dos genes de relógio, reprimindo assim a transcrição desses genes (Fonte: Esquema modificado de Hardin, 2011).

1.4 Organização do Relógio circadiano em *Drosophila melanogaster*

Em *D. melanogaster*, estudos anteriores descreveram que o marcapasso central é composto por aproximadamente 150 neurônios do cérebro que expressam os genes do relógio (Revisado em Ito & Tomioka, 2016). Essas células oscilatórias são divididas em dois grupos: neurônios laterais (LNs) e neurônios dorsais (DNs). Os LNs incluem os neurônios ventro-laterais grandes (l-LNVs), neurônios ventro-laterais pequenos (s-LNVs) e neurônios laterais dorsais (LN_d), enquanto os DN_s se dividem em: DN₁, DN₂ e DN₃ (revisado em Ito & Tomioka, 2016). Nesse organismo, a recepção da informação fótica ocorre através de fotorreceptores encontrados nos olhos e ocelos. Essa informação chega ao marcapasso central e são desencadeadas as respostas que geram os ritmos de uma variedade de comportamentos, incluindo a atividade locomotora (revisado em Bruno et al. 2012). Acredita-se que os s-LNVs consistam no agrupamento mais importante do relógio central e sejam necessários para manter o ritmo de atividade locomotora em escuro constante (Helfrich-Förster, 1998; revisado em Ito & Tomioka, 2016).

Além disso, também foi descrito que além da localização central (cérebro) do relógio, existem os relógios periféricos que estão localizados nos outros órgãos e tecidos que expressam ritmicamente os genes do relógio (revisado em Giebultowicz, 2001; revisado em Ito & Tomioka, 2016). Os relógios periféricos podem funcionar de forma independente do relógio central regulando funções específicas do órgão periférico (revisado em Glossop & Hardin, 2002; revisado em Ito & Tomioka, 2016). Nesse caso, acredita-se que a luz penetre a cutícula do inseto desencadeando os ritmos de funções específicas desses órgãos. Relógios periféricos já foram caracterizados em alguns órgãos como antenas, órgãos reprodutivos, tubos de Malpighi e outros (Giebultowicz & Hege, 1997; Plautz et al., 1997; Krishnan et al., 1999; Beaver et al., 2002).

Por exemplo, para analisar o funcionamento do relógio em diferentes tecidos, Plautz e colaboradores (1997), utilizaram *D. melanogaster* expressando um construto com o gene *period* fusionado ao gene da luciferase (*per-luc*). Como *D. melanogaster per-luc* exibe oscilações bioluminescentes, foi possível analisar o ritmo dessas oscilações em diferentes segmentos do corpo. Os autores demonstraram oscilações rítmicas em cabeça, tórax, abdômen, antenas, probóscides, pernas e asas, em regime claro/escuro. Em escuro constante foi observada uma diminuição da amplitude de

expressão nos tecidos analisados e posteriormente os ritmos foram restaurados em um novo regime claro/escuro. Os resultados indicaram que a informação fótica é recebida por possíveis fotorreceptores presentes nos órgãos estudados e que órgãos periféricos são capazes de manter os ritmos de oscilações mesmo na ausência do relógio central (presente no cérebro), sugerindo a existência de relógios autônomos nos tecidos analisados.

1.5 O Relógio Circadiano em *Aedes aegypti*

Em um estudo conduzido por Gentile e colaboradores, em 2009, foi descrito o perfil de expressão de RNA mensageiro dos genes *per*, *tim*, *cyc*, *Clk*, *vri*, *Pdp1ε*, *cry1* e *cry2* em *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. Para análise da expressão gênica, os autores realizaram PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR) utilizando amostras de cabeças de fêmeas, das duas espécies, que foram submetidas a ciclos de claro e escuro, ao longo de 24 horas e em temperatura constante de 25°C. Embora *Culex quinquefasciatus* tenha maior atividade noturna e *Ae. aegypti* tenha maior atividade diurna, foram observados perfis de expressão semelhantes entre as duas espécies e entre elas e *D. melanogaster*, para a maioria dos genes analisados.

Os genes *per* e *tim* apresentaram um pico de expressão na fase escura, enquanto os genes *Clk* e *cyc* apresentaram o pico de expressão na fase clara (Figura 1.4). O perfil de expressão de *cyc*, difere do que é encontrado em *D. melanogaster*. Nesse organismo, *cyc* apresenta um perfil arritmico, enquanto em *Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus* *cyc* apresenta um perfil de expressão rítmico. O que acontece é que, diferentemente de *D. melanogaster*, alguns insetos apresentam um domínio C-terminal de transativação na proteína CYC, chamado de *BMAL (Brain and Muscle Arnt-Like) C-terminal region (BCTR)*. Acredita-se que ao longo da evolução, *D. melanogaster* tenha perdido esse domínio de transativação de CYC e adquirido um domínio de transativação na região poli-Q C-terminal de CLK, mantendo a funcionalidade do heterodímero CLK-CYC (Rutila et al., 1998; Allada et al., 1998; Chang et al., 2003; Rubin et al., 2006; Sandrelli et al., 2008). Além disso, assim como *Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, outros insetos, que possuem o domínio de transativação BCTR, apresentam expressão rítmica de *cyc* (Chang et al., 2003; Rubin et al., 2006; Meireles-Filho et al., 2006; Gentile et al., 2009; Chahad-Ehlers et al., 2013)

Os genes *vri* e *Pdp1ε* apresentam os picos de expressão em fases diferentes. Enquanto *vri* tem o pico de expressão na fase clara, *Pdp1ε* apresenta o pico de expressão na fase escura (Figura 1.4). Tal diferença sugere que nas duas espécies de mosquito, *vri* e *Pdp1ε* competem para se ligar ao sítio de regulação, como acontece em *D. melanogaster*.

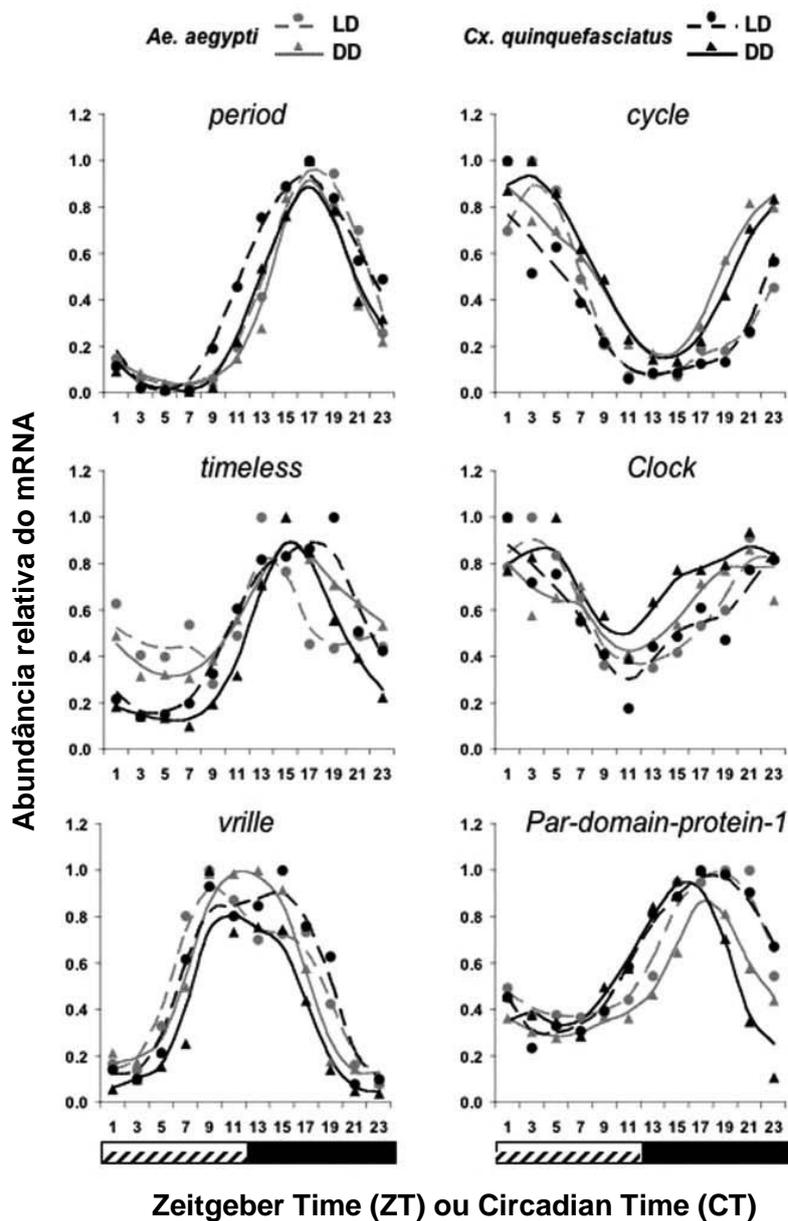


Figura 1.4: Perfil de expressão dos principais genes do relógio circadiano em *Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Os gráficos mostram a expressão dos genes *per*, *cycle*, *timeless*, *Clock*, *vrille* e *Par-domain-protein-1* em amostras de cabeças de fêmeas de *Ae. Aegypti* (linhas de cor cinza) e de *C. quinquefasciatus* (linhas de cor preta). As linhas tracejadas representam o regime de claro/escuro (LD) e as linhas contínuas representam o regime escuro constante (DD). O eixo y indica a abundância relativa do mRNA e o eixo x indica o *Zeitgeber Time* (ZT) em LD ou *Circadian Time* em DD. A barra branca representa a fase clara, a barra rachurada representa o dia subjetivo em DD, ou seja, a fase em que a luz estaria acesa se fosse um regime LD e a barra preta representa a fase escura em LD e em DD. Os pontos representam o regime LD e os triângulos o regime DD (Fonte: Modificado de Gentile et al., 2009).

Por fim, duas formas do gene *cryptochrome* foram analisadas, *cry1* que é semelhante ao fotorreceptor *cry1* de *D. melanogaster*, e *cry2*, que não é encontrada em *D. melanogaster*, mas atua como repressor transcricional em outros insetos, como borboletas, besouros e abelhas (Zhu et al., 2005; Yuan et al., 2007). Com relação ao gene *cry1*, as duas espécies analisadas apresentaram expressão constitutiva (Figura 1.5). No entanto, uma diferença foi encontrada em relação à expressão de *cry2*. Enquanto *cry2* apresentou um único pico de expressão em *C. quinquefasciatus*, um perfil bimodal, ou seja, com dois picos de expressão, foi encontrado em *Ae. aegypti* (Figura 1.5). Especula-se que as diferenças encontradas em relação ao perfil de expressão de *cry2* nas duas espécies estejam relacionadas com as diferenças encontradas no padrão de atividade locomotora (Gentile et al., 2009).

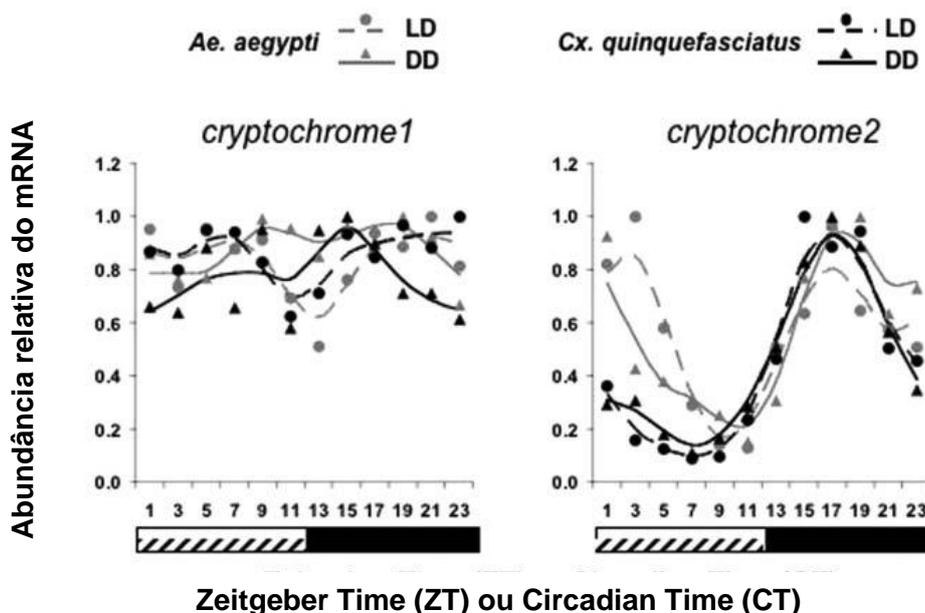


Figura 1.5: Perfil de expressão dos genes *cry1* e *cry2*, em *Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Os gráficos mostram a expressão dos genes *cry1* e *cry2* em amostras de cabeças de fêmeas de *Ae. Aegypti* (linhas de cor cinza) e de *C. quinquefasciatus* (linhas de cor preta). As linhas tracejadas representam o regime de claro/escuro (LD) e as linhas contínuas representam o regime escuro constante (DD). O eixo y indica a abundância relativa do mRNA e o eixo x indica o *Zeitgeber Time* (ZT) em LD ou *Circadian Time* em DD. A barra branca representa a fase clara, a barra rachurada representa o dia subjetivo em DD, ou seja, a fase em que a luz estaria acesa se fosse um regime LD e a barra preta representa a fase escura em LD e em DD. Os pontos representam o regime LD e os triângulos o regime DD (Fonte: Modificado de Gentile et al., 2009).

1.6 Atividade locomotora/voo em machos de *Ae. aegypti*

Em Araripe et al. (2018) estudamos o comportamento pré-cópula de machos de *Ae. aegypti*. Para realizar esse estudo, analisamos a atividade locomotora/voo desses machos em resposta à presença de fêmeas confinadas. Inicialmente, quatro condições foram estudadas: “machos sozinhos”, “machos com fêmeas virgens”, “machos com fêmeas inseminadas” e “fêmeas sozinhas”. Foi observado que enquanto as fêmeas apresentam um único pico de atividade ao anoitecer, no ZT 12, os machos apresentam dois picos, chamados de “E1” (ZT 10.5) e “E2” (ZT 12) (Figura 1.6). Nos machos sozinhos, os picos E1 e E2 apresentam amplitudes semelhantes. Já quando os machos estão na presença de fêmeas, tanto virgens quanto inseminadas, a amplitude do pico E2 aumenta em relação à amplitude do pico E1, sendo significativamente maior em machos na presença de fêmeas virgens ($F_{(3,331)} = 13.68$, $P < 0.0001$, teste de Tukey: $P = 0.049$) (Figura 1.6). Essa diferença indica que os machos percebem as fêmeas e que são capazes de alterar o seu comportamento em resposta a sua presença.

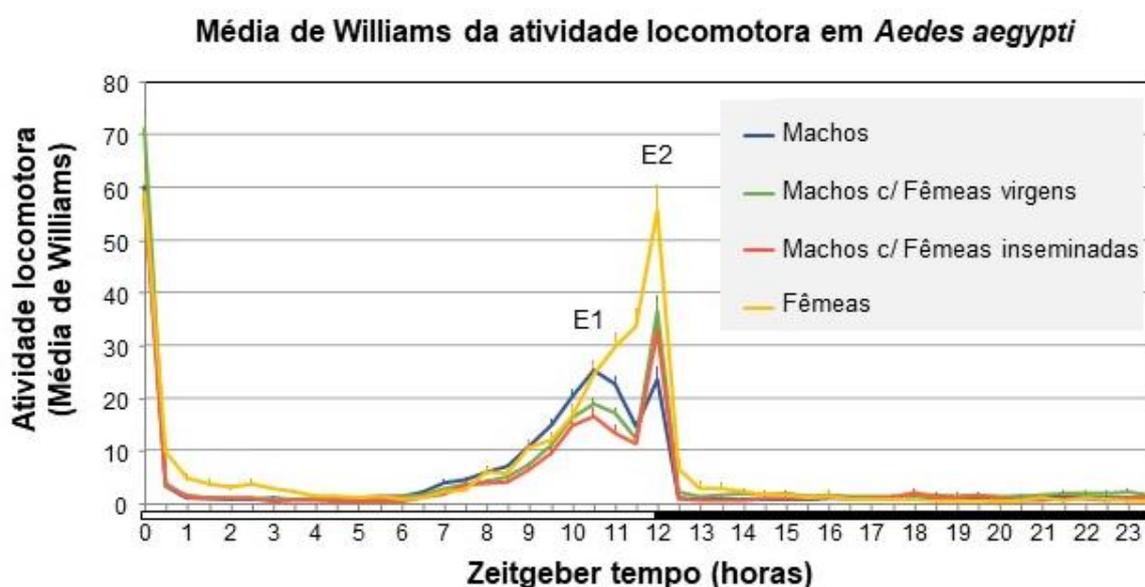


Figura 1.6: Média da atividade locomotora/voo de machos e fêmeas de *Ae. aegypti*.

Perfil médio de três dias de experimento de atividade locomotora/voo, ao longo de 24 horas, dos grupos: machos sozinhos (azul) ($n = 94$), machos com fêmeas virgens (verde) ($n = 100$), machos com fêmeas inseminadas (coral) ($n = 69$) e fêmeas sozinhas (amarelo) ($n = 72$). A barra branca representa 12 horas de fase clara e a barra preta 12 horas de fase escura. Zeitgeber tempo se refere a cada hora após o acender das luzes, dentro da incubadora. No ZT0 as luzes acendem e no ZT12 as luzes apagam.

A fim de entender os sinais que poderiam estar mediando a diferença observada na atividade locomotora/voo dos machos na presença de fêmeas, foi analisada a atividade de mosquitos que tiveram órgãos importantes para a comunicação, removidos. As condições analisadas foram: “machos sem antenas”, “machos sem antenas com fêmeas”, “machos com fêmeas sem asas” e “machos com fêmeas”. Machos sem antenas mostram uma atividade significativamente menor do que machos com antenas, ao longo de toda a curva ($F_{(3, 156)} = 66.77$, $P < 0.0001$, teste de Tukey: $P < 0.0001$). Além disso, machos sem antenas não alteraram o seu perfil de atividade em resposta a fêmeas ($F_{(3,155)} = 6.128$, $P < 0.0006$, teste de Tukey: $P = 0.987$) (Figura 1.7). Quando machos (com antenas) foram expostos a fêmeas que tiveram suas asas removidas, a amplitude do pico E2 foi significativamente menor que a amplitude do pico E2 de machos com fêmeas (com asas - controle) ($F_{(3, 155)} = 25.43$, $P < 0.0001$, teste de Tukey: $P = 0.049$), mas ainda assim esses machos produziram o pico E2 maior do que o pico E1 (Figura 1.7). O conjunto de resultados indicou que os machos podem estar percebendo as fêmeas por outros sinais, que não os sons nessa condição.

