

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

*GUSTAVO BUENO DA SILVA RIVAS*

**Análise comparativa dos ritmos de atividade locomotora e expressão circadiana de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus***

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

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

**RIO DE JANEIRO**

2010

**Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ**

R618

Rivas, Gustavo Bueno da Silva

Análise comparativa dos ritmos de atividade locomotora e expressão circadiana de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* / Gustavo Bueno da Silva Rivas. – Rio de Janeiro, 2010.

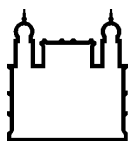
78 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2010.

Bibliografia: f. 71-78

1. Relógio circadiano. 2. Atividade locomotora. 3. Expressão gênica.  
4. *Aedes aegypti*. 5. *Culex quinquefasciatus*. 6. Ciclos de temperatura. I.  
Título

CDD 616.921



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**AUTOR:** Gustavo Bueno da Silva Rivas

Análise comparativa dos ritmos de atividade locomotora e expressão circadiana de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

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

**Aprovada em:** 20/05/2010

#### **EXAMINADORES:**

**Prof<sup>ª</sup>. Dra.** Patrícia Azambuja - **Presidente**

**Prof<sup>ª</sup>. Dra.** Gabriela de Oliveira Paiva e Silva

**Prof. Dr.** Mario Pedrazzoli Neto

**Prof<sup>ª</sup>. Dra.** Constança Felicia De Paoli de Carvalho Britto

**Prof. Dr.** Paulo Redner

Rio de Janeiro, 20 de Maio de 2010

Trabalho realizado no  
Laboratório de Biologia  
Molecular de Insetos/ Instituto  
Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, sob  
a orientação do Dr. Alexandre  
Afranio Peixoto.



**Para meus pais e meus irmãos  
e especialmente  
para Elaine  
e Lucas.**

**Não há problema que não possa ser solucionado pela paciência.**  
(Chico Xavier).

# Índice

I- Agradecimentos.....	viii
II- Lista de abreviaturas .....	ix
III- Resumo .....	xi
IV- Abstract.....	xii
1 – Introdução.....	1
1.1 – O relógio circadiano.....	1
1.2 – O controle molecular dos ritmos circadianos .....	2
1.2.1 – A alça regulatória de <i>per</i> e <i>tim</i> .....	3
1.2.2 – Mecanismos pós-traducionais.....	4
1.2.3 – <i>Clk</i> e a segunda alça regulatória.....	5
1.3 – O efeito da luz no relógio.....	6
1.4 – O efeito dos ciclos de temperatura no relógio circadiano.....	7
1.4.1 – Os efeitos da temperatura no marcapasso molecular .....	9
1.4.2 – Termo-receptores do relógio.....	10
1.5 – Relógio circadiano em outros insetos .....	10
1.6 – <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	12
2 – Objetivos.....	15
3 – Material e Métodos .....	16
3.1 – Criação de mosquitos.....	16
3.2 – Análise da atividade locomotora.....	16
3.2.1 – Preparo e descrição dos regimes utilizados.....	16
3.2.2 – Análise de dados de atividade e formas de elaboração de gráficos.....	17
3.3 – Análise da expressão circadiana por PCR em Tempo Real.....	20
3.3.1 – Coleta de pontos para análise da expressão gênica .....	20
3.3.2 – Extração de RNA total.....	21
3.3.3 – Purificação com Cloreto de Lítio .....	21
3.3.4 – Síntese de cDNA .....	22
3.3.5 – Obtenção <i>in silico</i> das seqüências dos genes de relógio .....	22

3.3.6 – Escolha dos oligonucleotídeos.....	23
3.3.7 – Reação de PCR em Tempo Real.....	23
3.3.8 – Método de cálculo da quantificação relativa.....	25
4 – Resultados.....	29
4.1 Capítulo 1: Análise da atividade locomotora e da expressão dos genes do relógio circadiana de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> em ciclos de claro escuro e escuro constante. ....	30
4.1.1. Artigo: Gentile C, <b>Rivas GB</b> , Meireles-Filho AC, Lima JB, Peixoto AA (2009) <i>Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: cry2 is different. Journal of Biological Rhythms. 24:444-51.</i> ....	30
4.2. Capítulo 2: Análise da atividade locomotora de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> em ciclos de temperatura.....	39
4.2.1 – Atividade em ciclos de claro-escuro com ou sem ciclos de temperatura.....	39
4.2.2 – Atividade em escuro constante com ciclos de temperatura.....	41
4.2.3 – Atividade em claro constante com e sem ciclos de temperatura.....	41
4.2.4 – Atividade em regimes de claro-escuro “invertidos” em relação aos ciclos de temperatura.....	46
4.3. Capítulo 3: Análise comparativa da expressão circadiana dos genes do relógio de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> em ciclos de temperatura. ....	49
4.3.1 – Análise da expressão em claro constante com ciclos de temperatura.....	49
4.3.2 – Análise da expressão em escuro constante com ciclos de temperatura.....	51
4.4. Capítulo 4: Análise complementar da expressão circadiana em <i>Aedes aegypti</i> .....	52
4.4.1 – Análise da expressão circadiana de <i>Ae. aegypti</i> em condições constantes. ....	52
4.4.2 – Expressão circadiana de <i>Ae. aegypti</i> em escuro constante com ciclos de temperatura, criados em um regime de claro-escuro com ciclos de temperatura.....	54
5 – Discussão .....	56
6 – Conclusões.....	65
7 – Anexo .....	67
8 – Referências Bibliográficas.....	71

## I- Agradecimentos

Agradeço a Deus e à minha família por todo o suporte em todos os momentos de minha vida até hoje. A meu pai e minha mãe por me educarem e por seu amor incondicional. A meus irmãos por todo o companheirismo, grande amizade e por me acompanharem sempre em meus caminhos e minhas escolhas. Agradeço aos amigos do Laboratório, não somente pelos auxílios e dicas de trabalho, mas também pelos momentos de companheirismo e descontração ao longo de todo este tempo.

Agradeço a participação dos membros da banca, Dra. Patrícia Azambuja, Dra. Gabriela de Oliveira Paiva e Silva, Dr. Mario Pedrazzoli, Dra. Constança Felicia De Paoli de Carvalho Britto e Dr. Paulo Redner pelo tempo dispensado, em especial a Dra. Gabriela por também ter auxiliado na revisão da Tese. As sugestões e análises críticas de todos serão indispensáveis para o desenvolvimento final de meu trabalho.

Agradeço também ao meu Orientador, não somente por todo seu auxílio durante o desenvolvimento desta Tese, mas pela grande oportunidade de ter feito parte do seu Grupo durante estes mais de seis anos, período que foi fundamental para o meu amadurecimento profissional e pessoal. Espero, em troca, ter contribuído de alguma maneira com o meu trabalho e com minha dedicação.

Não poderia deixar de fazer um agradecimento especial à Elaine, por todo o carinho, compreensão, amor e companheirismo. Obrigado pela paciência, em relação ao meu trabalho, principalmente durante os meus experimentos de coleta que passava noites em claro no laboratório. Dedico não só esta Tese, mas minha vida toda a você. Obrigado também pelo presente maior de todos, que é nosso filho. Este pequeno milagre, gerador de alegria infinita. Como te disse antes, o nascimento é uma dádiva, a Paternidade é uma missão, e tudo isto faz crescer dentro de nós um sentimento imensurável e único. E é por estes e outros momentos que ainda virão que valorizo cada vez mais passar o resto de minha vida ao seu lado. Obrigado por tudo. Te amo. For life.