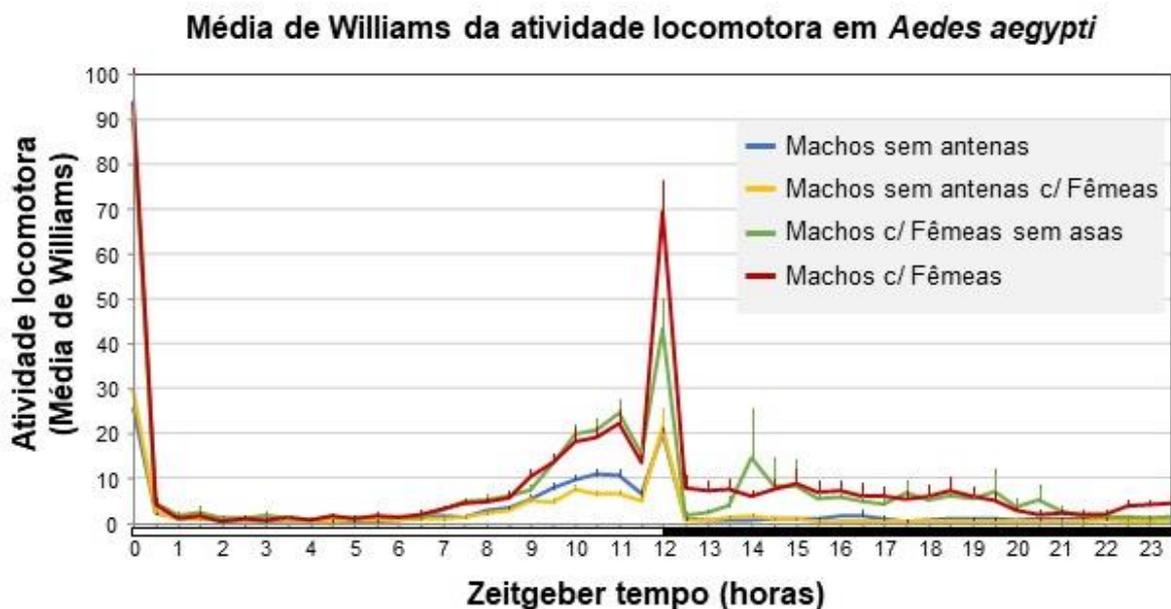


Figura 1.7: Média da atividade locomotora/voo de machos de *Ae. aegypti*, em diferentes condições. Perfil médio da atividade locomotora/voo, ao longo de 24 horas, de três dias de experimento dos grupos: machos sem antenas (azul) ($n = 40$), machos sem antenas com fêmeas (amarelo) ($n = 40$), machos com fêmeas sem asas (verde) ($n = 40$) e o controle machos com fêmeas (vermelho) ($n = 40$). A barra branca representa 12 horas de fase clara e a barra preta 12 horas de fase escura. Zeitgeber tempo se refere a cada hora após o acender das luzes dentro da incubadora. No ZT0 as luzes acendem e no ZT12 as luzes apagam.

As fêmeas sem asas ficam incapacitadas de emitir sons, e talvez por esse motivo os machos se tornem menos ativos. No entanto, os machos expostos a fêmeas sem asas ainda assim apresentam os picos ao anoitecer maiores do que os machos sem antenas. As asas e as antenas dos mosquitos são essenciais para a comunicação entre eles, já que essa comunicação é feita majoritariamente através dos sons emitidos com os batimentos das asas e esses sons são percebidos pelas antenas (Göpfert et al., 1999). No entanto, as antenas também são essenciais para o olfato (revisado em Wolff et al., 2018) e podem ser importantes para manter o equilíbrio durante o voo. Assim sendo, os resultados desse experimento indicam que além dos sinais acústicos, sinais químicos e visuais também podem estar sendo percebidos pelos machos, já que mesmo quando expostos a fêmeas sem asas, os machos ainda parecem perceber as fêmeas. Portanto, esses resultados nos levaram a perguntar se essa mudança no perfil de atividade está acompanhada de uma diferença na expressão de genes envolvidos na percepção olfativa, no comportamento reprodutivo e nos principais genes de relógio circadiano.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral: Investigar as bases genéticas e regulatórias envolvidas na variação do comportamento de atividade locomotora/voo de machos de *Aedes aegypti* expostos a presença de fêmeas da mesma espécie.

Objetivos específicos:

- 1) Estudar o perfil de expressão, ao longo de 24 horas, de alguns dos principais genes do relógio circadiano (*period*, *cycle* e *cryptochrome 2*), do gene *Orco*, envolvido na percepção olfativa e do gene *fruitless*, possivelmente envolvido no comportamento de corte, em diferentes tecidos de machos de *Aedes aegypti* que estiveram ou não na presença de fêmeas confinadas a uma distância perceptível;

- 2) Estudar uma possível mediação de informação entre antenas (percepção) e testículos (reprodução), comparando os resultados referentes ao objetivo acima com resultados obtidos quando machos que tiveram suas antenas removidas são colocados na presença de fêmeas confinadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Criação de mosquitos *Aedes aegypti* até o estágio adulto

Para a realização dos experimentos, foram utilizados ovos de *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller, que foram cedidos pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores do Instituto Oswaldo Cruz (LAFICAVE/IOC/Fiocruz).

Os ovos de *Ae. aegypti* foram submetidos à eclosão de acordo com o protocolo de Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994). Assim, os ovos foram eclodidos em bacias com 1,5 litros de água miliRO e como fonte de alimento foram utilizados 1,5 comprimidos de levedo de cerveja (Vitalab). Durante toda a criação as bacias foram mantidas em uma incubadora *Precision Scientific* modelo 818, com temperatura constante de 25°C e fotoperíodo controlado em 12 horas de luz e 12 horas de escuro (LD 12:12). No segundo dia de criação, foram separadas 300 larvas por bacia para controle da densidade e um melhor crescimento e desenvolvimento das larvas. Durante a semana de criação, a água das bacias foi trocada a cada dois dias e a cada troca foram disponibilizados 1,5 comprimidos de levedo de cerveja, por bacia. Após o sexto dia, as pupas foram coletadas com uma pipeta Pasteur e depositadas em copos plásticos com água das bacias, que foram colocados dentro de gaiolas de criação com uma fonte de alimento, que consistia em algodão embebido em Sacarose 10%, para os mosquitos adultos se alimentarem após a emergência. Após a emergência, os mosquitos machos precisam de em torno de 48 horas para serem capazes de copular, já que leva em média esse tempo para ser completado o processo de rotação da genitália (Roth, 1948). Portanto, para realizar os experimentos com machos e fêmeas virgens, os mosquitos foram coletados duas vezes ao dia, com um aspirador, e foram separados em gaiolas diferentes.

3.2 Remoção de antenas dos machos

Para realizar os experimentos com machos sem antenas uma etapa de dissecação foi acrescentada à criação. Para esses experimentos, após a emergência dos adultos, os machos foram anestesiados em gelo por poucos minutos e tiveram suas antenas removidas com o auxílio de uma pinça de precisão (5 Dumont INOX). As antenas foram cortadas rente ao segmento globular. Após essa etapa, os machos foram alocados em tubos de experimento, como será explicado no próximo tópico.

3.3 Desenho experimental do sistema de confinamento de fêmeas

Para reproduzir o que foi feito nos experimentos de atividade locomotora de machos expostos a fêmeas (Araripe et al., 2018), em que os tubos de atividade contendo um macho foram acoplados a tubos de confinamento contendo uma fêmea, foi criado um sistema semelhante de tubos de confinamento que permitisse o congelamento instantâneo em NL_2 (nitrogênio líquido). Esse sistema consiste em conjuntos de dois tubos *Falcon* de 15ml acoplados frente a frente. Nesse sistema, os tubos *Falcon* tiveram os centros de suas tampas cortados para a adaptação de um microtule. Após colocar um mosquito em cada tubo e fechar com a tampa adaptada com microtule, os dois tubos são unidos frente a frente e fixados com auxílio de fita crepe. Esta tela separando os dois ambientes, permite a comunicação e ao mesmo tempo impede que ocorra a cópula entre os mosquitos (Figura 3.1).

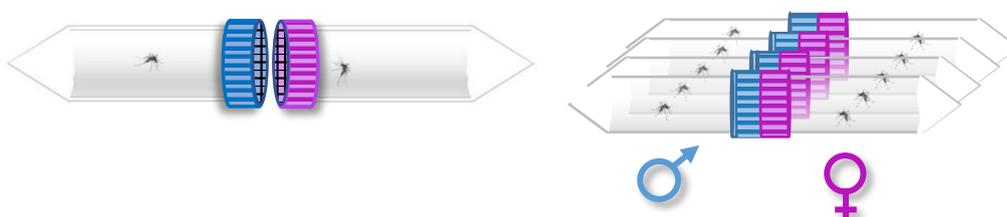


Figura 3.1: Desenho experimental do Sistema de Tubos de Confinamento

3.4 Experimentos de exposição de machos à presença de fêmeas

As condições estudadas nos experimentos foram: “machos sozinhos”, “machos com fêmeas confinadas”, “machos sem antenas sozinhos” e “machos sem antenas com fêmeas”, todos virgens. Na extremidade de cada tubo foi adicionada uma fonte de alimento (algodão embebido em solução de sacarose 10%) (Figura 3.2), inclusive nas condições “machos sozinhos” e “machos sem antenas sozinhos”. Assim, com a padronização do sistema, buscamos evitar que somente a fonte de alimento pudesse ser o fator de atração dos machos.



Figura 3.2: Fotos do Sistema de Tubos de Confinamento

Os experimentos tiveram duração de quatro dias, nas mesmas condições de fotoperíodo e temperatura da criação (LD 12:12 e 25 °C) e reproduzindo o mesmo tempo usado nos experimentos de atividade locomotora (Araripe et al., 2018). As coletas dos mosquitos foram realizadas no quarto dia. O estudo da expressão gênica ao longo de 24 horas necessita de um programa de coletas de amostras de tecidos em intervalos regulares ao longo desse período. Com base em estudos anteriores do nosso grupo (Teles-de-Freitas, 2015) a coleta a cada 4 horas, com congelamento instantâneo de amostras, permite representar o perfil de expressão de genes do relógio circadiano. Para as condições “machos sozinhos” e “machos com fêmeas”

foram utilizados um total de 50 pares de tubos para cada horário de coleta e condição, totalizando 300 machos para cada condição e 600 machos por réplica experimental. Já para “machos sem antenas sozinhos” e “machos sem antenas com fêmeas” foram utilizados 20 pares de tubos para cada horário de coleta e condição, totalizando 120 machos para cada condição e 240 machos por réplica experimental, como detalhado a seguir. Foram feitas três réplicas de cada experimento, repetindo-se o protocolo para cada uma delas.

3.5 Coleta de machos para dissecação

Para estudar a variação na expressão dos genes de relógio e dos genes *fruitless* e *Orco*, os machos foram coletados em seis diferentes horários (*Zeitgeber Time* - ZT) ao longo de 24 horas: ZT 1, ZT 5, ZT 9, ZT 13, ZT 17 e ZT 21. Os ZT's representam cada hora do ciclo de um dia, passada após o acender das luzes. Dessa forma, num fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, o ZT1 representa 1 hora após o acender das luzes e ZT13 representa 1 hora após o apagar das luzes.

Em cada ZT os 50 ou 20 pares de tubos de confinamento de cada condição foram coletados, imediatamente congelando-os em nitrogênio líquido. Os machos foram retirados dos tubos de confinamento e separados sobre uma placa de alumínio colocada em contato direto com gelo seco. Após separados em tubos de micro centrífuga, de acordo com o horário de coleta e a condição, as amostras foram mantidas a -80°C até as dissecações.

Um total de 50 pares de antenas, 20 cabeças e 20 pontas de abdômen (que incluem testículos e glândulas acessórias), dos machos de cada grupo e ZT, foram dissecados sob lupa. Durante as dissecações os machos foram colocados sobre uma placa de alumínio em contato com gelo seco e as dissecações foram realizadas com pinças (5 Dumont INOX) e seringas de insulina com agulhas. Após dissecados, os tecidos foram armazenados em 100 µL de TRIzol e mantidos a -80°C até a extração de RNA.

3.6 Extração de RNA

As extrações de RNA foram feitas seguindo-se um protocolo híbrido, que consiste na fusão do protocolo de extração de RNA em *TRIzol* (Invitrogen) com o protocolo *ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System* (Promega Corporation). Como primeiro passo, as amostras foram maceradas, com o auxílio de um homogeneizador motorizado, em *TRIzol* (100 µL). Após a maceração o volume foi completado para 1000 µL de *TRIzol* e foram adicionados 200 µL de Clorofórmio. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e a fase aquosa transferida para um novo tubo de micro centrífuga. A partir dessa etapa, foi seguido o protocolo *ReliaPrep*, começando pela adição de 340 µL de Isopropanol 100% (Sigma-Aldrich). As amostras foram vortexadas, transferidas para minicolunas, e em cada uma foram adicionados 500 µL de *RNA Wash Solution*. Após a centrifugação, foram adicionados 30 µL da solução DNase I, diretamente na membrana da minicoluna, e após 15 minutos as minicolunas foram lavadas com 200 µL de *Column Wash Solution*, e posteriormente com 300 µL de *RNA Wash Solution*. No final da extração as amostras foram ressuspendidas em 30 µL (cabeças e pontas de abdômen) e 15 µL (antenas) de *Nuclease Free Water*.

O RNA total de cada amostra foi quantificado no *Qubit Fluorometer Quantitation* (Invitrogen) utilizando *Qubit RNA HS Assay Kit*, de acordo com o protocolo do fabricante. Após a quantificação, as amostras foram diluídas com *Nuclease Free Water*, para a concentração final de 5 ng/µL.

3.7 Síntese de cDNA

As reações de síntese de cDNA a partir das amostras de RNA foram realizadas com o kit *TaqMan Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems) a partir de 5 ng de RNA total, e a tabela 3.1 mostra a concentração e o volume de cada reagente para cada amostra. A configuração utilizada no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) para a síntese de cDNA foi: 25 °C por 10 minutos, 48 °C por 1 hora e 95 °C por 5 minutos. Após a síntese de cDNA, o volume final de 10 µl foi diluído 10 vezes com *Nuclease Free Water* (Promega), resultando em 100 µl de cDNA diluído.

Tabela 3.1: Concentração e volume dos reagentes utilizados na síntese de cDNA das amostras

Reagentes	Volume
RT Buffer - Tampão de Transcriptase Reversa (10 X)	1,00 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2,20 µL
dNTP (2.5 mM/cada)	2,00 µL
Oligo d(T) ₁₆ (50 µM)	0,50 µL
Inibidor de RNase (20 U/µL)	0,20 µL
Transcriptase reversa (50 U/µL)	0,25 µL
RNA (5 ng/µL)	3,85 µL
Total	10 µL

3.8 PCR quantitativo em Tempo Real

Para analisar a expressão dos genes estudados, foram realizadas reações de PCR quantitativo em Tempo Real utilizando o reagente *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) em um termociclador *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). A tabela 3.2 mostra os componentes utilizados nas reações de PCR quantitativo em Tempo Real e seus respectivos volumes e concentrações.

Tabela 3.2: Concentração e volume dos componentes utilizados nas reações de PCR quantitativo em Tempo Real, por poço da placa

Reagentes	Volume
<i>Power SYBR Green PCR Master Mix</i>	7,50 µL
Oligo 5' (10 µM)	0,75 µL
Oligo 3' (10 µM)	0,75 µL
<i>Nuclease Free Water</i>	2,00 µL
cDNA	4,00 µL
Total	15 µL

As reações foram realizadas a partir das amostras das três réplicas experimentais descritas acima e, para cada ZT de cada réplica experimental, foram feitas três réplicas técnicas. Para os genes de relógio *period*, *cycle* e *cryptochrome 2* e para o gene *rp49*, utilizado como normalizador endógeno, foram utilizados oligonucleotídeos específicos para *Ae. aegypti*, previamente desenhados e testados pelo grupo do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos (Gentile et al., 2005, 2009). Oligonucleotídeos dos genes *Orco* (AAEL005776) e *fruitless* (AAEL024283) foram desenhados respectivamente com o auxílio da plataforma Primer-BLAST e a partir da sequência disponível no banco de dados Vectorbase. As sequências dos oligonucleotídeos analisados estão descritas da tabela 3.3. Para a validação dos oligonucleotídeos foram realizadas curvas padrão, a partir de diluições seriadas de amostras de cDNA bruto dos tecidos estudados e foram analisadas as eficiências das reações e as curvas de dissociação para verificar a especificidade de anelamento dos oligonucleotídeos.

As reações foram realizadas nas seguintes configurações, no termociclador: 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 60 segundos e por último a curva de dissociação com a seguinte programação: em 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 60 segundos e aumento gradativo de temperatura até 95 °C.

Tabela 3.3: Primers utilizados nas reações de PCR quantitativo em Tempo Real. Na tabela estão descritos os genes estudados, os nomes e a sequência *forward* (em cima) e *reverse* (em baixo) de cada oligonucleotídeo.

Gene	Nome	Sequência (5'---- 3')
<i>rp49</i>	5aeexpRP	GCTATGACAAGCTTGCCCCCA
	3aeaquaRP1b	TCATCAGCACCTCCAGCTC
<i>period</i>	5aeexpper3	CGTTGAAAAGTCTCAATCAACCT
	3aegyper3	GCTGAGTGAAAGCTTCGCCG
<i>cycle</i>	5aegycyc1a	CCGACCAGGAGCTGAAAATG
	3aeexpcyc1	GACCTAGCAAATCACCTGTG
<i>cryptochrome 2</i>	5aeexpcry2	ACTTGCCGGTGCTGAAGAACT
	3aecry2	CGATGATACACTTGGCCGTGCG
<i>Orco</i>	5aeorcoJR04	CTGGTATGACGGTTCCGAGG
	3aeorcoJR04	CCAGAACCGATGCGAACAGA
<i>fruitless</i>	5aefruJR01	ATGACCGACGACTGCCGTTA
	3aefruJR01	TACTGTGTGATGACGCCTGC

As médias dos valores de C_T (*threshold cycle*) das três réplicas técnicas de cada amostra foram calculadas, e as réplicas que apresentaram valores aberrantes (*outliers*), de acordo com o teste de *Grubbs*, foram removidos da análise (Sokal & Rohlf, 1995) Para a quantificação, o método do C_T comparativo (Comparative C_T Method; Método $2^{-\Delta\Delta C_T}$) (Livak & Schmittgen, 2001) foi utilizado. A expressão do gene *rp49* foi utilizada como normalizador endógeno para o cálculo do ΔC_T e o valor mínimo do ΔC_T , entre as amostras, foi utilizado como referência no cálculo do $\Delta\Delta C_T$. As etapas dos cálculos estão descritas detalhadamente nos manuais da Applied Biosystems (1997, 2004).