## II- Lista de abreviaturas

$\mu$ l- microlitro.

$\mu$ M- micromolar.

cDNA- DNA complementar.

*Clk*- gene *Clock*.

CLK ou CLOCK -proteína codificada por *Clock*.

CLK/CYC- heterodímero formado por CLOCK e CYCLE.

*cry*- gene *cryptochrome*.

CRY ou CRYPTOCHROME- proteína codificada por *cryptochrome*.

*cry2*- gene *cryptochrome2*.

CRY2 ou CRYPTOCHROME2- proteína codificada por *cryptochrome2*.

CT- *Circadian time* (tempo medido em horas de um período sem variações ambientais).

$C_T$ - *threshold cycle*. Em uma reação de PCR em Tempo Real, o número de ciclos de amplificação até alcançar um limiar de fluorescência é definido como  $C_T$ .

*cyc*- gene *cycle*.

CYC ou CYCLE- proteína codificada por *cycle*.

DD- do inglês *Dark-Dark*. Regime artificial de escuro constante em temperatura constante.

DDTC- do inglês *Dark-Dark/Thermo-Cold*. Regime artificial de escuro constante com ciclos de temperatura.

DLTC- do inglês *Dark-Light/Thermo-Cold*. Regime artificial de ciclos de claro-escuro invertidos em relação à fase do ciclo de temperatura. Ou seja, a fase clara (fotofase) coincide com a fase fria (criofase), enquanto que a fase escura (escotofase) coincide com a fase quente (termofase).

DNA- ácido desoxirribonucléico.

g.l.- graus de liberdade.

LD- do inglês *Light/Dark*. Regime artificial de ciclos de claro-escuro.

LDTG- do inglês *Light-Dark/ Thermo-Cold*. Regime artificial de ciclos de claro-escuro e de temperatura.

LL- do inglês *Light-Light*. Regime artificial de claro constante em temperatura constante.

LLTG- do inglês *Light-Light/Thermo-Cold*. Regime artificial de claro constante com ciclos de temperatura.

mM- milimolar.

mRNA- RNA mensageiro.

ng- nanograma.

P- é a probabilidade de um determinado valor estatístico ter ocorrido ao acaso.

PCR- do inglês quantitative polymerase chain reaction. Reação em cadeia da polimerase.

*Pdp1*- gene *Pdp1* (*PAR Domain protein 1*).

PDP1- proteína codificada por *Pdp1*.

*per*- gene *period*.

PER ou PERIOD- proteína codificada por *period*.

PER/TIM- heterodímero formado por PERIOD e TIMELESS.

qPCR- do inglês quantitative polymerase chain reaction. PCR quantitativa.

RNA- ácido ribonucléico.

RT-PCR- do inglês reverse transcription-polymerase chain reaction. PCR por uma polimerase de transcrição reversa.

*t*- valor estatístico do teste *t* de student.

*tim*- gene *timeless*.

TIM ou TIMELESS- proteína codificada por *timeless*.

*vri*- gene *vrille*.

VRI ou VRILLE- proteína codificada por *vrille*.

ZT- *zeitgeber time*: horário do ciclo ambiental medido em horas.

### III- Resumo

A grande maioria dos seres vivos complexos apresenta um relógio endógeno, conhecido como relógio circadiano, responsável por dirigir as oscilações rítmicas de fisiologia e comportamento dentro de um período de aproximadamente 24 horas. Em insetos, as bases genéticas deste marcapasso têm sido elucidadas em *Drosophila melanogaster*. Diversos loci já foram identificados e o mecanismo molecular regulando o relógio circadiano consiste de alças regulatórias interligadas que controlam a expressão rítmica de muitos genes.

Muitas espécies de mosquitos são vetores de doenças. Elas exibem uma variedade de padrões de atividade e hematofagia, de diurnos a crepusculares e noturnos e estes ritmos são importantes para a dinâmica da transmissão de doenças. Entretanto, apesar da sua importância epidemiológica, pouco se sabe quanto à genética molecular do relógio circadiano que controla seus ritmos de atividade.

Nosso grupo tem estudado as bases moleculares do relógio circadiano em duas espécies de mosquitos, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. Ambos são importantes vetores de doenças tropicais, mas com diferentes padrões de atividade. *Ae. aegypti* é o vetor diurno da Dengue e da Febre amarela, enquanto *Cx. quinquefasciatus* é o vetor noturno da Filariose e da Febre do Oeste do Nilo. Análises preliminares indicaram uma conservação dos padrões de expressão entre as duas espécies em alguns dos mais importantes genes do relógio em claro-escuro e escuro constante. Entretanto, nós achamos diferenças na expressão do gene *cryptochrome2* (*cry2*), um ortólogo dos genes codificando criptocromos de mamíferos e que foi encontrado em muitos insetos, mas que não está presente em *Drosophila*. Nós sugerimos que *cry2* pode estar envolvido no controle dos padrões de atividade de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, e propusemos um modelo para explicar as diferenças na expressão de *cry2*.

Nós também estudamos a expressão circadiana dos principais genes de relógio, além dos ritmos de atividade locomotora destas duas espécies em ciclos de temperatura. Observamos que ambas são arrastadas pela temperatura e mostram diferenças em seus comportamentos de atividade. Em ciclos de temperatura, a atividade locomotora de *Ae. aegypti* é mais restrita a termofase, enquanto *Cx. quinquefasciatus* apresenta sua atividade mais restrita a criofase. Além disso, após o arrastamento em ciclos de claro-escuro, *Ae. aegypti* mostrou um padrão transiente de atividade por alguns dias em escuro constante com ciclos de temperatura, enquanto *Cx. quinquefasciatus* permaneceu estável nesta condição. Também foram observadas, em ciclos de temperatura, algumas diferenças espécies-específicas nos padrões de expressão de *cycle* e *cry2*.

Finalmente, nós observamos diferenças na fase da expressão circadiana de *Ae. aegypti* em ciclos de temperatura e escuro constante entre mosquitos criados com uma combinação de ciclos de claro-escuro e de temperatura com mosquitos criados em ciclos de claro-escuro com temperatura constante. Isto sugere um importante papel do desenvolvimento na determinação dos padrões de expressão circadiana de insetos adultos submetidos a oscilações de temperatura.



## IV- Abstract

The great majority of complex living organisms present an endogenous timekeeper, known as the circadian clock, responsible for driving rhythmic oscillations in their physiology and behaviour within a period of approximately 24 hours. In insects, the genetic bases of this pacemaker have been elucidated in *Drosophila melanogaster*. A number of loci have already been identified and the molecular mechanism regulating the circadian clock consists of interlocked feedback loops that control the rhythmic expression of many genes.

Many species of mosquitoes are disease vectors. They show a range of activity and blood-feeding patterns, from diurnal to crepuscular and nocturnal, and these rhythms are essential for the dynamics of disease transmission. However, despite their epidemiologic importance, little is known about the molecular genetics of the circadian clock controlling their activity rhythms.

Our group has been studying the molecular bases of the circadian clock in two mosquito species, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Both are important vectors of tropical diseases but with different activity patterns. *Ae. aegypti* is a diurnal vector of Dengue and Yellow fever, while *Cx. quinquefasciatus* is a nocturnal vector of Filariasis and West-Nile fever. Previous analysis has indicated conserved expression patterns between the two species in some of the most important clock genes in light-dark and constant dark. However, we found differences in the expression in the mammalian-like *cryptochrome2* (*cry2*), a gene found in many insects but missing in *Drosophila*. We suggest that *cry2* might be involved in the control of the activity patterns in *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*, and we proposed a model to explain the differences in *cry2* expression.