3.9 Análise estatística

As análises estatísticas dos dados de expressão gênica foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (Prism, La Jolla, CA). Os valores de $\Delta\Delta C_T$ foram comparados entre ZTs dentro de cada tratamento, com ANOVA (*One Way*) com teste *a posteriori* de Tukey LSD, onde foram considerados significativos valores de $p < 0.05$. Para as representações gráficas foram usados os valores de $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

4 RESULTADOS

4.1 Perfis de expressão dos genes de relógio em amostras de cabeças, antenas e pontas de abdômen de machos de *Ae. aegypti*, expostos ou não a fêmeas

O padrão de expressão temporal dos genes do relógio *period*, *cycle* e *cryptochrome 2* foram investigados em amostras de cabeças (relógio central), antenas (relógio periférico) e pontas de abdômen (relógio periférico) de machos sozinhos e de machos que foram expostos a fêmeas. Além disso, o padrão de expressão desses genes também foi analisado nos tecidos de machos sem antenas sozinhos e machos sem antenas expostos a fêmeas. Os resultados de expressão de cada gene estão descritos a seguir.

4.1.1 Expressão do gene *period* em cabeças de machos com antenas e sem antenas expostos ou não à presença de fêmeas

O perfil de expressão do gene *period* em amostras de cabeças de machos sozinhos, evidenciou uma menor abundância entre o ZT 5 e o ZT 9 e uma maior abundância no ZT 17 (Figura 4.1 A). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 350.9$; $P < 0.0001$). O teste de Tukey apontou diferença significativa entre o ZT de maior valor de expressão (ZT 17) e o ZT de menor expressão (ZT 5) ($P < 0.001$) e entre eles e os demais ZTs.

Em amostras de cabeças de machos com fêmeas, *period* apresentou o mesmo padrão de expressão, com uma menor expressão no ZT 5 e um pico em torno do ZT 17 (Figura 4.1 B). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 138.5$; $P < 0.0001$). O teste de Tukey indicou o ZT 17 como significativamente diferente do ZT 5 ($P < 0.001$). O mesmo teste também indicou o ZT 17 como significativamente diferente dos ZTs 1, 9 e 13, e o ZT 5 como significativamente diferente de todos os ZTs.

Em relação às amostras de cabeças dos mosquitos sem antenas, o padrão de expressão de *period* foi consistente com as condições detalhadas acima. Em machos sem antenas sozinhos e em machos sem antenas com fêmeas o menor valor de

expressão foi registrado no ZT 5 e o pico no ZT 17 (Figura 4.1 C e D). Os resultados das análises de variância (ANOVA) indicaram diferença significativa entre os ZTs (Machos sozinhos - $F_{5,12} = 372.3$; $P < 0.0001$); (Machos com Fêmeas - $F_{5,12} = 277.5$; $P < 0.0001$). Na duas condições o teste de Tukey apontou diferença significativa entre o pico e o vale ($P < 0.001$) e entre eles e os demais ZTs.

Perfil de expressão de *period* em cabeças de machos de *Ae. aegypti*

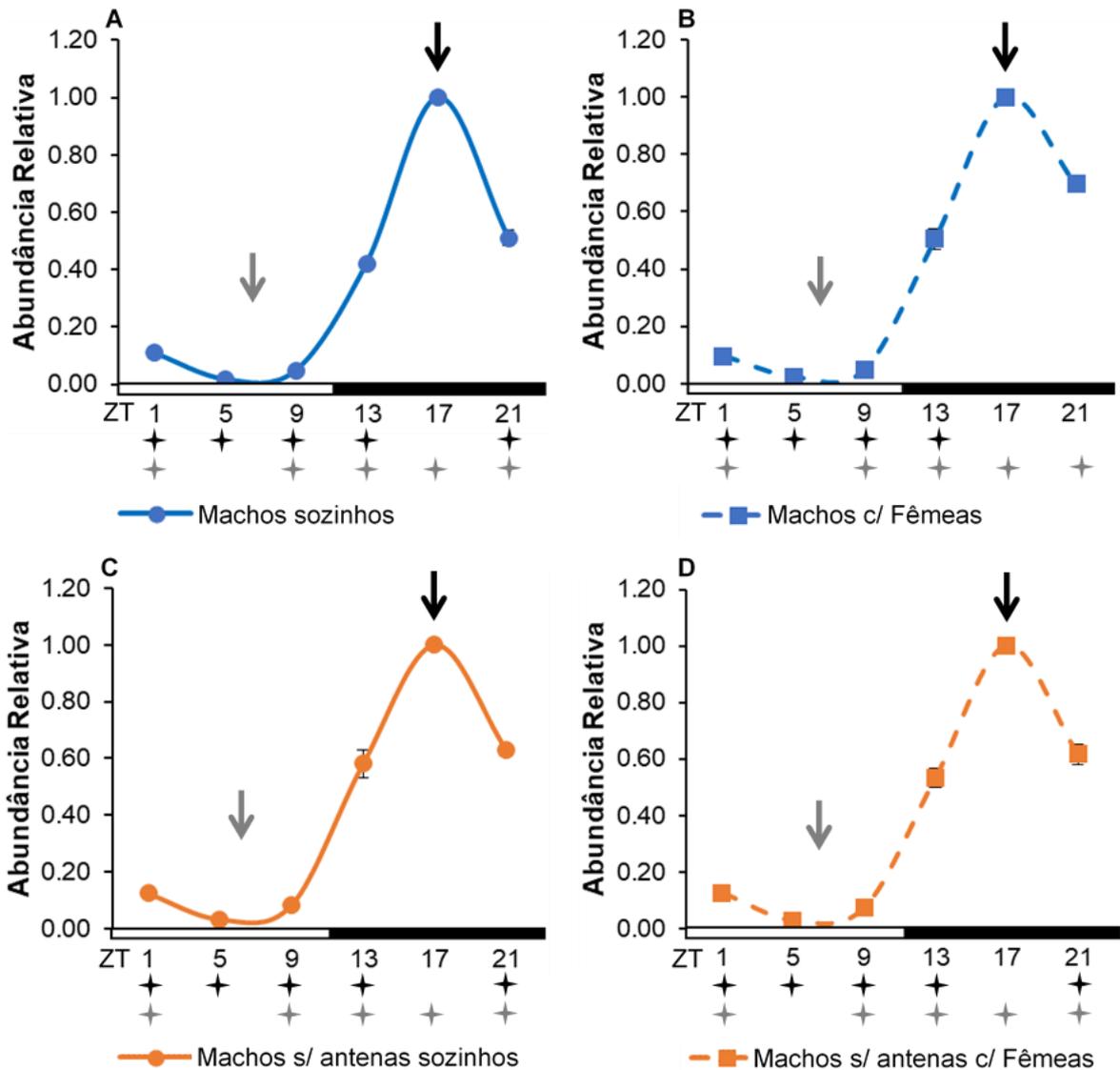


Figura 4.1: Expressão do gene *period*, ao longo de 24 horas, em cabeças de machos de *Ae. aegypti*. Os gráficos ilustram a expressão do gene *period*, ao longo de 24 horas, em cabeças de “Machos sozinhos” (linha azul contínua); “Machos com Fêmeas” (linha azul tracejada); “Machos sem antenas sozinhos” (linha coral contínua) e “Machos sem antenas com Fêmeas” (linha coral tracejada). O eixo y indica a abundância relativa de mRNA. O eixo x indica o *Zeitgeber Time* (ZT), que corresponde a cada hora após o acender das luzes. Assim, o ZT 1 significa 1 hora após o acender das luzes e o ZT 13 significa 1 hora após o apagar das luzes. A barra branca representa a fase clara e a barra preta a fase escura. As setas pretas indicam o pico de expressão e as setas cinzas indicam o vale. As estrelas representam os ZTs que são significativamente diferentes do pico de expressão ou do vale, de acordo com a cor das setas. A expressão gênica foi avaliada por PCR quantitativo em Tempo Real e os gráficos foram gerados a partir da média de três réplicas experimentais independentes.

4.1.2 Expressão do gene *period* em pontas de abdômen de machos com antenas e sem antenas expostos ou não à presença de fêmeas

Em pontas de abdômen de machos sozinhos, *period* apresentou menor expressão em torno do ZT 5 e maior expressão em torno do ZT 17 (Figura 4.2 A). A análise de variância (ANOVA) apresentou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 21.42$; $P < 0.0001$). O resultado do teste de Tukey mostrou o ZT 17 como significativamente diferente do ZT 5 ($P < 0.001$). O mesmo teste ainda indicou o ZT 17 como significativamente diferente dos ZTs 1 e 9, e o ZT 5 como significativamente diferente dos ZTs 1, 13 e 21.

Em pontas de abdômen de machos expostos à presença de fêmeas, *period* também apresentou uma menor expressão em torno do ZT 5 e uma maior expressão entre o ZT 17 e o ZT 21 (Figura 4.2 B). A análise de variância (ANOVA) indicou que os ZTs foram significativamente diferentes ($F_{5,12} = 28.36$; $P < 0.0001$). O teste de Tukey mostrou que o ZT de maior valor de expressão foi significativamente diferente do ZT de menor valor ($P < 0.001$), indicando ainda o ZT 17 como significativamente diferente dos ZTs 1 e 9, e o ZT 5 como significativamente diferente dos ZTs 1, 13 e 21.

Em relação a pontas de abdômen de machos sem antenas sozinhos, *period* foi menos expresso no ZT 5 e mais expresso em torno do ZT 17 (Figura 4.2 C). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 47.35$; $P < 0.0001$). O teste de Tukey mostrou diferença significativa entre o ZT 17 e o ZT 5 ($P < 0.001$), indicando ainda diferença significativa entre o ZT17 e os ZTs 1 e 9, e entre o ZT 5 e os demais ZTs.

O mesmo perfil se repetiu nos machos sem antenas com fêmeas, a menor expressão foi registrada em torno do ZT5 e a maior expressão em torno do ZT 17 (Figura 4.2 D). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 26.17$; $P < 0.0001$). O teste de Tukey mostrou diferença significativa entre o ZT 17 e o ZT 5 ($P < 0.001$). O mesmo teste também indicou diferença significativa entre o ZT 17 e os ZTs 1 e 9, e entre o ZT 5 e os ZTs 1, 13 e 21.

Perfil de expressão de *period* em pontas de abdômen de machos de *Ae. aegypti*

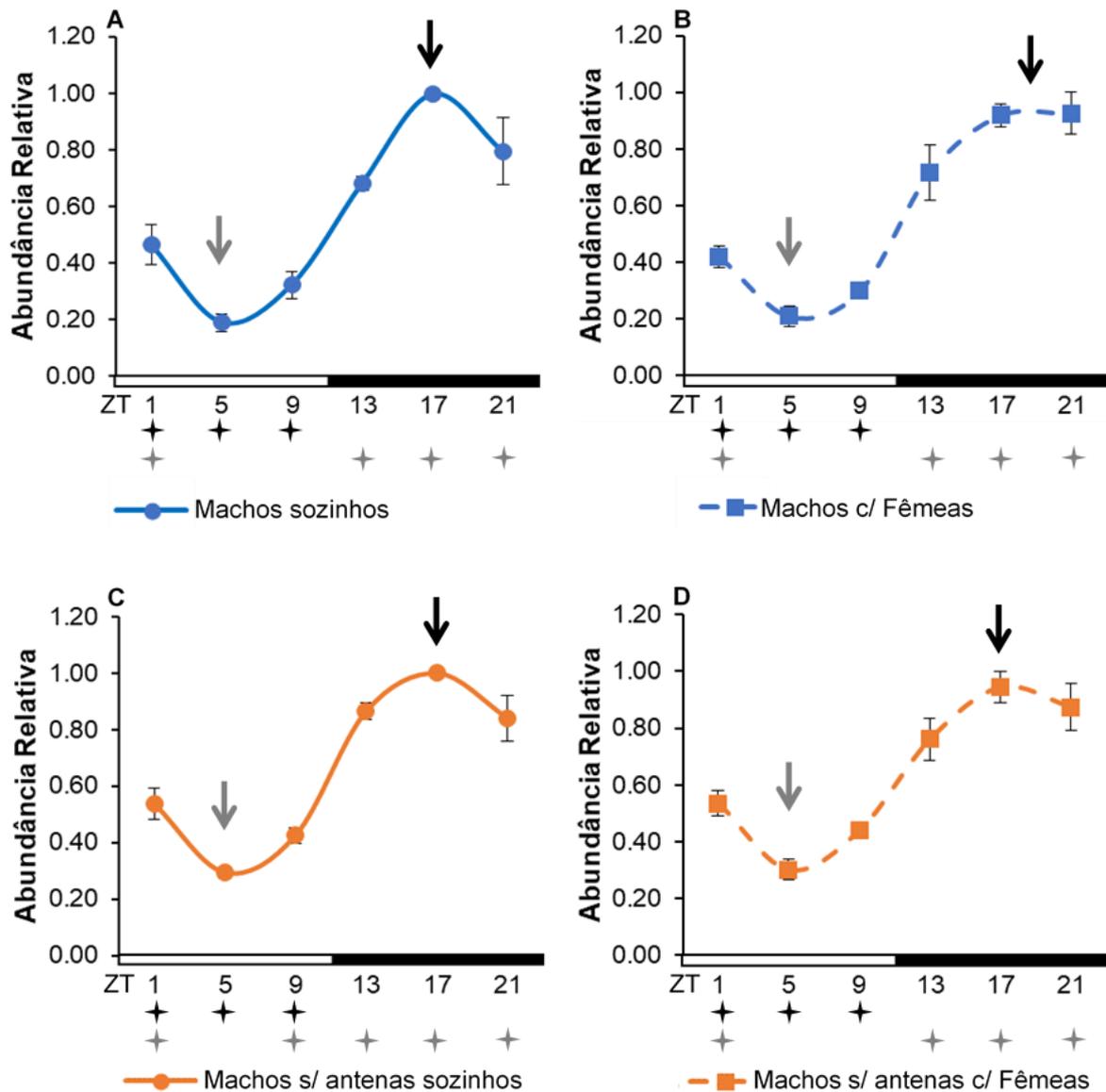


Figura 4.2: Expressão do gene *period*, ao longo de 24 horas, em pontas de abdômen de machos de *Ae. aegypti*. Os gráficos ilustram a expressão do gene *period*, ao longo de 24 horas, em pontas de abdômen de “Machos sozinhos” (linha azul contínua); “Machos com Fêmeas” (linha azul tracejada); “Machos sem antenas sozinhos” (linha coral contínua) e “Machos sem antenas com Fêmeas” (linha coral tracejada). O eixo y indica a abundância relativa de mRNA. O eixo x indica o *Zeitgeber Time* (ZT), que corresponde a cada hora após o acender das luzes. Assim, o ZT 1 significa 1 hora após o acender das luzes e o ZT 13 significa 1 hora após o apagar das luzes. A barra branca representa a fase clara e a barra preta a fase escura. As setas pretas indicam o pico de expressão e as setas cinzas indicam o vale. As estrelas representam os ZTs que são significativamente diferentes do pico de expressão ou do vale, de acordo com a cor das setas. A expressão gênica foi avaliada por PCR quantitativo em Tempo Real e os gráficos foram gerados a partir da média de três réplicas experimentais independentes.

4.1.3 Expressão do gene *period* em antenas de machos expostos ou não à presença de fêmeas

O gene *period*, em amostras de antenas de machos sozinhos, apresentou menor expressão em torno do ZT 5 e maior expressão em torno do ZT 17 (Figura 4.3 A). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 62.29$; $P < 0.0001$). O teste de Tukey mostrou o ZT 17 como significativamente diferente do ZT 5 ($P < 0.001$). Além disso, o mesmo teste indicou o ZT 17 como significativamente diferente dos ZTs 1, 9 e 13, e o ZT 5 como significativamente diferente dos ZTs 1, 13 e 21. Em amostras de antenas de machos com fêmeas, *period* exibiu o mesmo padrão de expressão (Figura 4.3 B). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 26.46$; $P < 0.0001$). O teste de Tukey apontou o ZT 17 como significativamente diferente do ZT 5 ($P < 0.001$) e dos ZTs 1 e 9, além de apontar o ZT 5 como significativamente diferente dos ZTs 13 e 21.

Perfil de expressão de *period* em antenas de machos de *Ae. aegypti*

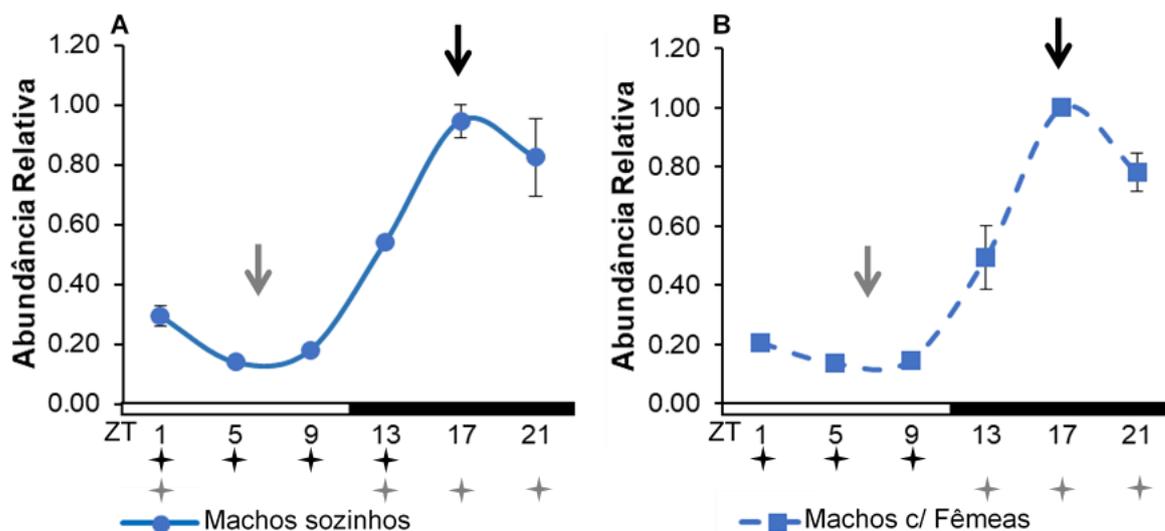


Figura 4.3: Expressão do gene *period*, ao longo de 24 horas, em antenas de machos de *Ae. aegypti*. Os gráficos ilustram a expressão do gene *period*, ao longo de 24 horas, em antenas de “Machos sozinhos” (linha azul contínua) e “Machos com Fêmeas” (linha azul tracejada). O eixo y indica a abundância relativa de mRNA. O eixo x indica o *Zeitgeber Time* (ZT), que corresponde a cada hora após o acender das luzes. Assim, o ZT 1 significa 1 hora após o acender das luzes e o ZT 13 significa 1 hora após o apagar das luzes. A barra branca representa a fase clara e a barra preta a fase escura. As setas pretas indicam o pico de expressão e as setas cinzas indicam o vale. As estrelas representam os ZTs que são significativamente diferentes do pico de expressão ou do vale, de acordo com a cor das setas. A expressão gênica foi avaliada por PCR quantitativo em Tempo Real e os gráficos foram gerados a partir da média de três réplicas experimentais independentes.

4.1.4 Expressão do gene *cycle* em cabeças de machos com antenas e sem antenas expostos ou não à presença de fêmeas

O gene *cycle*, em amostras de cabeças de machos sozinhos, apresentou maior expressão no ZT 1 e menor expressão no ZT 13 (Figura 4.4 A). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 88.61$; $P < 0.0001$). O teste de Tukey apontou diferença significativa entre o pico e o vale ($P < 0.001$) e entre eles e os demais ZTs.

Em cabeças de machos com fêmeas, *cycle* apresentou um maior valor de expressão em torno do ZT 5 e um vale no ZT 13 (Figura 4.4 B). A análise de variância (ANOVA) mostrou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 23.64$; $P < 0.0001$). Segundo o teste de Tukey, o ZT 5 foi significativamente diferente do ZT 13 ($P < 0.001$) e do ZT 17, e o ZT 13 foi significativamente diferente de todos os outros ZTs.

Em relação a amostras de cabeças de machos sem antenas sozinhos, o perfil gráfico de *cycle* evidenciou um pico de expressão entre o ZT1 e o ZT 5, e um vale no ZT13 (Figura 4.4 C). A análise de variância (ANOVA) apresentou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 145.3$; $P < 0.0001$). O teste de Tukey apontou o ZT de maior valor (ZT 5) como significativamente diferente do ZT 13 ($P < 0.001$) e dos ZTs 9, 17 e 21, e apontou o ZT 13 como significativamente diferente de todos os ZTs.

Em cabeças de machos sem antenas com fêmeas, o perfil gráfico indicou uma maior expressão de *cycle* em torno do ZT 1 e uma menor expressão no ZT 13 (Figura 4.4 D). A análise de variância (ANOVA) apresentou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 187.0$; $P < 0.0001$). O teste de Tukey indicou o ZT 1 como significativamente diferente do ZT 13 ($P < 0.001$) e dos ZTs 9, 17 e 21, e indicou o ZT 13 como significativamente diferente de todos os ZTs.

Perfil de expressão de *cycle* em cabeças de machos de *Ae. aegypti*

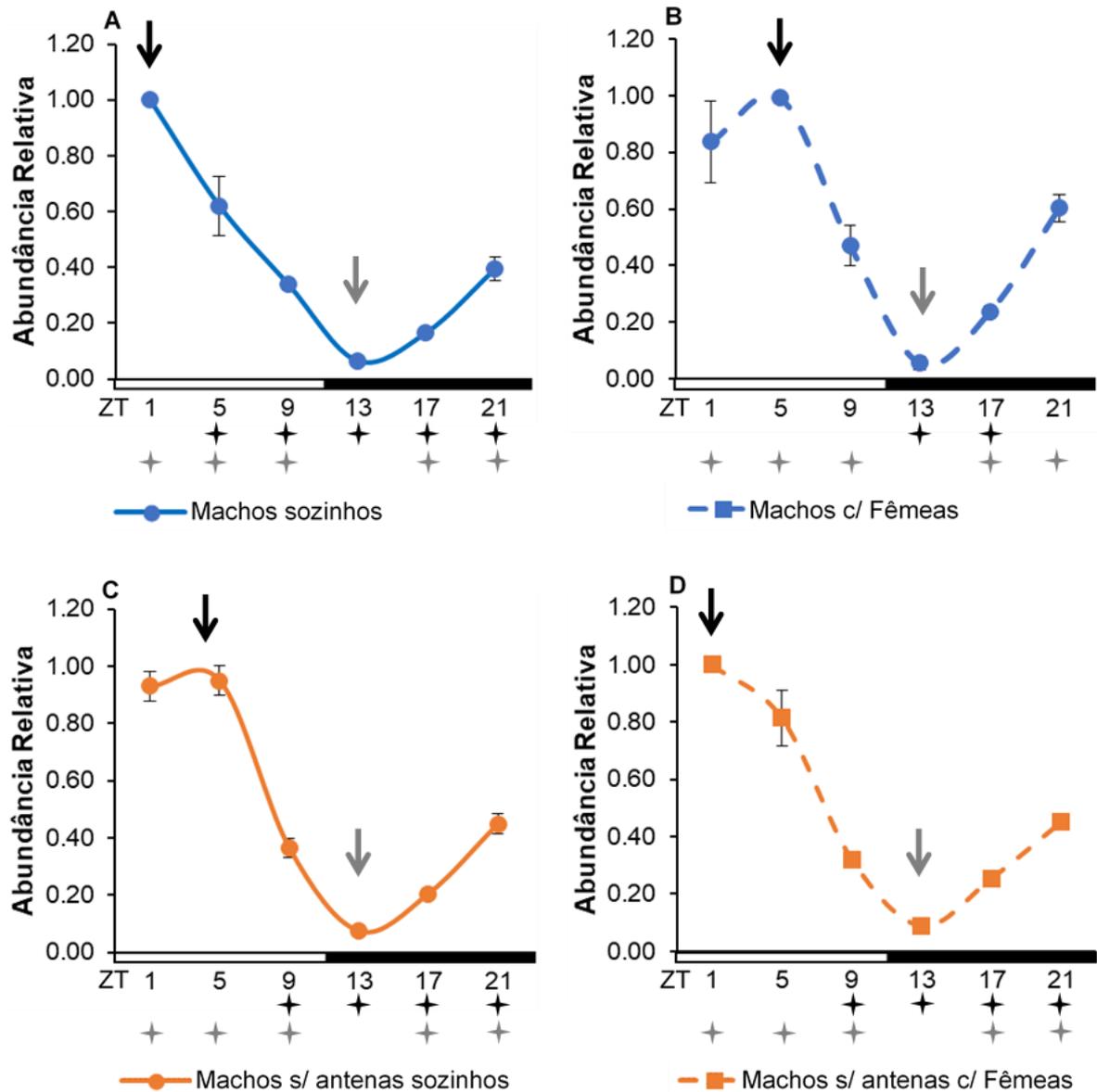


Figura 4.4: Expressão do gene *cycle*, ao longo de 24 horas, em cabeças de machos de *Ae. aegypti*. Os gráficos ilustram a expressão do gene *cycle*, ao longo de 24 horas, em cabeças de “Machos sozinhos” (linha azul contínua); “Machos com Fêmeas” (linha azul tracejada); “Machos sem antenas sozinhos” (linha coral contínua) e “Machos sem antenas com Fêmeas” (linha coral tracejada). O eixo y indica a abundância relativa de mRNA. O eixo x indica o *Zeitgeber Time* (ZT), que corresponde a cada hora após o acender das luzes. Assim, o ZT 1 significa 1 hora após o acender das luzes e o ZT 13 significa 1 hora após o apagar das luzes. A barra branca representa a fase clara e a barra preta a fase escura. As setas pretas indicam o pico de expressão e as setas cinzas indicam o vale. As estrelas pretas representam os ZTs que são significativamente diferentes do pico de expressão e as estrelas cinzas representam os ZTs que são significativamente diferentes do vale. A expressão gênica foi avaliada por PCR quantitativo em Tempo Real e os gráficos foram gerados a partir da média de três réplicas experimentais independentes.

4.1.5 Expressão do gene *cycle* em pontas de abdômen de machos com antenas e sem antenas expostos ou não à presença de fêmeas

Em relação a *cycle*, em amostras de ponta de abdômen de machos sozinhos, o perfil gráfico indicou uma maior expressão em torno do ZT 1 e uma menor expressão em torno do ZT 13 (Figura 4.5 A). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 4.107$ $P = 0.0209$) e o teste de Tukey apontou o ZT 1 como significativamente diferente do ZT 13 ($P < 0.05$).

Em pontas de abdômen de machos com fêmeas, o perfil gráfico indicou que *cycle* apresentou maior expressão em torno do ZT 5 e menor expressão em torno do ZT 13 (Figura 4.5 B). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 13.58$; $P = 0.0001$). O teste de Tukey apontou o ZT 5 como significativamente diferente do ZT 13 ($P < 0.001$) e dos ZTs 17 e 21, e apontou o ZT 13 como significativamente diferente dos ZTs 1 e 9.

Nos machos sem antenas sozinhos, a expressão de *cycle* em pontas de abdômen apresentou maior valor em torno do ZT 5 e menor valor em torno do ZT 13 (Figura 4.5 C). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 15.05$ $P < 0.0001$). O teste de Tukey mostrou o ZT 5 como significativamente diferente do ZT 13 ($P < 0.001$) e dos ZTs 9, 17 e 21, e mostrou o ZT 13 como significativamente diferente do ZT 1.

O mesmo padrão foi observado em pontas de abdômen de machos sem antenas com fêmeas, o perfil gráfico indicou uma maior expressão de *cycle* em torno do ZT 5 e uma menor expressão em torno do ZT 13 (Figura 4.5 D). A análise de variância (ANOVA) apresentou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 7.870$; $P = 0.0017$). O teste de Tukey mostrou diferença significativa entre o ZT 5 e o ZT 13 ($P < 0.01$), além de mostrar diferença significativa entre os ZTs 5 e 9, e entre os ZTs 13 e 1.

Perfil de expressão de *cycle* em pontas de abdômen de machos de *Ae. aegypti*

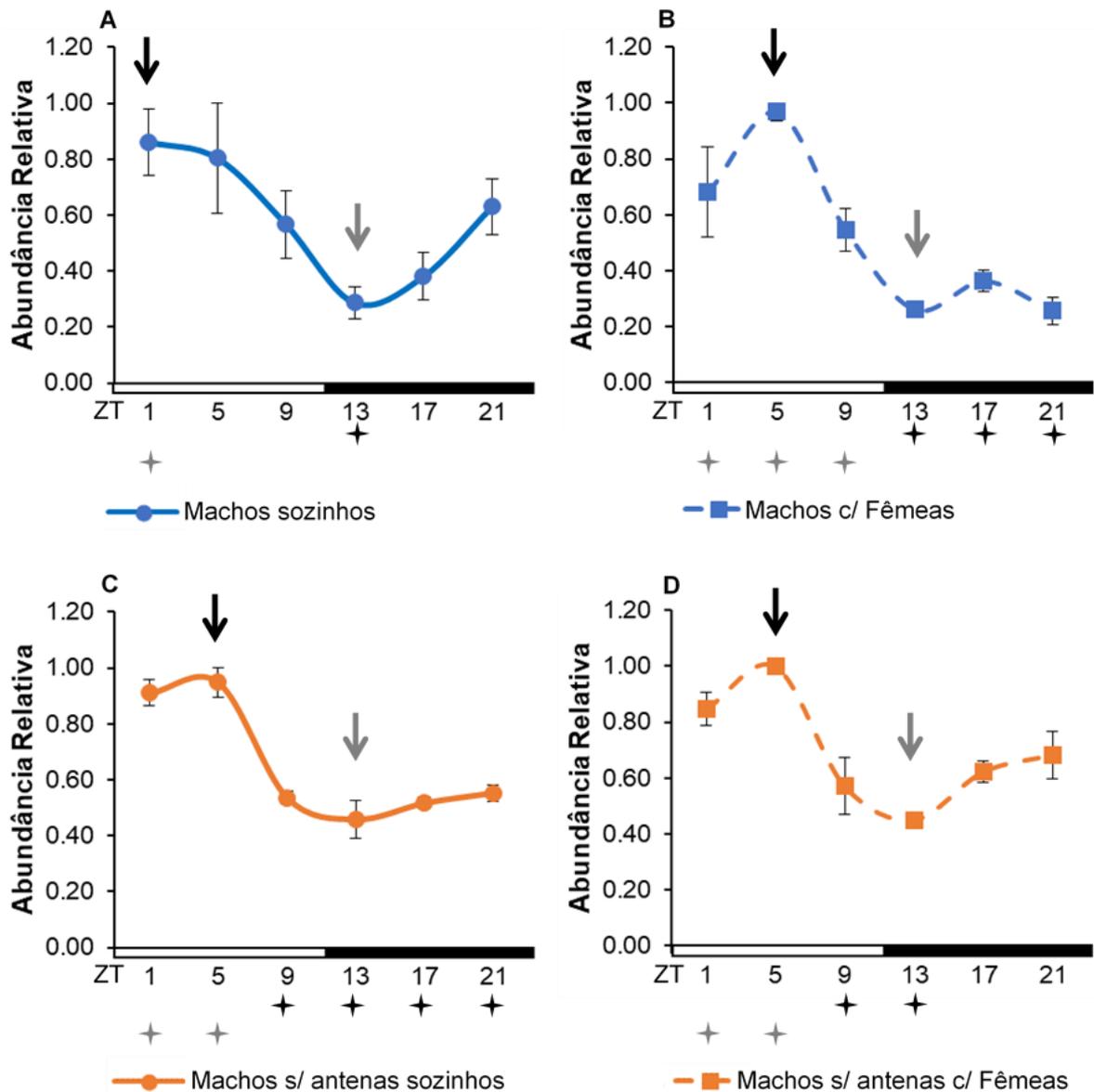


Figura 4.5: Expressão do gene *cycle*, ao longo de 24 horas, em pontas de abdômen de machos de *Ae. aegypti*. Os gráficos ilustram a expressão do gene *cycle*, ao longo 24 horas, em pontas de abdômen de “Machos sozinhos” (linha azul contínua); “Machos com Fêmeas” (linha azul tracejada); “Machos sem antenas sozinhos” (linha coral contínua) e “Machos sem antenas com Fêmeas” (linha coral tracejada). O eixo y indica a abundância relativa de mRNA. O eixo x indica o *Zeitgeber Time* (ZT), que corresponde a cada hora após o acender das luzes. Assim, o ZT 1 significa 1 hora após o acender das luzes e o ZT 13 significa 1 hora após o apagar das luzes. A barra branca representa a fase clara e a barra preta a fase escura. As setas pretas indicam o pico de expressão e as setas cinzas indicam o vale. As estrelas representam os ZTs que são significativamente diferentes do pico de expressão ou do vale, de acordo com a cor das setas. A expressão gênica foi avaliada por PCR quantitativo em Tempo Real e os gráficos foram gerados a partir da média de três réplicas experimentais independentes.

4.1.6 Expressão do gene *cycle* em antenas de machos expostos ou não à presença de fêmeas

Nas amostras de antenas de machos sozinhos, o gene *cycle*, apresentou o maior valor de expressão em torno do ZT 1 e o menor valor de expressão no ZT 13 (Figura 4.6 A). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 43.69$; $P < 0.0001$). O teste de Tukey apontou o ZT 1 como significativamente diferente do ZT 13 ($P < 0.001$) e dos ZTs 9, 17 e 21, e apontou o ZT 13 como significativamente diferente de todos os ZTs. Em antenas de machos com fêmeas, o perfil gráfico da expressão de *cycle* indicou um maior valor em torno do ZT 5 e um menor valor em torno do ZT 13 (Figura 4.6 B). A análise de variância (ANOVA) apresentou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 15.66$; $P < 0.0001$). O teste de Tukey apontou o ZT 5 como significativamente diferente do ZT 13 ($P < 0.001$) e dos ZTs 9 e 17, e apontou o ZT 13 como significativamente diferente dos ZTs 1, 9 e 21.

Perfil de expressão de *cycle* em antenas de machos de *Ae. aegypti*

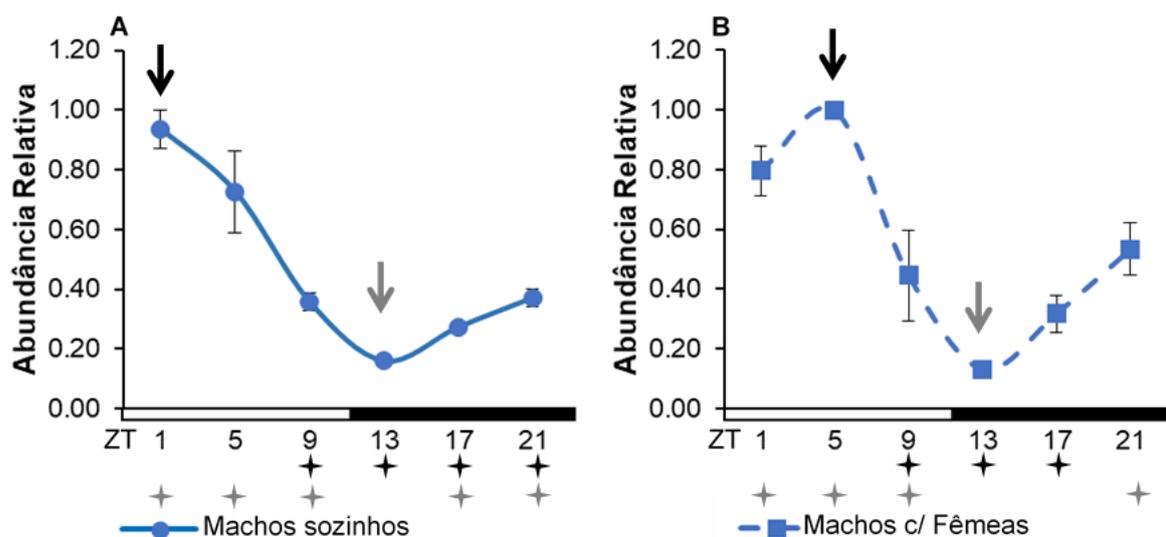


Figura 4.6: Expressão do gene *cycle*, ao longo de 24 horas, em antenas de machos de *Ae. aegypti*. Os gráficos ilustram a expressão do gene *cycle*, ao longo de 24 horas, em antenas de “Machos sozinhos” (linha azul contínua) e “Machos com Fêmeas” (linha azul tracejada). O eixo y indica a abundância relativa de mRNA. O eixo x indica o *Zeitgeber Time* (ZT), que corresponde a cada hora após o acender das luzes. Assim, o ZT 1 significa 1 hora após o acender das luzes e o ZT 13 significa 1 hora após o apagar das luzes. A barra branca representa a fase clara e a barra preta a fase escura. As setas pretas indicam o pico de expressão e as setas cinzas indicam o vale. As estrelas representam os ZTs que são significativamente diferentes do pico de expressão ou do vale, de acordo com a cor das setas. A expressão gênica foi avaliada por PCR quantitativo em Tempo Real e os gráficos foram gerados a partir da média de três réplicas experimentais independentes.