We also studied the circadian expression of the main clock genes and locomotor activity rhythms of these two species under temperature cycles. We observed that both are entrained by temperature and showed some differences in their activity behaviour. Under temperature cycles, the locomotor activity of *Ae. aegypti* is more restricted to the thermophase while *Cx. quinquefasciatus* has your activity more restricted to the cryophase. Moreover, after entrainment in light-dark cycles, *Ae. aegypti* shown a transient activity pattern for a few days in constant dark with temperature cycles, while *Cx. quinquefasciatus* remains stable in this condition. We also observed under temperature cycles some species-specific differences in *cycle* and *cry2* expression patterns.

Finally, we observed differences in the phase of *Ae. aegypti* circadian expression in temperature cycles and constant dark between mosquitoes raised under combined light-dark and temperature cycles to those raised in light-dark cycles with constant temperature. This suggests an important role of development in determining the patterns of circadian expression of adult insects under temperature oscillations.

# 1 – Introdução

## 1.1 – O relógio circadiano

Desde que as primeiras formas de vida surgiram no planeta, estas têm sido submetidas a ciclos diários de luz e temperatura, causados pelas rotações da Terra ao redor de seu próprio eixo. Os mais diversos organismos desenvolveram estratégias que permitiram sua adaptação a essas variações do ambiente, passando a apresentar oscilações diárias em sua fisiologia e comportamento. Estes ritmos, chamados de circadianos (*circa*=cerca; *diem*=dia) por apresentarem um período de cerca de 24 horas em condições constantes (ver abaixo), têm sido estudados há muito tempo e desde cedo houve o questionamento se estes eram apenas dirigidos pelo ambiente ou o resultado de algum mecanismo interno.

Jean Jacques d'Ortous de Mairan, um astrônomo francês, em 1729, descreveu os movimentos periódicos das folhas de *Heliótopos* (provavelmente *Mimosa pudica*) que retraíam suas folhas durante a noite e as estendiam durante o dia. Para verificar a importância dos sinais luminosos neste processo, de Mairan colocou as plantas em um compartimento completamente isolado dos regimes de claro/escuro e pôde observar que a planta continuou a movimentar suas folhas na fase esperada, que corresponderia à fase clara. Este experimento pioneiro representa a primeira observação formal da existência de um relógio circadiano endógeno, que persistia mesmo na ausência de flutuações ambientais e veio a se confirmar posteriormente com o estudo de outros organismos (Moore-Ede *et al.*, 1982).

Apresentar uma ritmicidade que persiste em livre curso na ausência de sinais ambientais externos é a primeira das três principais propriedades do relógio circadiano. Este ritmo auto-sustentado possui uma periodicidade que é próxima, porém raramente igual à 24 horas. No entanto, o relógio tem a capacidade de entrar em sincronia com as oscilações do ambiente (variações de luz e temperatura, por exemplo). Esta capacidade é denominada de “arrastamento” do relógio, e caracteriza-se como a segunda propriedade do relógio circadiano (revisado em Moore-Ede *et al.*, 1982).

No estudo dos ritmos circadianos, destaca-se a contribuição de Colin Pittendrigh, que realizou uma série de trabalhos seminais, entre as décadas de 50 e

60, utilizando *Drosophila pseudoobscura* (e.g. Pittendrigh, 1960). Em um destes trabalhos, Pittendrigh observou que o período de eclosão de *Drosophila pseudoobscura*, que em condições normais ocorre ao amanhecer, não foi alterado em escuro constante mesmo quando a temperatura do ambiente era diminuída em 10°C (Pittendrigh, 1954). Desta forma, foi demonstrada a terceira propriedade do relógio circadiano, que é apresentar uma compensação térmica, ou seja, ser capaz de manter aproximadamente o mesmo período em diferentes temperaturas.

## 1.2 – O controle molecular dos ritmos circadianos

Em 1971, Ron Konopka e Seymour Benzer demonstraram pela primeira vez que o ciclo circadiano poderia ser regulado ou afetado pela ação de um único gene. Três mutações geradas através de mutagênese química e que afetavam os ritmos de eclosão e de atividade locomotora de *Drosophila melanogaster* foram mapeadas no mesmo *locus* chamado de *period* (*per*). Em um regime de escuro constante, o mutante *per<sup>Short</sup>* (*per<sup>S</sup>*) apresenta um período menor que o selvagem (~24h), com duração de 19h, enquanto *per<sup>Long</sup>* (*per<sup>L</sup>*) apresenta um período de cerca de 29h. Já *per<sup>01</sup>* é essencialmente arritmico (Figura 1.1) (Konopka & Benzer, 1971).

Posteriormente este gene foi clonado e seqüenciado (Bargiello *et al.*, 1984; Reddy *et al.*, 1984; Zehring *et al.*, 1984; Jackson *et al.*, 1986; Citri *et al.*, 1987). Contudo, a função molecular da proteína permaneceu obscura por alguns anos até que finalmente, com o acúmulo de seqüências nos bancos de dados, ficou caracterizado que PERIOD apresenta um domínio de dimerização, denominado PAS (*per-arnt-sim*), encontrado em fatores de transcrição (Huang *et al.*, 1993). Observou-se também que tanto a proteína quanto seu transcrito ciclaram com um período de ~24h, entretanto com uma diferença temporal de aproximadamente 6h entre seus picos de abundância (Hardin *et al.*, 1990). Isto sugeria que *per*, de alguma forma, estaria regulando negativamente sua própria transcrição.

Até o início da década de 90, *per* era o único gene de relógio conhecido em *Drosophila*. Em 1994, entretanto, o gene *timeless* (*tim*) foi descoberto através do isolamento de uma mutação que produzia drosófilas arritmicas, assim como anteriormente visto em *per<sup>01</sup>* (Sehgal *et al.*, 1994). Em 1995, Myers e colaboradores observaram que a proteína codificada por este gene poderia formar um heterodímero com PER (Myers *et al.*, 1995). Além disso, foi postulado que este

complexo protéico poderia ser capaz de se translocar para dentro do núcleo (Gekakis *et al.*, 1995).

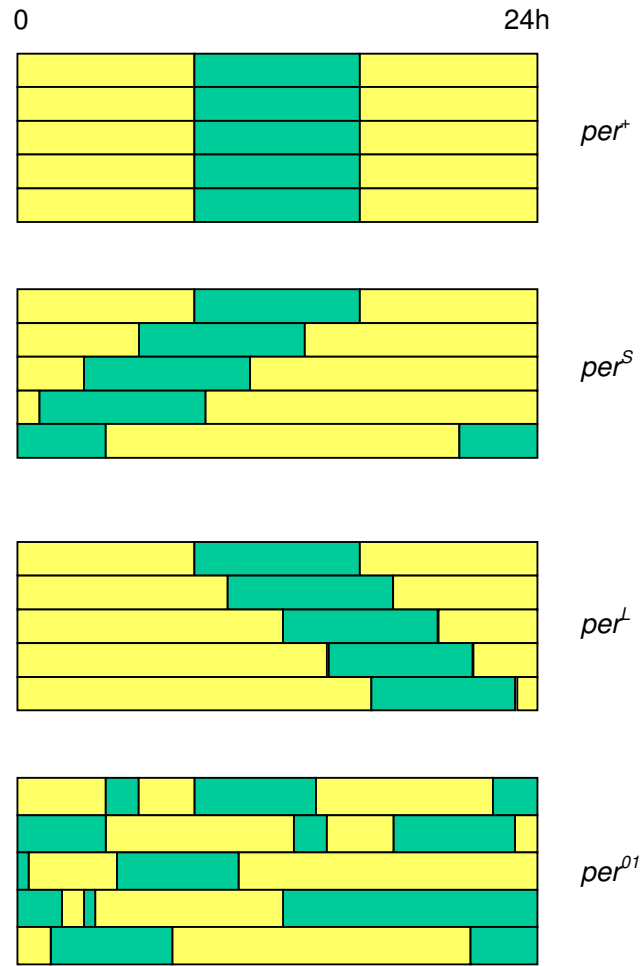


Figura 1.1: Esquema com o padrão de atividade locomotora em escuro constante de mutantes do gene *period* de *Drosophila melanogaster*. *per<sup>+</sup>*, moscas com o alelo selvagem de *period*, que apresentam ritmo de atividade com um período de cerca de 24h; moscas com o alelo mutante *per<sup>S</sup>* apresentam um ritmo com período de 19h; moscas com o alelo *per<sup>L</sup>* apresentam um ritmo de 29h e moscas *per<sup>01</sup>*, são arrítmicas. As barras horizontais representam períodos de 24h em dias consecutivos. As áreas em amarelo representam quando as moscas estão em repouso e em verde quando estão em atividade.

### 1.2.1 – A alça regulatória de *per* e *tim*

Além de *per* e *tim*, diversos outros genes do relógio circadiano de *Drosophila melanogaster* foram identificados e caracterizados nos últimos anos (Hardin, 2005). Atualmente, o modelo molecular de controle do marcapasso circadiano envolve alças de auto-regulação negativa que controlam a expressão cíclica, não só dos

seus componentes como também, de centenas de genes de “output” do relógio (Ceriani *et al.*, 2002).

A alça principal do relógio circadiano de *Drosophila* envolve o controle da variação cíclica de *per* e *tim* (revisado em Stanewsky, 2003; Hardin, 2005, 2006; Dubruille & Emery, 2008). As proteínas CLOCK (CLK) e CYCLE (CYC) formam um heterodímero que, ao longo do dia e início da noite ativa as expressões de *per* e *tim*, pela ligação às regiões E-box (CACGTG) em seus promotores (Figura 1.2) (Darlington *et al.*, 1998). Esta ativação promove um aumento da transcrição destes genes que apresentam seus níveis máximos no início da noite. No final da noite, PER e TIM formam um heterodímero que se associa a outra proteína, DOUBLETIME (DBT), formando um complexo PER/TIM/DBT que é translocado para dentro do núcleo (Martinek *et al.*, 2001). Este complexo interage fisicamente com CLK/CYC através de um domínio presente na região C-terminal de PER (Chang & Reppert, 2003). O complexo unido a CLK/CYC fosforila CLK por intermédio de DBT, que é uma quinase e esta fosforilação inibe a ligação de CLK/CYC a regiões promotoras dos genes controlados por ele, como os próprios *per* e *tim* (Yu *et al.*, 2006). Desta maneira, PER/TIM controlam de forma indireta sua própria transcrição (Figura 1.2).

Essa repressão provocada por PER e TIM parece não se restringir exclusivamente à formação do seu heterodímero, pois tanto PER, quanto TIM são capazes de entrar no núcleo de forma independente (Shafer *et al.*, 2002). PER pode entrar no núcleo na forma de um homodímero PER/PER que apresenta função no relógio, uma vez que mutantes incapazes de formar esse homodímero afetam a entrada nuclear e o papel repressor de PER (Landskron *et al.*, 2009). A formação de PER/PER é importante, uma vez que ele atuaria na repressão de CLK/CYC em momentos onde o heterodímero PER/TIM não estaria formado. De qualquer maneira, a formação do heterodímero parece ser crucial, pois, embora PER sozinho possa ser capaz de reprimir a atividade de CLK/CYC, a presença de TIM promove uma repressão mais eficiente (Rothenfluh *et al.*, 2000; Chang & Reppert, 2003; Nawathean & Rosbash, 2004; Cyran *et al.*, 2005).

### 1.2.2 – Mecanismos pós-traducionais

A fosforilação e defosforilação também têm um papel importante no relógio circadiano (Fig 1.2). A quinase DOUBLETIME (DBT) regula a estabilidade de PER através da sua fosforilação, marcando-o para ser degradado (Kloss *et al.*, 1998). Por

outro lado PER é estabilizado pela interação com TIMELESS e pela ação da fosfatase PP2a (Sathyanarayanan *et al.*, 2004). A Caseína quinase 2 (CK2) também fosforila PER controlando sua localização celular, uma vez que mutações no gene que a codifica retardam o tempo de entrada de PER no núcleo (Lin *et al.*, 2002; Akten *et al.*, 2003). A entrada nuclear de TIM também é influenciada pela fosforilação por SHAGGY (SGG). A superexpressão de *Shaggy* resulta em uma entrada prematura de PER/TIM no núcleo (Martinek *et al.*, 2001).

### 1.2.3 – *Clk* e a segunda alça regulatória

Embora o gene *cycle* apresente expressão constitutiva (Rutila *et al.*, 1998), dois genes, *PAR-domain-protein-1* (*Pdp1*) e *vriille* (*vri*) regulados por CLK/CYC são importantes na expressão rítmica de *Clk*. PDP1 $\epsilon$  (proteína resultante de um dos transcritos alternativos de *Pdp1*) e VRI competem entre si na ligação à região promotora de *Clk* (sítio de ligação E4BP4) sendo o primeiro, um ativador e o segundo, um repressor desta transcrição (Figura 1.2).