4.1.7 Expressão do gene *cryptochrome 2* em cabeças de machos com antenas e sem antenas expostos ou não à presença de fêmeas

O gene *cryptochrome 2* (*cry2*), em cabeças de machos sozinhos, aparentemente apresentou dois picos de expressão, um em torno do ZT 1 e outro em torno do ZT 17. A menor expressão foi registrada no ZT 9 (Figura 4.7 A). A análise de variância (ANOVA) apresentou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 15.35$; $P < 0.0001$). O teste de Tukey mostrou o ZT 1 como significativamente diferente do ZT 9 ($P < 0.001$), o ZT 17 como significativamente diferente do ZT 9 ($P < 0.001$) e do ZT 5, além de mostrar o ZT 9 como significativamente diferente de todos os ZTs.

Em cabeças de machos com fêmeas, *cry2* apresentou o menor valor de expressão em torno do ZT 9 e o maior valor de expressão em torno do ZT 17 (Figura 4.7 B). A análise de variância (ANOVA) apresentou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 4.190$; $P = 0.0195$). O teste de Tukey apontou o ZT 17 e o ZT 9 como significativamente diferentes ($P < 0.05$) e apontou o ZT 9 como significativamente diferente do ZT 21.

O perfil gráfico de *cry2*, em cabeças de machos sem antenas sozinhos, aparentemente também apresentou dois picos de expressão. O primeiro pico foi registrado em torno do ZT 1 e o segundo pico em torno do ZT 17. A menor expressão se concentrou no ZT 9 (Figura 4.7 C). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 39.68$; $P < 0.0001$). O teste de Tukey apontou diferença significativa entre o ZT 1 e o ZT 9 ($P < 0.001$), entre o ZT 17 e os ZTs 9 ($P < 0.001$) e 5, e entre o ZT 9 e todos os ZTs.

Em relação à expressão de *cry2* em amostras de cabeças de machos sem antenas com fêmeas, aparentemente foi observado um pico menos acentuado em torno do ZT 1 e um pico principal no ZT 17. O menor valor de expressão foi registrado no ZT 9. A análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 123.2$; $P < 0.0001$). O teste de Tukey apontou o ZT 1 como significativamente diferente dos ZTs 9 ($P < 0.001$), 13, 17 e 21. O mesmo teste apontou o ZT 17 como significativamente diferente do ZT 9 ($P < 0.001$) e dos demais ZTs, além de mostrar diferença significativa entre o ZT 9 e todos os ZTs.

Perfil de expressão de *cryptochrome 2* em cabeças de machos de *Ae. aegypti*

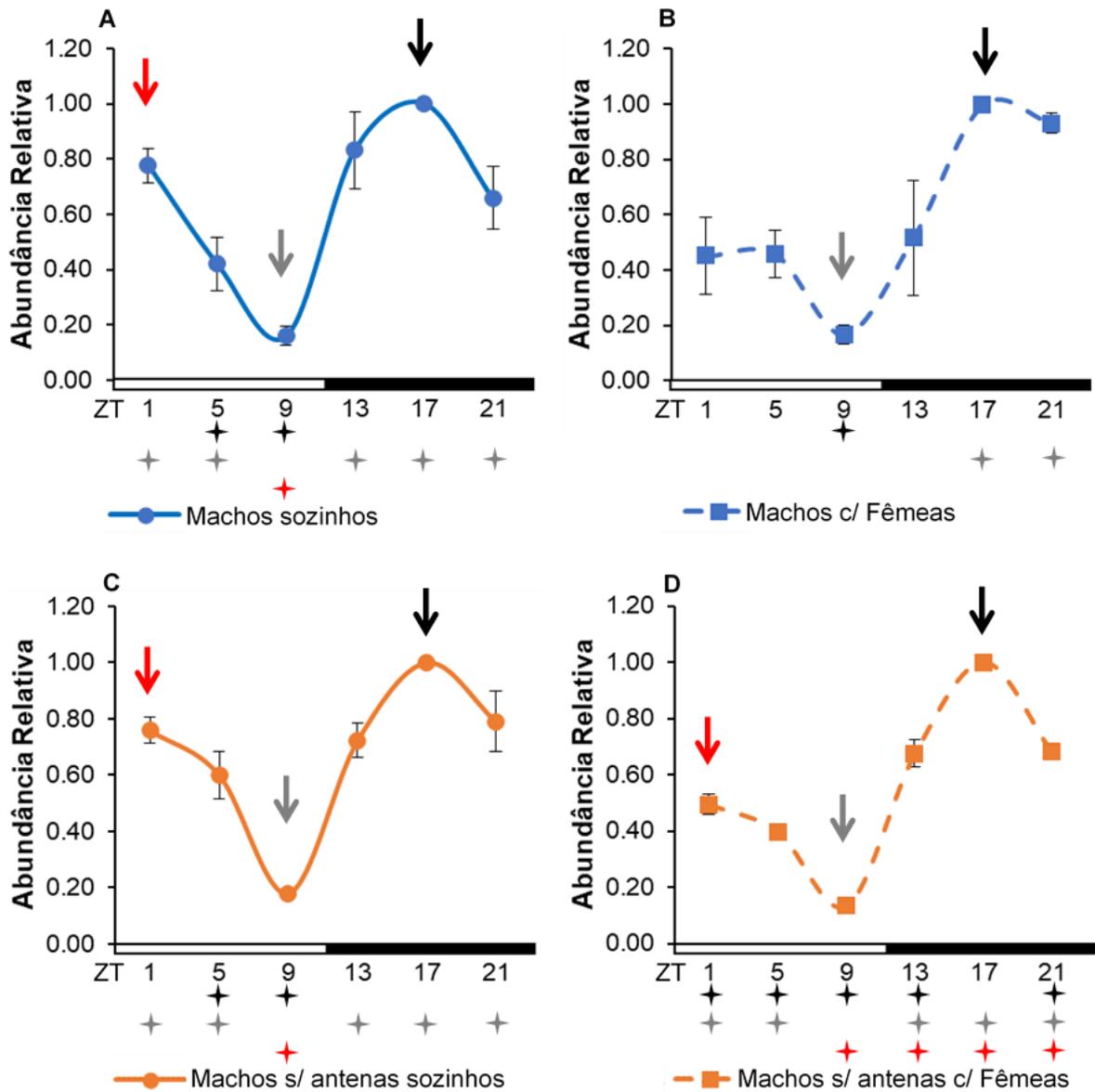


Figura 4.7: Expressão do gene *cry2*, ao longo de 24 horas, em cabeças de machos de *Ae. aegypti*. Os gráficos ilustram a expressão do gene *cry2*, ao longo de 24 horas, em cabeças de “Machos sozinhos” (linha azul contínua); “Machos com Fêmeas” (linha azul tracejada); “Machos sem antenas sozinhos” (linha coral contínua) e “Machos sem antenas com Fêmeas” (linha coral tracejada). O eixo y indica a abundância relativa de mRNA. O eixo x indica o *Zeitgeber Time* (ZT), que corresponde a cada hora após o acender das luzes. Assim, o ZT 1 significa 1 hora após o acender das luzes e o ZT 13 significa 1 hora após o apagar das luzes. A barra branca representa a fase clara e a barra preta a fase escura. As setas pretas e vermelhas indicam o pico de expressão, as setas vermelhas o segundo pico e as setas cinzas indicam o vale. As estrelas representam os ZTs que são significativamente diferentes do pico de expressão ou do vale, de acordo com a cor das setas. A expressão gênica foi avaliada por PCR quantitativo em Tempo Real e os gráficos foram gerados a partir da média de três réplicas experimentais independentes.

4.1.8 Expressão do gene *cryptochrome 2* em pontas de abdômen de machos com antenas e sem antenas expostos ou não à presença de fêmeas

Em relação a *cry2* em pontas de abdômen de machos sozinhos, a análise de variância (ANOVA) apresentou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 5.033$; $P = 0.0102$) e o perfil gráfico indicou uma menor expressão em torno do ZT 9 e uma maior expressão em torno do ZT 21 (Figura 4.8 A). No entanto o teste de Tukey não mostrou diferença significativa entre os ZTs. Em pontas de abdômen de machos com fêmeas (Figura 4.8 B), a análise de variância (ANOVA) não indicou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 1.647$; $P = 0.2217$).

Já em pontas de abdômen de machos sem antenas sozinhos, a análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 5.315$; $P = 0.0084$). O perfil gráfico apontou um pico de expressão em torno do ZT 1, outro pico em torno do ZT 13 e um vale em torno do ZT 9 (Figura 4.8 C). O teste de Tukey mostrou diferença significativa entre os picos e o vale ($P < 0.05$).

Em pontas de abdômen de machos sem antenas com fêmeas, a análise de variância (ANOVA) também mostrou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 6.432$; $P = 0.0040$). O perfil gráfico evidenciou uma menor expressão em torno do ZT 9 e uma maior expressão em torno do ZT 17 (Figura 4.8 D). O teste de Tukey apresentou diferença significativa entre o ZT 17 e o ZT 9 ($P < 0.01$), e entre o ZT 9 e os ZTs 13, 17 e 21.

Perfil de expressão de *cryptochrome 2* em pontas de abdômen de machos de *Ae. aegypti*

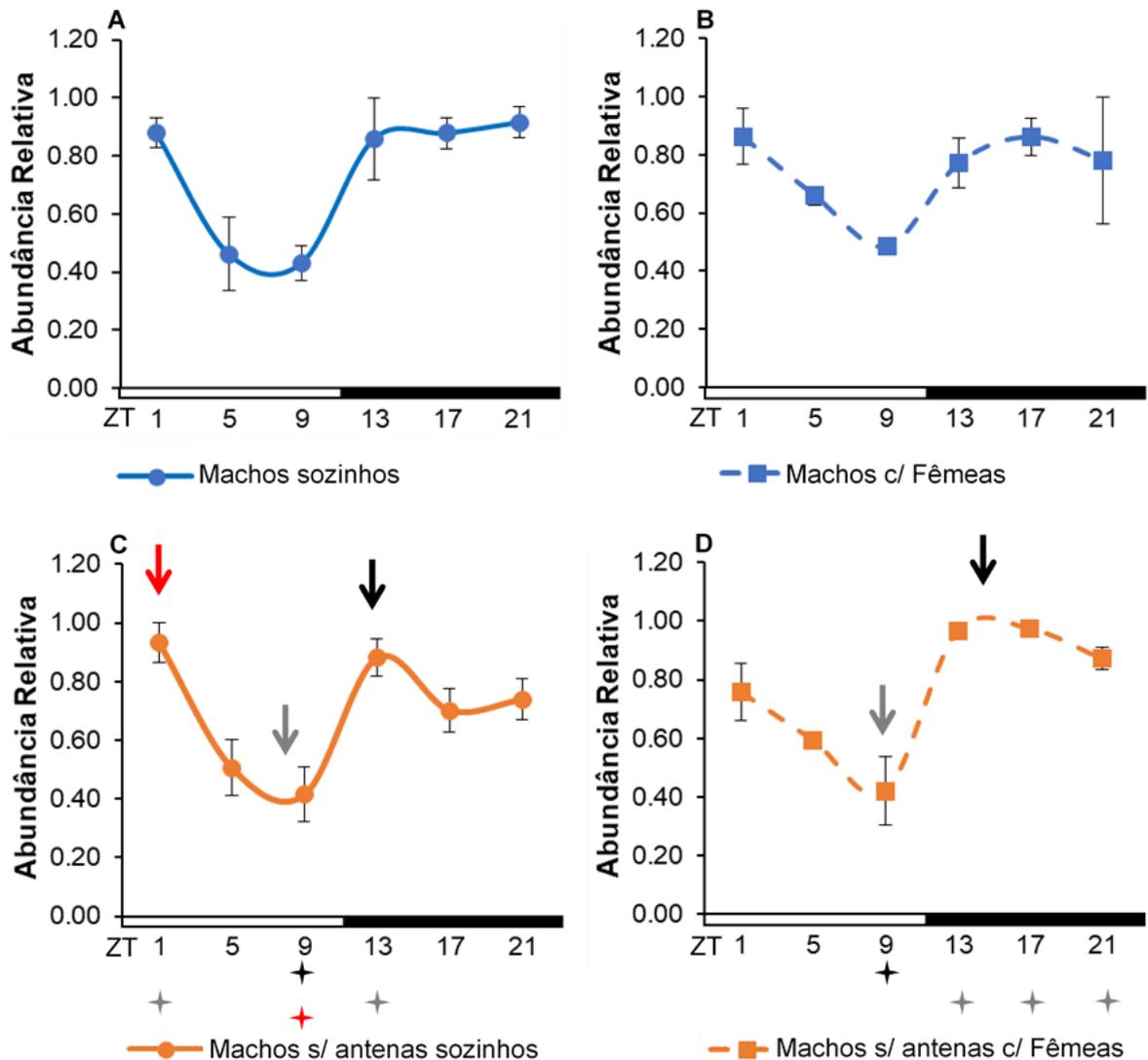


Figura 4.8: Expressão do gene *cry2*, ao longo de 24 horas, em pontas de abdômen de machos de *Ae. aegypti*. Os gráficos ilustram a expressão do gene *cry2*, ao longo de 24 horas, em pontas de abdômen de “Machos sozinhos” (linha azul contínua); “Machos com Fêmeas” (linha azul tracejada); “Machos sem antenas sozinhos” (linha coral contínua) e “Machos sem antenas com Fêmeas” (linha coral tracejada). O eixo y indica a abundância relativa de mRNA. O eixo x indica o *Zeitgeber Time* (ZT), que corresponde a cada hora após o acender das luzes. Assim, o ZT 1 significa 1 hora após o acender das luzes e o ZT 13 significa 1 hora após o apagar das luzes. A barra branca representa a fase clara e a barra preta a fase escura. As setas pretas e vermelhas indicam o pico de expressão e as setas cinzas indicam o vale. As estrelas representam os ZTs que são significativamente diferentes do pico de expressão ou do vale, de acordo com a cor das setas. A expressão gênica foi avaliada por PCR quantitativo em Tempo Real e os gráficos foram gerados a partir da média de três réplicas experimentais independentes.

4.1.9 Expressão do gene *cryptochrome 2* em antenas de machos expostos ou não à presença de fêmeas

Em relação ao perfil gráfico de *cry2* em antenas de machos sozinhos, foi observada uma menor expressão em torno do ZT 9 e uma maior expressão em torno do ZT 21 (Figura 4.9 A). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 26.69$; $P < 0.0001$). O teste de Tukey mostrou o ZT 21 como significativamente diferente do ZT 9 ($P < 0.001$) e dos ZTs 5 e 13. O mesmo teste também apontou o ZT 9 como significativamente diferente dos ZTs 1, 13 e 17. O mesmo perfil foi observado em antenas de machos com fêmeas (Figura 4.9 B). A análise de variância (ANOVA) mostrou diferença significativa entre os ZTs ($F_{5,12} = 26.13$; $P < 0.0001$). O teste de Tukey apontou o ZT 21 como significativamente diferente do ZT 9 ($P < 0.001$) e dos ZTs 1, 5 e 13, além de apontar o ZT 9 como significativamente diferente dos ZTs 1 e 17.

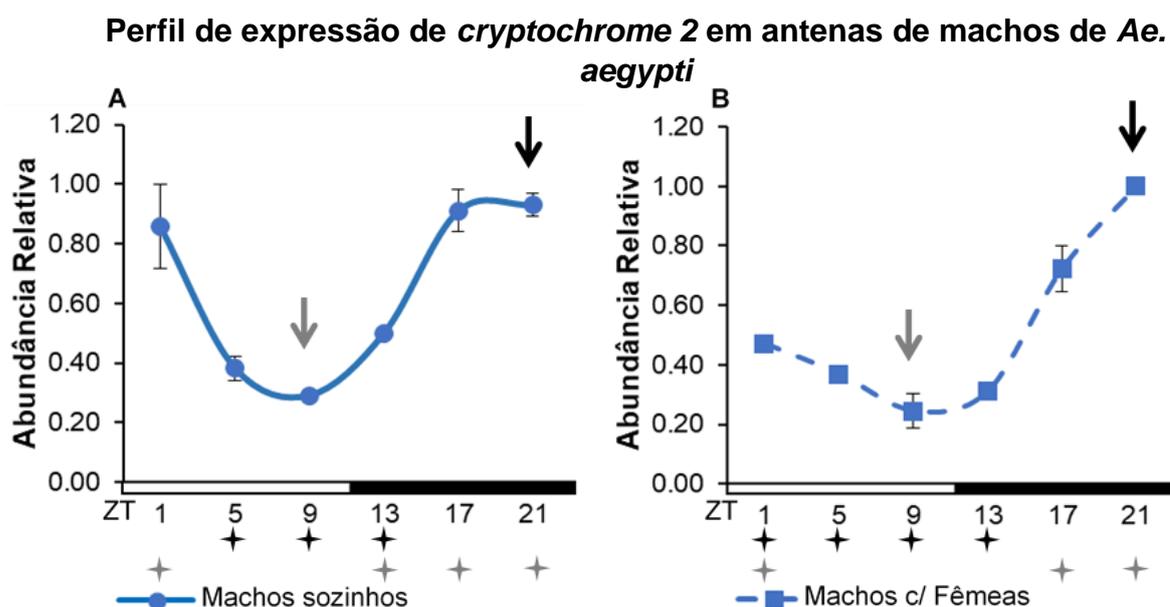


Figura 4.9: Expressão do gene *cry2*, ao longo de 24 horas, em antenas de machos de *Ae. aegypti*. Os gráficos ilustram a expressão do gene *cry2*, ao longo de 24 horas, em antenas de “Machos sozinhos” (linha azul contínua) e “Machos com Fêmeas” (linha azul tracejada). O eixo y indica a abundância relativa de mRNA. O eixo x indica o *Zeitgeber Time* (ZT), que corresponde a cada hora após o acender das luzes. Assim, o ZT 1 significa 1 hora após o acender das luzes e o ZT 13 significa 1 hora após o apagar das luzes. A barra branca representa a fase clara e a barra preta a fase escura. As setas pretas indicam o pico de expressão e as setas cinzas indicam o vale. As estrelas representam os ZTs que são significativamente diferentes do pico de expressão ou do vale, de acordo com a cor das setas. A expressão gênica foi avaliada por PCR quantitativo em Tempo Real e os gráficos foram gerados a partir da média de três réplicas experimentais independentes.