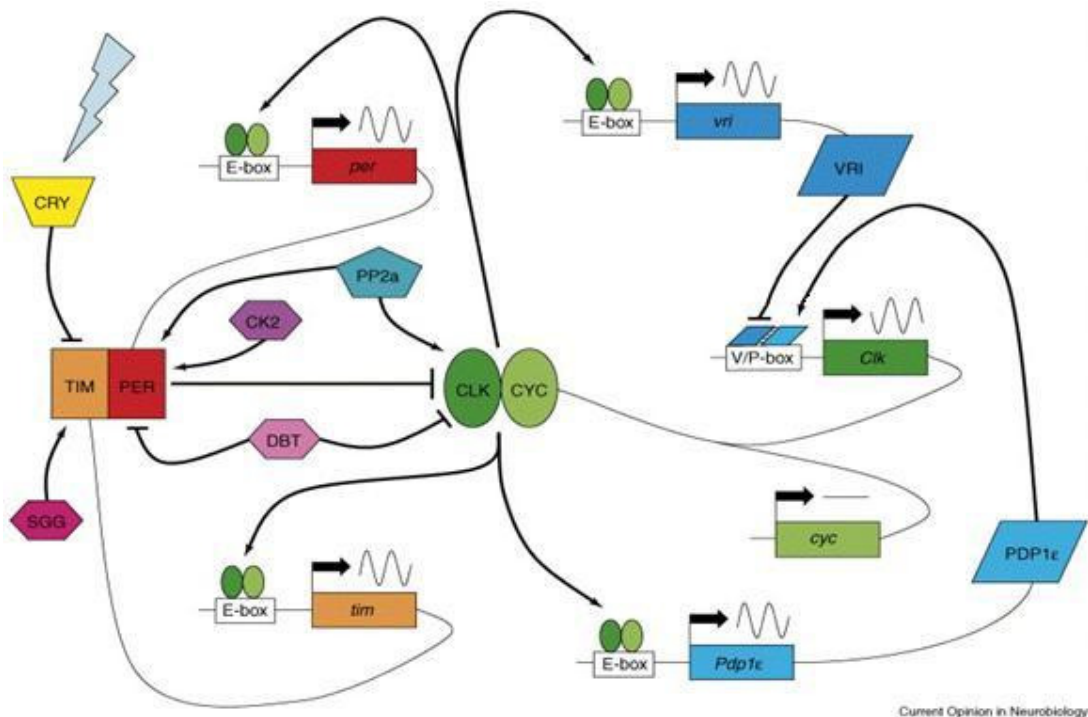


Figura 1.2: Modelo do mecanismo do relógio circadiano em *Drosophila melanogaster* com as duas alças regulatórias. Os genes estão representados por retângulos coloridos, com seus nomes em itálico. As seqüências regulatórias E-box e V/P-box são mostradas em retângulos brancos ao lado de seus respectivos genes. As setas grossas acima dos genes representam o início da transcrição. O padrão de transcrição é mostrado acima de cada gene, onde linhas sinuosas representam transcrições rítmicas e linhas retas representam transcrição constante. As linhas finas que saem dos genes representam a tradução e terminam nas respectivas proteínas, em cada caso. A regulação positiva é mostrada por linhas finas com setas no final e a regulação negativa é mostrada também por linhas finas, porém com barras no final. O raio de luz representa a ativação de CRY pela luz azul, que promove a degradação de TIM (Retirado de Hardin, 2006).

Como os níveis desses dois fatores de transcrição ocorrem com uma diferença de fase de algumas horas entre si, com VRI aumentando no início da noite e PDP1 $\epsilon$  na metade da noite (Cyran *et al.*, 2003), isto acaba refletindo em uma expressão rítmica do transcrito de *Clk* (revisado em Hardin, 2005, 2006; Zheng & Sehgal, 2008).

Apesar de *Clk* ser expresso de forma rítmica, sua proteína não apresenta variação cíclica na sua abundância (Houl *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006). Contudo, foi observada uma fosforilação circadiana deste fator de transcrição (Figura 1.2). CLK está hiperfosforilado, entre o final da noite e o início da manhã (Yu *et al.*, 2006), justamente nos períodos de máxima repressão da transcrição de *per* e *tim*, o que sugere que CLK seria mais ativo quando hipofosforilado (Kim & Edery, 2006; Yu *et al.*, 2006).

Recentemente, uma terceira alça regulatória envolvendo o gene *clockwork orange* (*cwo*) foi proposta. Nesta, *cwo* é ativado por CLK/CYC e sua proteína formada (CWO) teria a capacidade de reprimir sua própria transcrição, por se ligar a regiões E-box (CACGTG) presentes na região promotora de *cwo* impedindo que CLK/CYC continue atuando na ativação deste gene (Matsumoto *et al.*, 2007). Entretanto, CWO compete com CLK/CYC na ligação a regiões promotoras de outros genes controlados por este heterodímero, como *per* e *tim*, por exemplo (Matsumoto *et al.*, 2007). Contudo, há, ainda, uma divergência quanto à função de CWO nestes genes. Alguns trabalhos afirmam que CWO atuaria como um repressor não somente de sua própria transcrição, mas também de todos os outros genes controlados por CLK/CYC (Kadener *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2007). Entretanto, outro trabalho afirma que CWO seria um repressor apenas de sua própria transcrição, atuando como um ativador para os outros genes controlados por CLK/CYC, de uma maneira ainda desconhecida (Richier *et al.*, 2008).

### 1.3 – O efeito da luz no relógio

O sistema circadiano de *Drosophila* recebe informação luminosa para seu acerto por quatro diferentes fotoreceptores e/ou fotopigmentos. Estes são os fotoreceptores externos (os olhos compostos e ocelli), o orifício de Hofbauer-Buchner's (H-B eyelet), o fotopigmento CRYPTOCHROME (CRY), e fotopigmentos desconhecidos dos neurônios dorsais (Helfrich-Forster *et al.*, 2001; Rieger *et al.*,

2003; Veleri *et al.*, 2003). Os sinais desses fotoreceptores e fotopigmentos atuam em conjunto. Acredita-se que CRY é o principal fator em todo esse mecanismo.

CRY é uma flavoproteína fotossensível que quando estimulada pela luz sofre uma mudança conformacional e torna-se ativa, levando a fosforilação de TIM e marcando-o para ser degradado via proteossoma (Figura 1.2) (Stanewsky *et al.*, 1998). O mutante *cry<sup>b</sup>*, em regimes de claro constante (LL) retém uma ritmicidade locomotora, ao contrário de moscas selvagens que são arrítmicas (Emery *et al.*, 2000). A luz constante promove a perda do ritmo em moscas selvagens, pois causa a degradação contínua de TIM, impedindo assim a formação do heterodímero PER/TIM e a repressão cíclica na ativação transcricional promovida pelo heterodímero CLK/CYC.

#### 1.4 – O efeito dos ciclos de temperatura no relógio circadiano

Assim como os ciclos de claro-escuro, outras oscilações ambientais como os ciclos de temperatura também podem sincronizar (arrastar) o marcapasso circadiano. Apesar de ainda pouco se saber a respeito dos efeitos da variação cíclica da temperatura no relógio em comparação ao que já se conhece sobre os efeitos da luz, os estudos em *Drosophila melanogaster* estão entre os mais detalhados a este respeito até então (revisado em Tomioka & Yoshii, 2006; Glaser & Stanewsky, 2007). Um destes estudos mostra a importância relativa da temperatura no arrastamento do relógio (Yoshii *et al.*, 2002).

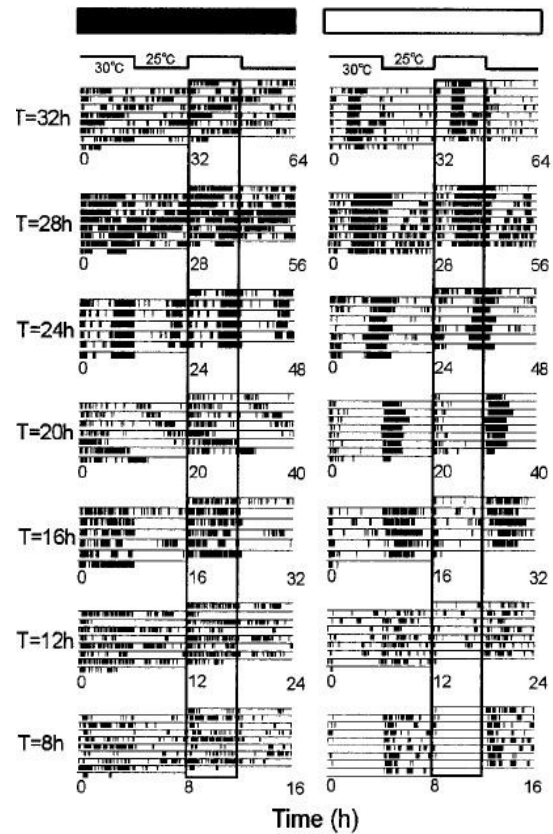
Neste trabalho, drosófilas conseguem ser arrastadas por ciclos de temperatura em regimes de escuro constante. No entanto, isto apenas ocorre se o período ao qual estão submetidas for próximo de 24h, já que outros ciclos (Figura 1.3) não causam arrastamento dos ritmos de atividade (Yoshii *et al.*, 2002). Isto mostra que a temperatura é um *zeitgeber* mais fraco que a luz, uma vez que a última consegue arrastar o relógio com uma larga variação de ciclos de claro-escuro menores ou maiores que 24h (Helfrich-Förster, 2001).

Além de existir uma hierarquia entre luz e temperatura em relação a sua influência, estes dois fatores promovem o arrastamento do relógio de maneiras diferentes. O mutante *cry<sup>b</sup>*, quando em regimes de claro constante (LL), apresenta uma atividade locomotora com duas fases diferentes completamente independentes (Yoshii *et al.*, 2004). Este desacoplamento da atividade seria ocasionado por grupos



de neurônios independentes controlando este processo. Quando este mutante é colocado em ciclos de luz e temperatura com períodos diferentes entre si (simultaneamente ciclos de claro-escuro de 25h e ciclos de temperatura de 22h), um destes componentes acompanha o período da luz, enquanto o outro acompanha a temperatura (revisado em Tomioka & Yoshii, 2006). Uma maneira de entender melhor este processo é observar os diferentes neurônios que expressam genes de relógio sob esse dois regimes.

Figura 1.3: Ritmos de atividade de *D. melanogaster* em condições constantes de luz ou escuro com vários ciclos de temperatura de diferentes durações. A figura mostra actogramas de *D. melanogaster* em vários ciclos de temperatura com períodos diferentes, consistindo de igual duração da termofase (30°C) e criofase (25°C) em LL (direita) e DD (esquerda). LL; do inglês *Light/Light* e DD; do inglês *Dark/Dark*. O período de oscilação da temperatura (T) encontra-se à esquerda de cada painel de actogramas. As barras brancas e pretas representam luz e escuro, respectivamente. As caixas com contornos de linhas pretas à direita dos actogramas indicam a termofase. Em DD, o ritmo de atividade é arrastado apenas por ciclos de temperaturas com duração de 24 horas, sendo que nos outros Ts sua atividade está em livre-curso. Os períodos são próximos de 24 horas, porém variam de acordo com o T. Em contrapartida, em LL sua atividade está sincronizada em todos os Ts ainda que ocorra uma mudança da atividade dependente do T. Isto porque em T=32h, a atividade está concentrada no meio da termofase e à medida que o T é diminuído, a atividade tende a se concentrar fora da termofase. Retirado de Yoshii *et al.*, 2002.

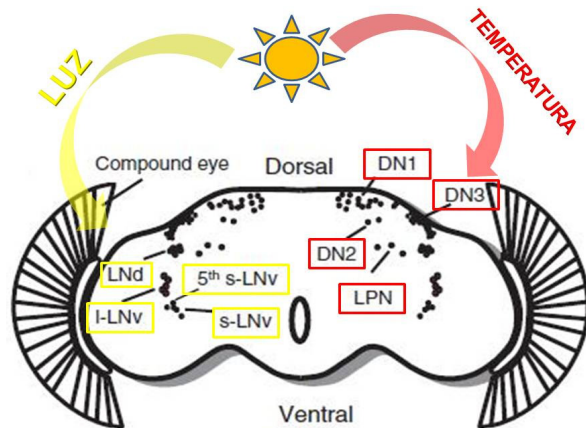


Os neurônios que participam do relógio de *Drosophila* estão classificados em três grupos: neurônios dorsais (DNs), localizados na parte dorsal do protocérebro, os laterais (LNs), localizados mais próximos ao lobo ótico e um grupo de neurônios localizado na região lateral posterior do protocérebro (LPNs) (revisado em Sheeba, 2008). Um recente estudo mostrou que os neurônios laterais são preferencialmente arrastados pela luz, enquanto os mais dorsais e os LPNs são preferencialmente arrastados pela temperatura (Figura 1.4) (Miyasako *et al.*, 2007).

#### 1.4.1 – Os efeitos da temperatura no marcapasso molecular

Apesar de ser um *zeitgeber* mais fraco que a luz, a temperatura é importante para a manutenção do ritmo em determinadas condições, visto que PER e TIM continuam oscilando em claro constante com ciclos de temperatura (Yoshii *et al.*, 2005), condição essa que normalmente interrompe a oscilação do relógio (Myers *et*

Figura 1.4: Neurônios do relógio circadiano no cérebro de *D. melanogaster* diferentemente arrastados por luz e por temperatura. Desenho esquemático do cérebro de *D. melanogaster* mostrando os oito grupos de neurônios do relógio circadiano: s-LNV, 5<sup>th</sup> s-LNV, I-LNV, LNd, DN1, DN2, DN3, e LPN. Os neurônios marcados em amarelo (caixas amarelas) são preferencialmente arrastados pela luz, enquanto que os neurônios marcados em vermelho (caixas vermelhas) são preferencialmente arrastados pela temperatura. Retirado e modificado de Miyasako *et al.*, 2007.



*al.*, 1996). A temperatura influencia não somente a variação circadiana na abundância protéica, mas a expressão circadiana como um todo, uma vez que diversos genes são rítmicos nestas condições (Glaser & Stanewsky, 2005; Boothroyd *et al.*, 2007).

Além disso, foi demonstrado que *per* e *tim* apresentam mecanismos de *splicing* alternativo dependentes de temperatura (Majercak *et al.*, 1999; Boothroyd *et al.*, 2007). Temperaturas mais baixas aumentam os níveis de mRNA de *per* através do *splicing* alternativo de um intron na região 3' não traduzida que pode estar alterando a estabilidade do transcrito. Tal processo, por sua vez, aumenta os níveis de proteína de PER que, ao entrar no núcleo, promove uma inibição da transcrição via CLK/CYC mais cedo que o normal fechando o ciclo circadiano de forma antecipada e fazendo com que a atividade das drosófilas se inicie mais cedo em dias mais frios (Majercak *et al.*, 1999). No caso de *tim*, seu último intron é mais freqüentemente retido após este processo em baixas temperaturas. Esta forma de *tim* (*tim<sup>cold</sup>*) gera um códon de parada prematura que resulta em uma proteína menor que o normal, embora ainda não esteja certo se isto afeta a atividade de TIM (Boothroyd *et al.*, 2007).

#### 1.4.2 – Termo-receptores do relógio

A percepção da temperatura pelo relógio circadiano provavelmente envolve termo-receptores e genes mais diretamente envolvidos com a passagem de informação do ambiente até os osciladores do relógio. A descoberta de uma mutação que interfere diretamente no arrastamento por temperatura foi um passo importante na elucidação deste processo (Glaser & Stanewsky, 2005). Os cérebros de *Drosophila*, quando isolados não são capazes de apresentar ritmicidade na expressão gênica por ciclos de temperatura e precisam da informação vinda dos órgãos periféricos para isso (Sehadova *et al.*, 2009). De fato, vários tecidos periféricos isolados mostram uma oscilação arrastada pela temperatura, sugerindo que além dessa percepção ser autônoma na periferia, ela é também bastante ampla (Glaser & Stanewsky, 2005; Sehadova *et al.*, 2009). O principal componente responsável por perceber as variações térmicas e passar a informação aos osciladores periféricos são os órgãos cordotonais (Sehadova *et al.*, 2009).