4.2 Perfis de expressão dos genes *orco* e *fruitless* em amostras de cabeças, antenas e pontas de abdômen de machos de *Ae. aegypti* expostos ou não a fêmeas

Os perfis de expressão do gene do co-receptor *Orco* e do gene *fruitless* também foram analisados em tecidos de machos sozinhos, machos que foram expostos a fêmeas, machos sem antenas sozinhos e machos sem antenas com fêmeas.

Para o gene *Orco*, as análises de variância (ANOVA) indicaram diferenças não significativas entre os ZTs, para a maioria das condições analisadas nas amostras de cabeças e antenas, com exceção das amostras de cabeças de machos sem antenas com fêmeas ($F_{5,12} = 3.223$; $P = 0.0449$) (Figura 4.10 D). No entanto, o teste de Tukey não apresentou diferença significativa entre esses ZTs. As figuras 4.10 e 4.11 ilustram, respectivamente, o perfil gráfico de expressão do gene *Orco* em cabeças e antenas.

Em relação à expressão de *fruitless*, as análises de variância (ANOVA) indicaram diferenças significativas entre os ZTs somente nas amostras de cabeças de machos sem antenas com fêmeas ($F_{5,12} = 3.723$; $P = 0.0288$). Nessa condição, *fruitless* foi mais expresso no ZT 1 e menos expresso no ZT 21 (Figura 4.12 D). O teste de Tukey apontou diferença significativa entre esses ZTs ($P < 0.05$). As figuras 4.12 e 4.13 ilustram os perfis de expressão do gene *fruitless*, respectivamente, em amostras de cabeças e pontas de abdômen, para as condições machos sozinhos, machos com fêmeas, machos sem antenas sozinhos e machos sem antenas com fêmeas.

Perfil de expressão de *Orco* em cabeças de machos de *Ae. aegypti*

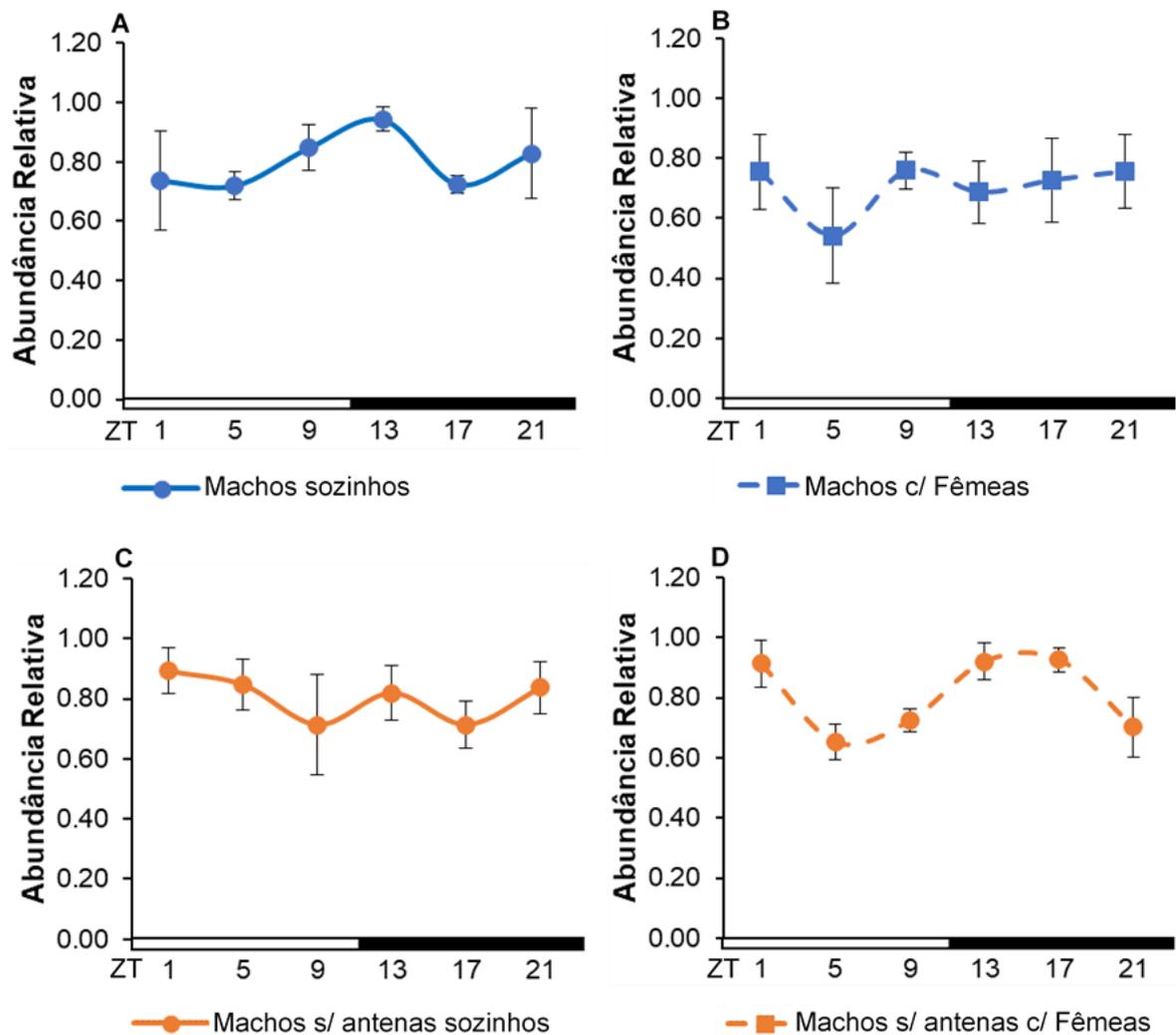


Figura 4.10: Expressão do gene *Orco*, ao longo de 24 horas, em cabeças de machos de *Ae. aegypti*. Os gráficos ilustram a expressão do gene *Orco*, ao longo de 24 horas, em cabeças de “Machos sozinhos” (linha azul contínua); “Machos com Fêmeas” (linha azul tracejada); “Machos sem antenas sozinhos” (linha coral contínua) e “Machos sem antenas com Fêmeas” (linha coral tracejada). O eixo y indica a abundância relativa de mRNA. O eixo x indica o *Zeitgeber Time* (ZT), que corresponde a cada hora após o acender das luzes. Assim, o ZT 1 significa 1 hora após o acender das luzes e o ZT 13 significa 1 hora após o apagar das luzes. A barra branca representa a fase clara e a barra preta a fase escura. A expressão gênica foi avaliada por PCR quantitativo em Tempo Real e os gráficos foram gerados a partir da média de três réplicas experimentais independentes.

Perfil de expressão de *Orco* em antenas de machos de *Ae. aegypti*

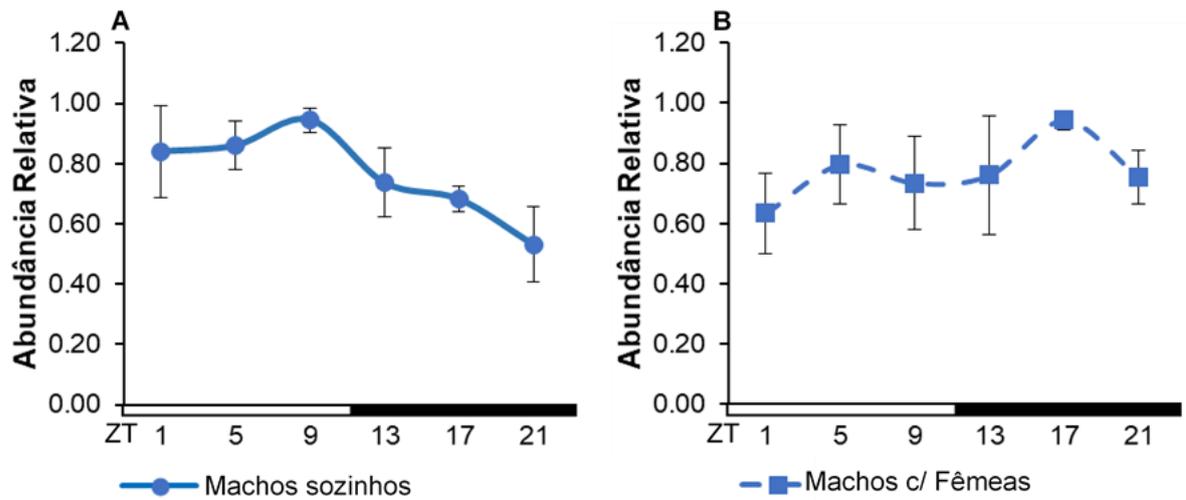


Figura 4.11: Expressão do gene *Orco*, ao longo de 24 horas, em antenas de machos de *Ae. aegypti*. Os gráficos ilustram a expressão do gene *Orco*, ao longo de 24 horas, em antenas de “Machos sozinhos” (linha azul contínua) e “Machos com Fêmeas” (linha azul tracejada). O eixo y indica a abundância relativa de mRNA. O eixo x indica o *Zeitgeber Time* (ZT), que corresponde a cada hora após o acender das luzes. Assim, o ZT 1 significa 1 hora após o acender das luzes e o ZT 13 significa 1 hora após o apagar das luzes. A barra branca representa a fase clara e a barra preta a fase escura. A expressão gênica foi avaliada por PCR quantitativo em Tempo Real e os gráficos foram gerados a partir da média de três réplicas experimentais independentes.

Perfil de expressão de *fruitless* em cabeças de machos de *Ae. aegypti*

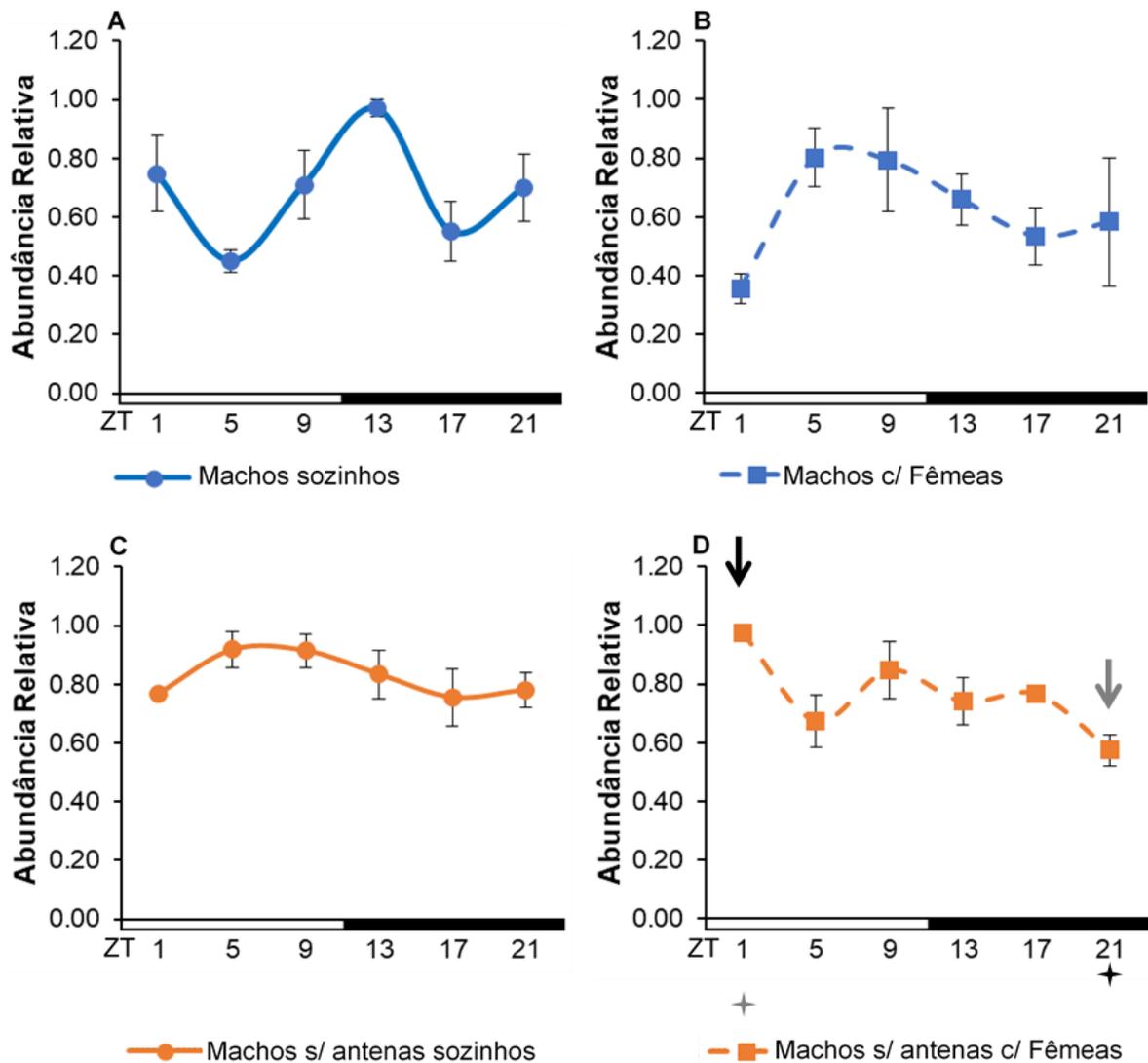


Figura 4.12: Expressão do gene *fruitless*, ao longo de 24 horas, em cabeças de machos de *Ae. aegypti*. Os gráficos ilustram a expressão do gene *fruitless*, ao longo de 24 horas, em cabeças de “Machos sozinhos” (linha azul contínua); “Machos com Fêmeas” (linha azul tracejada); “Machos sem antenas sozinhos” (linha coral contínua) e “Machos sem antenas com Fêmeas” (linha coral tracejada). O eixo y indica a abundância relativa de mRNA. O eixo x indica o *Zeitgeber Time* (ZT), que corresponde a cada hora após o acender das luzes. Assim, o ZT 1 significa 1 hora após o acender das luzes e o ZT 13 significa 1 hora após o apagar das luzes. A barra branca representa a fase clara e a barra preta a fase escura. As setas pretas indicam o pico de expressão e as setas cinzas indicam o vale. As estrelas representam os ZTs que são significativamente diferentes do pico de expressão ou do vale, de acordo com a cor das setas. A expressão gênica foi avaliada por PCR quantitativo em Tempo Real e os gráficos foram gerados a partir da média de três réplicas experimentais independentes.

Perfil de expressão de *fruitless* em pontas de abdômen de machos de *Ae. aegypti*

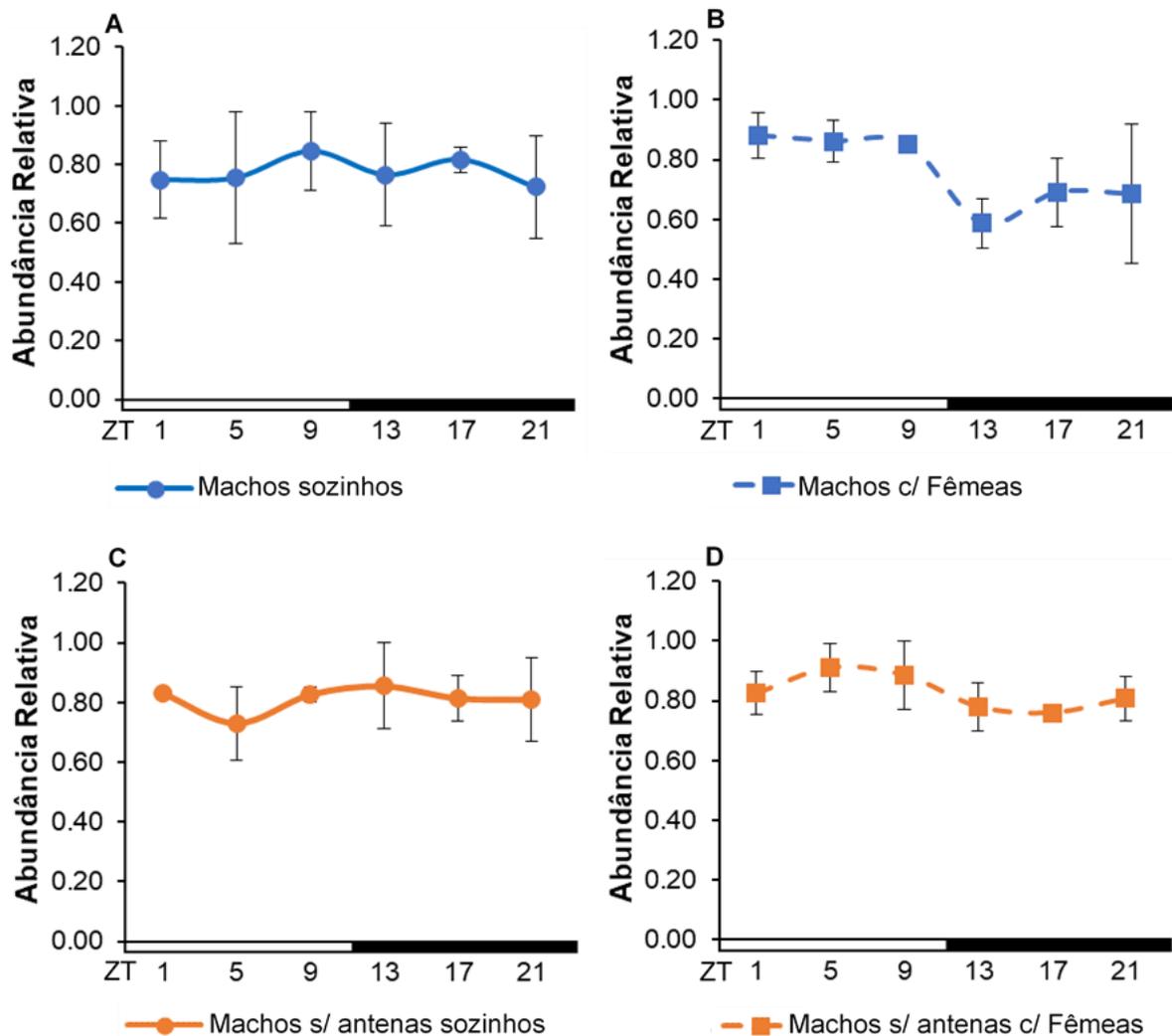


Figura 4.13: Expressão do gene *fruitless*, ao longo de 24 horas, em pontas de abdômen de machos de *Ae. aegypti*. Os gráficos ilustram a expressão do gene *fruitless*, ao longo de 24 horas, em pontas de abdômen de “Machos sozinhos” (linha azul contínua); “Machos com Fêmeas” (linha azul tracejada); “Machos sem antenas sozinhos” (linha coral contínua) e “Machos sem antenas com Fêmeas” (linha coral tracejada). O eixo y indica a abundância relativa de mRNA. O eixo x indica o *Zeitgeber Time* (ZT), que corresponde a cada hora após o acender das luzes. Assim, o ZT 1 significa 1 hora após o acender das luzes e o ZT 13 significa 1 hora após o apagar das luzes. A barra branca representa a fase clara e a barra preta a fase escura. A expressão gênica foi avaliada por PCR quantitativo em Tempo Real e os gráficos foram gerados a partir da média de três réplicas experimentais independentes.