Todos os órgãos cordotonais são mecanotransdutores; muitos deles funcionam como proprioceptores, enquanto outros são receptores de vibração (Clements, 1999). Mutações no gene *nocte*, na região dos órgãos cordotonais promovem alterações em sua estrutura e função, interferindo consideravelmente na sincronização por temperatura (Sehadova *et al.*, 2009). Sendo assim, observa-se a importância deste gene e dos órgãos cordotonais neste processo.

A maioria dos estudos realizados até o momento com *Drosophila* apenas leva em conta a influência da luz e da temperatura separadamente. Contudo, um estudo realizado com moscas submetidas a regimes de claro-escuro, juntamente com ciclos de temperatura, mostraram ritmos mais robustos de atividade locomotora e abundância de TIM no cérebro que em condições de claro-escuro ou ciclos de temperatura isoladamente (Yoshii *et al.*, 2009). Na natureza, ambos atuam em sinergia. Sendo assim, luz e temperatura são importantes fatores para o arrastamento e juntos promovem um acerto mais fino do relógio biológico.

#### 1.5 – Relógio circadiano em outros insetos

*Drosophila melanogaster* é o principal modelo de estudo do relógio circadiano em insetos em nível molecular, contudo diversos estudos foram já realizados em outras espécies (Sandrelli *et al.*, 2008). No flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*,

foram observadas diferenças importantes com o modelo *Drosophila* (Meirelles-Filho *et al.*, 2006a; Meireles-Filho *et al.*, 2006b). Neste vetor da leishmaniose visceral americana, *Clk* cicla com uma fase bem diferente da observada em *Drosophila* (Meirelles-Filho *et al.*, 2006a; Bae *et al.*, 1998), e *cyc* apresenta um ritmo circadiano na abundância do mRNA (Meireles-Filho *et al.*, 2006b), enquanto que em *Drosophila* este não cicla (Rutila *et al.*, 1998). Além disso, como em muitos outros insetos a proteína CYC em flebotomíneos apresenta uma cauda de ativação que está ausente em *Drosophila* (Meireles-Filho *et al.*, 2006b; Sandrelli *et al.*, 2008).

Os genes codificando criptocromos representam um capítulo à parte na análise comparativa do relógio circadiano de insetos. Como mencionado antes, *cry* está envolvido na foto-percepção e sincronização do relógio pela luz em *Drosophila* (Emery *et al.*, 2000; Stanewsky *et al.*, 1998). Embora *Drosophila* tenha apenas um gene *cry*, também chamado de *dcry* ou *cry1*, diversas espécies de insetos possuem um segundo tipo de *cry* filogeneticamente mais próximo dos criptocromos de mamíferos, sendo chamado de *mcry* ou *cry2* (Zhu *et al.*, 2005). Este segundo codifica um repressor que interfere no papel de fator transcricional de CLK/CYC, porém não é fotossensível (Zhu *et al.*, 2005).

O papel de CRY2 como repressor da transcrição mediada por CLK/CYC foi evidenciado em quatro ordens de insetos (Diptera, Lepidoptera, Coleoptera e Hymenoptera) (Yuan *et al.*, 2007). O fato de *cry2* não estar presente em *Drosophila* e *cry1* não ter sido encontrado em algumas espécies, sugere a existência de três tipos de relógio circadiano em insetos (Figura 1.5).

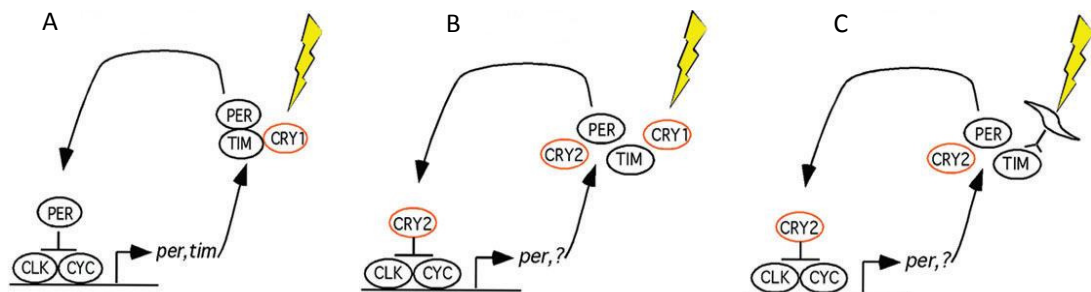


Figura 1.5: Os três tipos de relógio de insetos: A- modelo com apenas *cry1*. B- modelo com os dois criptocromos. C- modelo com apenas *cry2*. Retirado e modificado de Yuan *et al.* (2007).

No primeiro deles, ao qual pertence *Drosophila*, somente *cry1* fotossensível está presente e PER seria o repressor de CLK/CYC. No segundo, encontrado em borboletas e mosquitos, tanto *cry1* quanto *cry2* estão presentes, sendo o primeiro fotossensível como em *Drosophila* e o segundo repressor de CLK/CYC. Já no terceiro, como em abelhas e besouros, apenas *cry2* existiria, não se sabendo ao certo qual seria o principal fotorreceptor molecular (Figura 1.5) (Yuan *et al.*, 2007).

### 1.6 – *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

Muitas espécies de mosquitos são vetores de doenças. Os ritmos de atividade e alimentação destes são importantes para a dinâmica de transmissão de várias doenças. Diversos estudos sobre os ritmos circadianos envolvendo mosquitos vetores já foram realizados e utilizavam, em sua maior parte, observações dos seus ritmos de vôo (revisão em Clements, 1999). Em um destes trabalhos, realizado no final da década de 60, Taylor e Jones observaram a atividade de vôo em fêmeas de *Aedes aegypti* em regimes artificiais distintos. Esta espécie apresentou maiores níveis de atividade durante a fotofase (fase clara) em LD 12:12 (12 horas de claro, seguidos de 12 horas de escuro), além de apresentar queda nos níveis de atividade e um período de 22,5 horas em livre-curso em escuro constante (Figura 1.6). Interessantemente, ritmos também foram observados em claro constante a uma intensidade de luz (70 LUX) que normalmente leva a arritmia em *Drosophila* (Taylor & Jones, 1969).

No início da década de 90, Chiba e colaboradores estudaram o efeito dos ciclos de temperatura no mosquito *Culex pipiens pallens*. Neste trabalho foi observado que esta espécie pode ser arrastada por ciclos de temperatura em DD. Os mosquitos mostraram uma capacidade de ressincronização ao ciclo de temperatura, quando este foi atrasado em oito horas em relação ao ciclo prévio (Figura 1.7). Essa adaptação ao novo ciclo não foi imediata e apresentou uma fase transiente por alguns dias, até se estabilizar por completo (Figura 1.7) (Chiba *et al.*, 1993).

Em contraste com o número de estudos envolvendo a análise dos ritmos de atividade de mosquitos, raros são os artigos abordando aspectos moleculares e pouco se sabe acerca dos genes que controlam o relógio circadiano desses insetos.

Em um dos poucos estudos, Das e Dimopoulos (2008) utilizaram microarranjos para investigar o papel de pulsos de luz na expressão gênica e propensão à alimentação sanguínea de *Anopheles gambiae*, principal vetor da Malária na África, investigando também o possível envolvimento de genes do relógio utilizando a técnica de RNA de interferência (RNAi) (Das & Dimopoulos, 2008).