5 DISCUSSÃO

Em um trabalho anterior do nosso grupo (Araripe et al., 2018), analisamos o padrão de atividade locomotora/voo de machos de *Ae. aegypti* em resposta à presença de fêmeas confinadas, e encontramos que quando fêmeas virgens estão presentes o padrão de atividade dos machos é significativamente alterado. Ao anoitecer, os machos expostos a fêmeas virgens apresentaram o segundo pico de atividade significativamente maior que o pico dos machos que permaneceram sozinhos. Esse segundo pico de atividade dos machos sobrepõe-se ao pico único das fêmeas no ZT 12. Portanto, esse resultado indica que os machos são capazes de perceber as fêmeas e alterar o seu comportamento de atividade, exibindo maior atividade no mesmo momento que as fêmeas exibem. Para entender quais sinais poderiam estar envolvidos nessa mudança de atividade dos machos, foi conduzido um experimento utilizando mosquitos que tiveram órgãos importantes para a comunicação, removidos. Os resultados sugeriram que os machos conseguem perceber as fêmeas mesmo quando elas têm suas asas removidas e não produzem o som de batimento das asas, indicando que outros sinais além do som podem estar envolvidos no reconhecimento, como por exemplo sinais químicos e visuais.

A partir desses resultados, nos perguntamos se essa alteração no padrão de atividade dos machos poderia estar acompanhada de uma possível alteração na expressão de alguns genes do relógio circadiano, genes de receptores olfativos e genes envolvidos com o reconhecimento de parceiro reprodutivo. Portanto, nesse estudo foram analisados os perfis de expressão de três genes do relógio circadiano (*period*, *cycle* e *cryptochrome 2*), do gene do co-receptor olfativo *Orco* e do gene de comportamento *fruitless*, ao longo de 24 horas. A expressão desses genes foi analisada em três tecidos dos machos: cabeças, antenas e pontas de abdômen, e em quatro condições: machos sozinhos, machos com fêmeas, machos sem antenas sozinhos e machos sem antenas com fêmeas.

5.1 Expressão dos genes de relógio *period*, *cycle* e *cryptochrome 2*

Diversas espécies apresentam flutuações rítmicas de uma variedade de processos comportamentais e fisiológicos. No organismo modelo *Drosophila melanogaster*, alguns estudos já demonstraram a influência dos genes de relógio no comportamento reprodutivo. Em Kyriacou et al. (1980 e 1990) foi demonstrado que machos dessa espécie carregando mutantes do gene de relógio *period* exibem diferentes padrões dos ritmos de sons, produzidos pelo batimento das asas durante a corte. Sakai e Ishida (2001) demonstraram um padrão de atividade de acasalamento, exibindo uma maior frequência na fase clara, um declínio no ZT 12, e um aumento na fase escura (LD 12:12). Esse padrão permaneceu mesmo em escuro constante, indicando um controle dessa atividade pelo relógio circadiano. Além disso, nesse estudo os autores mostraram que os genes *period* e *timeless*, de alguma forma regulam a atividade de acasalamento. Indivíduos mutantes para esses genes, exibiram maior atividade de acasalamento somente durante a fase clara. No entanto, esse padrão não se manteve em escuro constante, indicando também uma regulação dessa atividade pela luz (Sakai & Ishida, 2001).

Ainda em *D. melanogaster*, os genes *period* e *timeless* também foram implicados na regulação da duração da cópula. Beaver e Giebultowicz (2004) encontraram que machos carregando mutações nesses genes exibem uma maior duração da cópula. Em nossos resultados, *period* apresentou um perfil de expressão de mRNA conservado em cabeças, antenas e pontas de abdômen de machos, exibindo uma menor expressão em torno do ZT 5 e uma maior expressão em torno do ZT 17 (Figuras 4.1, 4.2 e 4.3). O mesmo padrão de expressão de *period* foi observado por Gentile e colaboradores (2009) em cabeças de fêmeas de *Ae. aegypti*. Além disso, embora os estudos anteriores tenham indicado a influência de *period* em aspectos do comportamento reprodutivo, nossos resultados indicam que, independentemente da presença de fêmeas, a expressão de *period* permanece com o mesmo padrão visto em machos sozinhos. Acreditamos que, devido a *period*, ser um gene central do relógio e exibir o mesmo padrão de ciclagem entre os tecidos, não tem sua expressão influenciada pelas condições ambientais (interação social) que estudamos aqui. Entretanto, devido à importância desse gene para o comportamento reprodutivo em *Drosophila melanogaster* (Beaver et al., 2002; Beaver & Giebultowicz, 2004; Sakai & Ishida, 2004; Sakai & Kitamoto, 2006), não descartamos a ocorrência de diferenças

no nível traducional e acreditamos que sua proteína possa atuar na regulação de outros genes envolvidos com o comportamento reprodutivo.

Em relação ao gene *cycle*, que é conhecido por apresentar uma expressão constitutiva em *D. melanogaster* (Rutila et al., 1998), em fêmeas de *Ae. aegypti*, Gentile e colaboradores (2009) descreveram uma expressão rítmica, com um pico no ZT 3 e um vale em torno do ZT 13, em regime LD. Em nossos resultados, *cycle* apresentou um mesmo padrão de expressão em amostras de cabeças, pontas de abdômen e antenas de machos sozinhos, exibindo uma maior expressão na fase clara (ZT 1 - ZT 5) e uma menor expressão no início da fase escura (ZT 13) (Figuras 4.4, 4.5 e 4.6). Em relação aos tecidos de machos que foram expostos a presença de fêmeas, *cycle* parece deslocar sua maior expressão para mais tarde, embora não tenha sido uma diferença significativa, e a menor expressão se manteve no ZT 13 (Figuras 4.4, 4.5 e 4.6). Já nos machos sem antenas, os perfis gráficos indicaram um pico no ZT 5 na maioria das condições (Figuras 4.4 e 4.5). Em *D. melanogaster*, experimentos com indivíduos carregando mutações nos principais genes de relógio, incluindo *cycle*, implicam numa baixa fertilidade, sugerindo a importância desses genes para a reprodução (Beaver et al., 2002). Além disso, sabe-se que CYC tem um papel importante na regulação de genes de *output* (revisado em Rivas et al., 2016; Rivas et al., 2018), porém não existe informação específica de regulação ou modulação de genes envolvidos com comportamento reprodutivo. Nossos resultados indicam que o vale de expressão (ZT13) é muito mais bem definido do que o pico de expressão desse gene. Embora os perfis gráficos sugiram um efeito de atraso no pico de expressão, tanto quando fêmeas estão presentes quanto quando machos têm suas antenas removidas, as análises estatísticas que usamos aqui não mostram significância que apoie essa conclusão. Dessa forma, o mais provável é que a percepção da presença de fêmeas não altere a expressão de *cycle* nos tecidos dos machos, e que o pico de expressão desse gene (ZT 1 - ZT 5) seja mais flutuante do que o vale.

A expressão do gene *cryptochrome 2* (*cry2*), por outro lado, parece ter algum envolvimento direto em regulação comportamental. Gentile e colaboradores (2009) analisaram a expressão do gene *cry2* em cabeças de fêmeas de *Ae. aegypti* e de *Culex quinquefasciatus*, e encontraram uma diferença na expressão desse gene entre as duas espécies. Enquanto em *Culex quinquefasciatus* foi observado um pico de expressão, na fase escura, *Ae. aegypti* apresentou um perfil bimodal, com um pico no

início da fase clara e outro na fase escura. Acredita-se que essa diferença entre as duas espécies possa estar relacionada com uma diferença temporal no comportamento de atividade locomotora, já que *Ae. aegypti* possui maior atividade diurna e *Culex quinquefasciatus* possui maior atividade noturna. Em nossos resultados também observamos diferenças nos perfis de expressão de *cry2* em machos, entre as condições e entre os tecidos.

Em cabeças, *cry2* apresentou um perfil bimodal em quase todas as condições analisadas, com exceção da condição machos com fêmeas, onde o primeiro pico é visualmente possível, mas não aparece como ponto significativamente diferente do vale (Figura 4.7 B). Em todas as condições analisadas, o primeiro pico, no ZT 1, foi menor que o segundo pico, no ZT 17. Um padrão bastante interessante foi observado quando machos foram expostos a fêmeas: tanto em machos com antenas como em machos sem antenas, a diferença de expressão entre o primeiro pico, no ZT 1, e o segundo pico, no ZT 17, foi relativamente maior em cabeças de machos que foram expostos a fêmeas do que em cabeças de machos sozinhos (Figura 4.7 B e D).

Em pontas de abdômen também observamos perfis de expressão muito semelhantes em machos sozinhos com antenas e sem antenas, embora o teste de Tukey só tenha apresentado diferença significativa entre os ZTs em machos sem antenas sozinhos. Nessa condição, foi observado um padrão parecido com cabeças, mostrando dois picos de expressão, um no ZT 1 e outro que ocorreu antecipadamente, no ZT 13 (Figura 4.8 C). Em pontas de abdômen de machos com fêmeas, embora a ANOVA não tenha apresentado diferença significativa entre os ZTs (Figura 4.8 B), o perfil gráfico exibe um padrão parecido com a condição machos sem antenas com fêmeas. Nessa condição, *cry2* apresentou uma expressão elevada no início da fase clara e um pico principal na fase escura (Figura 4.8 D).

É importante ressaltar que, independentemente da significância revelada pela ANOVA, os perfis são visualmente bem consistentes dentro das condições machos sozinhos e dentro das condições machos com fêmeas. Com isso, observamos que a interação social (exposição a fêmeas) tem um efeito bem claro na alteração do perfil de expressão de *cry2*.

Em antenas, *cry2* apresentou um único pico de expressão no final da fase escura, tanto em machos sozinhos quanto em machos com fêmeas (Figura 4.9 A e B). Como o pico de expressão se concentrou no final da fase escura e em machos

sozinhos a expressão em antenas se mantém alta no início da fase clara, analisando o perfil gráfico é difícil estabelecer se *cry2* apresenta um ou dois picos de expressão. Assim como nos outros tecidos, em antenas o perfil gráfico indica uma expressão relativamente menor de *cry2* no início da fase clara em machos com fêmeas, quando comparado à condição machos sozinhos (Figura 4.9 A e B). Acredita-se que algumas oscilações rítmicas não são restritas a apenas um controle pelo relógio central (células neuronais do cérebro), mas podem ser reguladas também por relógios periféricos autônomos em diferentes tecidos (revisado em Giebultowicz, 2001). A literatura mostra que relógios autônomos já foram caracterizados em antenas e órgãos reprodutivos de machos (Krishnan et al., 1999; Beaver et al., 2002). Dessa forma, é possível que *cry2* mostre um padrão de oscilação diferente em antenas, com um único pico de expressão, por estar sob regulação de um relógio periférico.

É importante salientar que a ablação das antenas, que são os órgãos responsáveis pela percepção olfativa e auditiva (Göpfert et al., 1999; Guidobaldi et al., 2014), não pareceu afetar a expressão gênica de *cry2*. O fator mais importante na modificação dos perfis de expressão foi a interação social dada pela presença de fêmeas. Portanto, se as antenas não estão presentes, a percepção das fêmeas confinadas, com conseqüente alteração na magnitude relativa do primeiro pico de expressão, deve estar sendo possibilitada por outro sentido que não olfato e audição, possivelmente visão ou tato (através de contato pelo microtúlo), que não foram controlados neste estudo. No nosso trabalho anterior (Araripe et al., 2018) também observamos que a ablação de antenas, embora reduzisse muito a amplitude de atividade locomotora/voo, não alterava a resposta que o perfil de atividade de machos descrevia na presença de fêmeas.

O fato da principal diferença em perfis de expressão de *cry2* ser devida à variação na amplitude relativa da expressão no início da fase diurna, sugere que o primeiro pico de expressão de *cry2* pode ser mais influenciável por fatores ambientais. Análises da expressão de *cry2* em cabeças de fêmeas de *Ae. aegypti*, que foram mantidas em escuro constante e com ciclos de temperatura, também apresentaram variação na expressão diurna, resultando em uma mudança de fase do primeiro pico de expressão (Rivas et al., 2018).

Nos resultados de atividade locomotora/voo, os machos expostos a fêmeas confinadas também apresentaram uma menor amplitude do primeiro pico (E1) em relação ao segundo pico (E2) ao anoitecer (Figura 1.6 - Araripe et al., 2018). É

prematura a associação da diferença observada na expressão diurna de *cry2* em machos expostos a fêmeas com a mudança comportamental observada nos experimentos de atividade locomotora/voo. No entanto, Rivas e colaboradores (2018), discutem que o primeiro pico de expressão de *cry2*, que ocorre em *Ae. aegypti* e está ausente em *Culex quinquefasciatus*, pode ter uma função semelhante à expressão de *cry1* em relação ao isolamento reprodutivo de duas espécies irmãs de moscas tefritídeos (An et al., 2004; Rivas et al., 2018). No trabalho de An e colaboradores (2004), os autores analisaram a expressão de *cry1* em uma espécie de mosca de fruta com hábito de acasalamento diurno e uma espécie com hábito noturno. Como resultado, encontraram uma maior expressão diurna de *cry1* na espécie com hábito diurno, em cérebro e em antenas de machos, em comparação com a espécie com hábito noturno. Além disso, o mesmo resultado foi observado em híbridos selecionados com hábito diurno e noturno (An et al., 2004).

Em um outro trabalho, a expressão de *cry1* e *cry2* foi investigada em uma espécie de mariposa (*Spodoptera litura*) que possui maior atividade noturna (Xu et al., 2019). Os autores analisaram a expressão dos genes em amostras de cabeças de fêmeas e machos que foram coletados virgens e após a cópula. Na maioria dos casos, foi encontrado que a expressão de *cry1* e *cry2* diminuiu significativamente em machos e fêmeas 24 horas após a cópula, na escotofase. Além disso, a expressão desses genes aumentou significativamente 36 horas após a cópula, na fotofase. Tais resultados sugerem uma associação da variação na expressão gênica de *cry1* e *cry2* com a reprodução, nessa espécie. Em nossos objetivos, não incluímos a avaliação de *cry1* porque foi visto por Gentile e colaboradores (2009) que *cry1* não apresenta uma variação rítmica em relação a expressão de mRNA, em fêmeas de *Ae. aegypti*. O investimento em um estudo funcional para o gene *cry2*, com observação dos efeitos sobre a interação social ou o reconhecimento de fêmeas, poderia ajudar a elucidar se existe uma associação entre a alteração comportamental e a variação na expressão de *cry2*.

5.2 Expressão dos genes *Orco* e *fruitless*

A capacidade olfativa desempenha um importante papel no comportamento reprodutivo dos insetos. No entanto, embora o olfato seja importante para o comportamento de corte de *D. melanogaster* (revisado em Yamada & McGraw, 2010), em mosquitos acredita-se que o reconhecimento aconteça majoritariamente através da percepção dos sons de batimentos das asas, já que a atuação de feromônios voláteis durante a corte, até o presente momento, não foi elucidada nesse organismo (Gibson et al, 2010). Dessa forma, os estudos envolvendo a expressão de genes relacionados com a capacidade olfativa, em mosquitos, têm se concentrado mais em relação a outros comportamentos como por exemplo a busca por hospedeiros. No modelo proposto para mosquitos, as moléculas de odor penetram através de poros localizados nos apêndices olfativos, e as proteínas ligadoras de odor (OBPs) atuam se ligando e carregando essas moléculas até os receptores olfativos funcionais (Suh et al., 2014).

Através da técnica de microarranjo, utilizando amostras de mosquitos *Anopheles gambiae* submetidos a regime LD12:12, Rund e colaboradores (2011), identificaram variações rítmicas na expressão de alguns genes relacionados ao olfato. Dentre esses genes, foram identificados em cabeças, genes que codificam para OBPs e o gene que codifica para o co-receptor olfativo *Orco*. Em relação aos genes de OBPs que apresentaram expressão rítmica, foram observados picos de expressão três horas antes do anoitecer e no final do entardecer/início da noite. Como mosquitos dessa espécie apresentam maior atividade noturna, os autores discutiram que esses picos de expressão de OBPs podem estar relacionados a uma possível preparação do sistema olfativo para um aumento na percepção de moléculas de odor durante a noite. Em relação a *Orco*, que codifica o co-receptor necessário na formação de receptores olfativos funcionais, foi observado um perfil de expressão rítmico com o pico próximo ao final da fase clara.

Em outro estudo, o mesmo grupo (Rund et al., 2013^b) utilizando o organismo *Anopheles gambiae*, demonstraram por análise proteômica quantitativa, que as proteínas OBPs apresentam expressão rítmica, com picos de expressão geralmente no ZT 16 (LD12:12). Os autores também avaliaram a sensibilidade olfativa das antenas, ao longo de 24 horas, em resposta a odorantes que são emitidos por hospedeiros, e observaram maior sensibilidade também no ZT 16. Ao mesmo tempo,

não foi observada alteração na sensibilidade olfativa em resposta a um odorante que não necessita da atuação de OBPs para ser detectado. Além disso, também foi observado que esses picos coincidem com o intervalo de tempo de maior atividade de alimentação sanguínea (ZT 12 - ZT 16). Portanto, esses resultados sugerem a importância dos ritmos na expressão de OBPs para a sensibilidade olfativa e para os comportamentos de busca de alimentos e busca de hospedeiros (Rund et al., 2013^b).

Neste estudo, investigamos pela primeira vez a expressão de mRNA do co-receptor Orco, em resposta à presença de fêmeas. Partimos do pressuposto que se a presença de fêmeas pode estar alterando o comportamento locomotor dos machos, a percepção de fêmeas pelos machos, através das antenas, pode estar associada a alterações em níveis de expressão de genes de receptores olfativos. Além disso, como o co-receptor Orco é necessário para o funcionamento dos receptores olfativos, esperávamos que sua expressão pudesse sofrer variações rítmicas, coincidentes com o intervalo de tempo de maior atividade dos machos expostos a fêmeas.

Embora o estudo citado anteriormente tenha apresentado uma expressão rítmica do gene *Orco* em cabeças de *Anopheles gambiae*, em nossos resultados a expressão de *Orco* não apresentou ritmicidade em cabeças e antenas, em nenhuma das condições analisadas (Figura 4.10 e 4.11). No entanto, em um outro estudo de Rund e colaboradores (2013^a), usando a técnica de microarranjo para estudar a expressão de um conjunto extenso de genes, a expressão de *Orco* foi descrita como rítmica em cabeças de mosquitos *Ae. aegypti*, mas foi aceita uma significância igual a 0.06. Por fim, como estudos anteriores apontaram uma ritmicidade fraca na expressão de *Orco* (Rund et al., 2013^b), é possível que esse gene seja pouco expresso em cabeças e antenas quando esses tecidos são estudados separadamente, ou ainda que não seja regulado por nenhum fator rítmico.

Em relação ao gene *fruitless*, devido a sua importância como regulador do comportamento de corte em *D. melanogaster* e a ter tido um homólogo descrito em *Ae. aegypti*, acreditamos que seria um bom candidato para estudar a variação de expressão relacionada à presença de fêmeas. Em *D. melanogaster*, estudos utilizando linhagens mutantes para *fruitless* demonstraram sua influência em quase todas as etapas do comportamento de corte (Ryner et al., 1996; Demir & Dickson, 2005; revisado em Yamada & McGraw, 2010). A presença de FRU em alguns neurônios em machos de *D. melanogaster* também indica que essa proteína tenha uma função de

regulação via sistema nervoso central, da mesma maneira que a atuação dos principais genes do relógio circadiano. Em mosquitos, até o presente momento, ainda não foram conduzidos estudos que tenham demonstrado o efeito de FRU sobre o comportamento de corte. No entanto, em Salvemini et al. (2013), foi demonstrado que o gene homólogo de *fruitless* em *Ae. aegypti* apresenta similaridades em sua organização em comparação a *D. melanogaster*, sugerindo que sua função pode ser semelhante nessa espécie.

Neste trabalho não encontramos variação significativa na expressão de *fruitless* (Figuras 4.12 e 4.13) que pudesse ser associada à variação de pico de atividade locomotora/voo quando fêmeas estão presentes. É possível que *fruitless* tenha expressão constitutiva em *Ae. aegypti* e não tenha interação regulatória com genes rítmicos do relógio circadiano. Ou ainda é possível que a presença de fêmeas nos tubos de confinamento ao longo de vários dias, tenha anulado um possível efeito resposta de *fruitless* sobre o reconhecimento de fêmeas. Por último, *fruitless* pode não estar envolvido na via de regulação que leva a uma alteração no comportamento dos machos em reconhecimento à presença de fêmeas. Um estudo funcional envolvendo *fruitless* e as etapas de corte poderia ajudar a elucidar o papel desse gene no comportamento de corte em mosquitos.

6 CONCLUSÕES

Nesse estudo, foram analisados pela primeira vez os perfis de expressão, em diferentes tecidos de machos de *Ae. aegypti*, de alguns dos principais genes do relógio circadiano (*period*, *cycle* e *cryptochrome 2*), do co-receptor olfativo *Orco* e do gene *fruitless*, em diferentes condições envolvendo a presença de fêmeas. As principais conclusões desse estudo são destacadas abaixo.

- Os genes *period*, *cycle* e *cryptochrome 2*, apresentaram perfis de expressão que sugerem ritmicidade, em regime LD12:12 nas amostras de cabeças, antenas e pontas de abdômen de machos de *Ae. aegypti*.
- A expressão do gene *period* apresentou um perfil conservado entre todos os tecidos e condições, com um pico de expressão em torno do ZT 17 e um vale no ZT 5.
- Os perfis de expressão do gene *cycle* mostram que o vale é muito mais bem definido entre condições (ZT 13) do que o pico, que varia entre os ZTs 1 e 5. Os resultados indicam que a percepção da presença de fêmeas não altera a expressão de *cycle* nos tecidos dos machos.
- O gene *cryptochrome 2* apresentou diferenças entre as condições machos sozinhos e machos com fêmeas. Em todos os tecidos a diferença entre a amplitude da expressão de *cry2* no início da fase clara e o pico na fase escura foi maior em machos com fêmeas do que em machos sozinhos, indicando que a interação social implica em um efeito sobre a expressão desse gene. A ablação de antenas não modificou a expressão de *cry2* em nenhum dos tecidos, e a percepção de fêmeas pelos machos sem antenas deve ocorrer por outros sentidos que não a audição e o olfato, como por exemplo a visão e o tato.
- Não foi observada ritmicidade na expressão dos genes *Orco* e *fruitless*, na maioria das condições analisadas. Além disso, não foi observado nenhum efeito da interação social sobre os perfis de expressão desses genes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aldersley A, Cator L. (2019) Female resistance and harmonic convergence influence male mating success in *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*, 9:2145.

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

Amoretty PR, Padilha KP, Freitas RT, Bruno RV. (2013) Uso de *Drosophila melanogaster* como modelo para o estudo do relógio circadiano em insetos vetores. *Acta Scientiae et Technicae*, v. 1, p. 1.

Araripe LO, Bezerra JRA, Rivas GBS and Bruno RV. (2018) Locomotor activity in males of *Aedes aegypti* can shift in response to females' presence. *Parasites & Vectors*, 11:254.

Bargiello TA, Young MW. (1984) Molecular genetics of a biological clock in *Drosophila*. *PNAS*, 81:2142-2146.

Beaver LM and Giebultowicz JM. (2004) Regulation of Copulation Duration by period and timeless in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*, V. 14, 1492–1497.

Beaver LM, Gvakharia BO, Vollintine TS, Hege DM, Stanewsky R and Giebultowicz JM. (2002) Loss of circadian clock function decreases reproductive fitness in males of *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, 99:2134-2139.

Benelli G. (2015) Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. *Parasitol. Res.* 114:2801–5.

Benito J, Zheng H, and Hardin PE. (2007) PDP1epsilon functions downstream of the circadian oscillator to mediate behavioral rhythms. *Journal of Neuroscience*, 27, 2539-2547.

Bohbot JD, Pitts RJ (2015) The narrowing olfactory landscape of insect odorant receptors. *Front. Ecol. Evol.* 3:39.

Bruno RV, Lima-Camara TN, Peixoto AA. (2012) Ritmos biológicos em insetos vetores e seu controle molecular. INCT-EM.

Cator LJ, Arthur BJ, Harrington LC, Hoy RR. (2009) Harmonic convergence in the love songs of the dengue vector mosquito. *Science* 323, 1077–1079.

Chahad-Ehlers S, Gentile C, Lima JBP, Peixoto AA, Bruno RV. (2013) Analysis of *cycle* Gene Expression in *Aedes aegypti* Brains by In Situ Hybridization. *PLoS ONE* 8(1): e52559.

Chang DC, McWatters HG, Williams JA, Gotter AL, Levine JD, et al. (2003) Constructing a feedback loop with circadian clock molecules from the silkworm, *Antheraea pernyi*. *J Biol Chem* 278: 38149–38158.

Clements AN. (1999) The regulation of adult behaviour. *The biology of mosquitoes*. CABI publishing 2: 239–286.

Consoli RAGB, Oliveira RL. (1994) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 228 p.

Craig GB. (1967) Mosquitoes: Female monogamy induced by male accessory gland substance. *Science*, 156: 1499–1500.

Cyran SA, Buchsbaum AM, Reddy KL, Lin MC, Glossop NR, Hardin, et al. (2003) *vriille*, *Pdp1*, and *dClock* form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*. 112, 329–341.

Degner EC, Harrington LC. (2016) Polyandry Depends on Postmating Time Interval in the Dengue Vector *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94(4), p. 780–785.

Demir E, Dickson BJ. (2005) fruitless splicing specifies male courtship behavior in *Drosophila*. *Cell* 121: 785–794.

Diabaté A, Tripet F. (2015) Targeting male mosquito mating behaviour for malaria control. *Parasit. Vectors*, 8:347.

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

Ferguson HM, John B, Ng'habi K, Knols BGJ. (2005) Redressing the sex imbalance in knowledge of vector biology. *Trends Ecol. Evol.* V. 20, p. 202-209.

Gentile C, Rivas GBS, Meireles-Filho ACA, Lima JBP, Peixoto AA. (2009) Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: *cry2* is different. *J Biol Rhythm*. 24:444–51.

Gentile C, Lima JBP, Peixoto AA. (2005) Isolation of a fragment homologous to the *rp49* constitutive gene of *Drosophila* in the Neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. V. 1000 (6):545-7

Gibson G, Warren B, and Russell IJ. (2010) Humming in Tune: Sex and Species Recognition by Mosquitoes on the Wing. *JARO*; 11: 527–540.

Giebultowicz JM. (2001) Peripheral clocks and their role in circadian timing: insights from insects. *Philos Trans R Soc Lond B*; 356 (1415) :1791-9.

Giebultowicz JM, Hege DM. (1997) Circadian clock in Malpighian tubules. *Nature*, 386:664.

Glossop NRJ, Hardin PE. (2002) Central and peripheral circadian oscillator mechanisms in flies and mammals. *Journal of Cell Science*, 115, 3369-3377.

Glossop NR, Houl JH, Zheng H, Ng FS, Dudek SM and Hardin PE. (2003) VRILLE feeds back to control circadian transcription of *Clock* in the *Drosophila* circadian oscillator. *Neuron*. 37, 249–261.

Göpfert MC, Briegel H, Robert D. (1999) Mosquito hearing: sound-induced antennal vibrations in male and female *Aedes aegypti*. J Exp Biol. 202:2727–2738.

Göpfert MC, Robert D. (2000) Nanometre-range acoustic sensitivity in male and female mosquitoes. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 267:453–457.

Guidobaldi F, May-Concha IJ, Guerenstein PG. (2014) Morphology and physiology of the olfactory system of blood-feeding insects. J Physiol Paris. 108(2-3):96-111

Hardin PE (2011) Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. Adv Genet. 74, 141-73

Helfrich-Förster C. (1998) Robust circadian rhythmicity of *Drosophila melanogaster* requires the presence of lateral neurons: a brain-behavioral study of disconnected mutants. J. Comp. Physiol. A. 182: 435 – 453.

Johnson CH, Elliott JA, Foster R. (2003) Entrainment of circadian programs. Chronobiol Int. 20,741-774.

Kadener S, Stoleru D, McDonald M, Nawathean P and Rosbash, M (2007) Clockwork Orange is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. Genes Dev. 21, 1675–1686.

Kloss B, Rothenfluh A, Young MW and Saez L. (2001) Phosphorylation of period is influenced by cycling physical associations of double-time, period, and timeless in the *Drosophila* clock. Neuron. 30,699-706.

Klowden MJ. (1999) The check is in the male: male mosquitoes affect female physiology and behavior. J. Am. Mosq. Control Assoc. V.15, p. 213-220.

Konopka RJ and Benzer S. (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. PNAS, 68: 2112-2116.

Krishnan B, Dryer SE and Hardin PE. (1999) Circadian rhythms in olfactory response of *Drosophila melanogaster*. Nature, 400:375-378.

Kyriacou CP and Hall JC. (1980) Circadian rhythm mutations in *Drosophila melanogaster* affect short-term fluctuations in the male's courtship song. PNAS, V. 77, No. 11, pp. 6729-6733.

Kyriacou CP, van den Berg MJ and Hall JC. (1990) *Drosophila* courtship song cycles in normal and period mutant males revisited. Behav. Genet. 20, 617-644.

Lim C, Chung BY, Pitman, JL, McGill JJ, Pradhan S, Lee J, et al., (2007) Clockwork orange encodes a transcriptional repressor important for circadian clock amplitude in *Drosophila*. Curr. Biol. 17, 1082–1089

Livak KJ and Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25 (4), 402-8

Marques N e Menna-barreto L. (2003) Cronobiologia: princípios e aplicações. São Paulo: EDUSP-Fiocruz; p. 45-84.

Matsumoto A, Ukai-Tadenuma M, Yamada RG, Houl J, Uno KD, Kasukawa T. et al. (2007) A functional genomics strategy reveals *clockwork orange* as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. Genes Dev. 21, 1687–1700.

Meireles-Filho AC, Amoretty PR, Souza NA, Kyriacou CP, Peixoto AA. (2006) Rhythmic expression of the *cycle* gene in a hematophagous insect vector. BMC Mol Biol 27: 7–38.

Moore-Ede MC, Sulzman FM and Fuller CA. (1982) The clocks that time us: physiology of the circadian timing system. Harvard University Press, Cambridge, England.

Pennetier C, Warren B, Dabiré KR, Russell IJ & Gibson G. (2010) 'Singing on the Wing' as a Mechanism for Species Recognition in the Malarial Mosquito *Anopheles gambiae*. Curr. Biol. 20, 131–136.

Pittendrigh, CS. (1954) On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. PNAS, 40:1018-1029.

Pittendrigh CS. (1993) Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. Annual review of physiology. 55,16-54.

Pitts RJ, Liu C, Zhou X, Malpartida JC and Zwiebel LJ. (2014) Odorant receptor-mediated sperm activation in disease vector mosquitoes. PNAS. 111: 2566-2571.

Plautz JD, Kaneko M, Hall JC, Kay SA. (1997). Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. Science, 278, 1632-1635.

Price JL, Blau J, Rothenfluh A, Abodeely M, Kloss B and Young MW. (1998) *doubletime* is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. Cell. 94, 83-95.

Reddy P, Zehring WA, Wheeler DA, Pirrotta V, Hadfield C, Hall JC and Rosbash M. (1984) Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. Cell. 38 (3): 701-10.

Rivas GBS, Bauzer LGS, Meireles-Filho AC. (2016) “The environment is everything that isn’t me”: molecular mechanisms and evolutionary dynamics of insect clocks in variable surroundings. Front Physiol 6:400.

Rivas GBS, Teles-de-Freitas R, Pavan MG, Lima JBP, Peixoto AA, Bruno RV. (2018) Effects of Light and Temperature on Daily Activity and Clock Gene Expression in Two Mosquito Disease Vectors. Journal of Biological Rhythms, V. 33 No. 3, 272–288.

Roth L. (1948) A study of mosquito behavior. Am Midl Nat. 40:265–352.

Rubin R, Shemesh Y, Cohen M, Elgavish S, Robertson HM and Bloch G. (2006) Molecular and phylogenetic analyses reveal mammalian-like clockwork in the honey bee (*Apis mellifera*) and shed new light on the molecular evolution of the circadian clock. Genome Res. 16: 1352–1365.

Rund SSC, Bonar NA, Champion MM, Ghazi JP, Houk CM, Leming MT, et al. (2013^b) Daily rhythms in antennal protein and olfactory sensitivity in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Scientific Reports*. 3:2494.

Rund SSC, Gentile JE, Duffield, GE. (2013^a) Extensive circadian and light regulation of the transcriptome in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*. 14, 218.

Rund SSC, Hou TY, Ward SM, Collins FH and Duffield GE. (2011) Genome-wide profiling of diel and circadian gene expression in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *PNAS*, 108: E421–E430.

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

Ryner LC, Goodwin SF, Castrillon DH, Anand A, Vilella A, et al. (1996) Control of male sexual behavior and sexual orientation in *Drosophila* by the fruitless gene. *Cell*. 87: 1079–1089.

Sakai T and Ishida N. (2001) Circadian rhythms of female mating activity governed by clock genes in *Drosophila*. *PNAS*, 98(16): 9221-5.

Sakai T and Kitamoto T. (2006) Clock, love and memory: Circadian and non-circadian regulation of *Drosophila* mating behavior by clock genes. *Sleep and Biological Rhythms*, 4: 255–262.

Salvemini M, D'Amato R, Petrella V, Aceto S, Nimmo D, et al. (2013) The Orthologue of the Fruitfly Sex Behaviour Gene Fruitless in the Mosquito *Aedes aegypti*: Evolution of Genomic Organisation and Alternative Splicing. *PLoS ONE*. 8(2): e48554.

Saunders DS. (2002) *Insect Clocks*. 3rd edition. Elsevier.

Stanewsky, R. (2003) Genetic analysis of the circadian system in *Drosophila melanogaster* and mammals. *J Neurobiol*. 54, 111-147.

Suh E, Bohbot J and Zwiebel LJ. (2014) Peripheral olfactory signaling in insects. *Curr Opin Insect Sci.* 1; 6: 86–92.

Teles de Freitas R. (2015) A influência dos ciclos de temperatura na sincronização do relógio circadiano e amplitude de atividade do mosquito *Aedes aegypti*. Rio de Janeiro; Mestrado [Biologia Celular e Molecular] – Instituto Oswaldo Cruz.

Ito C, Tomioka K. (2016) Heterogeneity of the Peripheral Circadian Systems in *Drosophila melanogaster*: A Review. *Front. Physiol.* 7:8.

Vaníčková L, Canale A, Benelli G. (2016) Sexual chemoecology of mosquitoes (Diptera, Culicidae): Current knowledge and implications for vector control programs. *Parasitol. Int.* V. 66, p. 190–195.

Warren B, Gibson G & Russell IJ. (2009) Sex Recognition through Midflight Mating Duets in *Culex* Mosquitoes Is Mediated by Acoustic Distortion. *Curr. Biol.* 19, 485–491.

Xu J, Gao B, Shi MR, Yu H, Huang LY, Chen P and Li YH. (2019) Copulation Exerts Significant Effects on mRNA Expression of Cryptochrome Genes in a Moth. *Journal of Insect Science*, 19(2): 3; 1–8.

Yamada R, McGraw EA. (2010) *Drosophila* Behavior Genetics. University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia. *Encyclopedia of Animal Behavior.* 573-580.

Yu W, Zheng H, Hou JH, Dauwalder B, Hardin PE. (2006) PER dependent rhythms in CLK phosphorylation and E-box binding regulate circadian transcription. *Genes Dev.* 20, 723–733.

Yuan Q, Metterville D, Briscoe AD, Reppert SM. (2007) Insect Cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *Molecular Biology and Evolution*, 24 (4), 948–955.

Zehring WA, Wheeler DA, Reddy P, Konopka CP, Rosbash M, Hall JC. (1984) P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell*. V. 39, 369-376.

Zheng X, Koh K, Sowcik M, Smith CJ, Chen D, Wu MN, Sehgal A. (2009) An isoform-specific mutant reveals a role of PDP1 epsilon in the circadian oscillator. *J. Neurosci*. 29, 10920–10927.

Zhu H, Yuan Q, Briscoe AD, Froy O, Casselman A, and Reppert SM (2005) The two CRYs of the butterfly. *Curr. Biol*. 15: R953-R954.