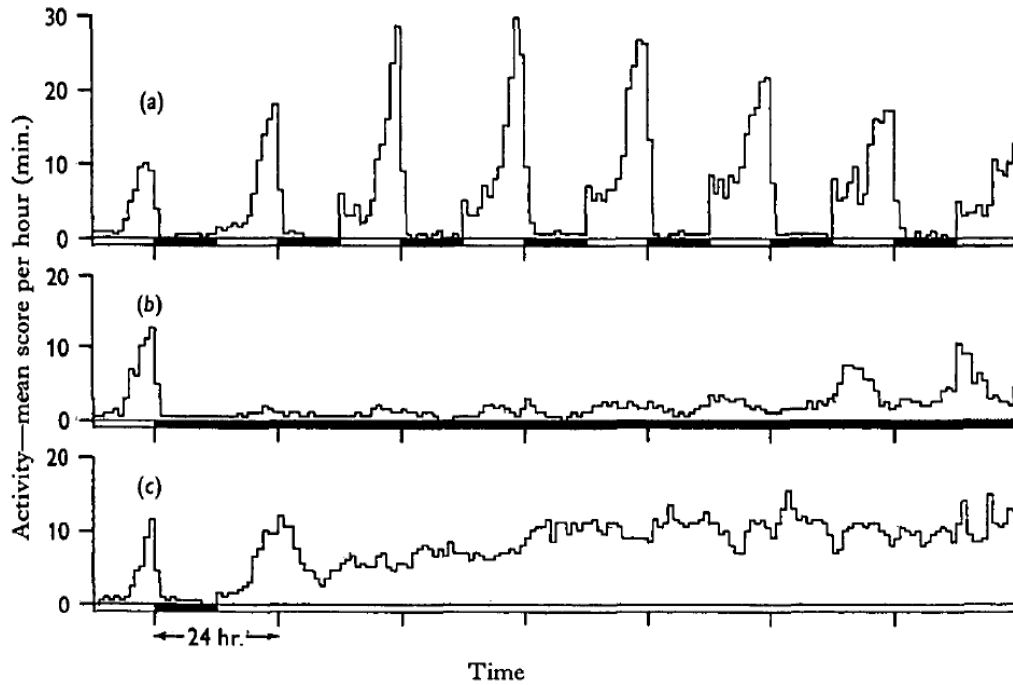
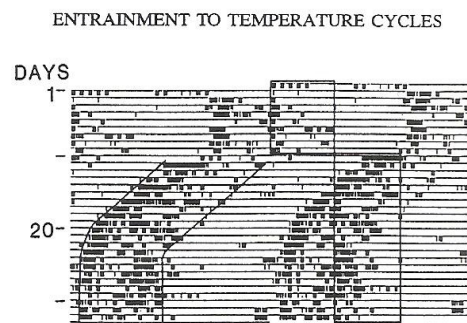


Figura 1.6: Atividade de vôo de fêmeas (inseminadas) de *Aedes aegypti*. As barras horizontais brancas representam a fase clara, enquanto as barras pretas representam a fase escura. A) Regime de LD 12:12; *Aedes aegypti* apresenta ritmos bastante robustos com maiores níveis de atividade restritos à fotofase entre uma a duas horas antes do início da escotofase (fase escura). B) LD 12:12, seguidos de alguns dias em DD (escuro constante); ao entrar em DD, *Aedes aegypti* apresenta uma queda nos níveis de atividade, embora continue com padrões rítmicos e com um período de aproximadamente 22,5 horas. C) LD 12:12 seguidos de LL (claro constante; 70 LUX); em LL há um crescimento marcante dos níveis de atividade e o seu ritmo de vôo apresenta um ritmo fraco com um período de cerca de 26 horas. Retirado de Taylor & Jones, 1969.

Figura 1.7: Atividade de *Cx. pipiens pallens* em ciclos de temperatura. A figura mostra um actograma de uma fêmea de *Cx. pipiens pallens* em 10 dias em DDTC (escuro constante com ciclos de temperatura; 16 horas à 28°C, seguidos de 8 horas à 23°C). A partir do décimo primeiro dia, o ciclo de temperatura é atrasado em oito horas em relação ao ciclo prévio. Ao ser submetido ao novo ciclo, *Cx. pipiens pallens* desloca sua fase de atividade (curvas desenhadas marcando o início e o final da atividade) por alguns dias, até se estabilizar, mostrando um arrastamento ao novo ciclo de temperatura. Este deslocamento temporário é chamado de estado de transiência. As caixas com contornos pretos representam a criofase. Retirado de Chiba *et al.*, 1993.



Nosso grupo tem estudado as bases moleculares do relógio circadiano de duas espécies de mosquitos que apresentam padrões de atividade distintos. *Aedes aegypti*, vetor da Dengue e da Febre Amarela, um mosquito com atividade diurna, e *Culex quinquefasciatus*, vetor da Filariose e Febre do Oeste do Nilo que apresenta maior atividade durante a noite (Clements, 1999; Gentile, 2007).

Apesar das diferenças nos ritmos de atividade locomotora, *Ae. aegypti* e *Cx quinquefasciatus* apresentam muita semelhança no padrão de expressão circadiana dos genes *Clk*, *cyc*, *per* e *tim* (Gentile, 2007), sugerindo então que outros genes poderiam estar envolvidos no controle das diferenças no comportamento. Sendo assim, resolvemos estudar nestas duas espécies o padrão de expressão de outros genes importantes do relógio circadiano. Além disso, procuramos investigar se em ciclos de temperatura, as duas espécies mantêm as mesmas características comportamentais e moleculares vistas anteriormente com regimes de claro-escuro e escuro constante.

## 2 – Objetivos

- Análise da expressão circadiana dos genes *vri*, *Pdp1* e *cry2* de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* por ensaios de PCR em Tempo Real, em diferentes regimes de luz (claro-escuro e escuro constante).
- Estudar os efeitos de ciclos de temperatura nos padrões de atividade locomotora de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.
- Estudar os efeitos de ciclos de temperatura na expressão circadiana dos genes *Clk*, *cry2*, *cyc*, *Pdp1*, *per*, *tim* e *vri* de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.



## 3 – Material e Métodos

### 3.1 – Criação de mosquitos

Mosquitos gentilmente cedidos pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (Instituto Oswaldo Cruz) de colônias mantidas no IBEX (Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro, Brasil) foram criados desde ovos até adultos em uma incubadora (*Precision Scientific*, modelo 818) em regimes de 12 horas de luz com 12 horas de escuro em temperatura constante de 25°C (LD 12:12, ou simplesmente LD, abreviação do inglês *Light-Dark*), com exceção de um experimento descrito abaixo. Para *Aedes aegypti* utilizamos a linhagem Rockefeller e para *Culex quinquefasciatus*, uma linhagem própria do IBEX. As fêmeas adultas das duas espécies foram separadas dos machos em intervalos de aproximadamente 12 horas após a emergência dos adultos de modo a mantê-las virgens. Estes adultos foram mantidos em tubos *Falcon* de 50 ml, em grupos de dez indivíduos, fechados com uma tampa aberta contendo filó em cima. Um algodão embebido em solução de sacarose a 10% era colocado sobre este filó para alimentar os mosquitos. Este processo de separação de fêmeas virgens era feito até atingirmos o número necessário para a realização dos experimentos (entre 200 e 300 adultos para cada experimento).

### 3.2 – Análise da atividade locomotora

#### 3.2.1 – Preparo e descrição dos regimes utilizados

O sistema de análise de atividade utilizado (*Drosophila Activity Monitor*, Trikinetics; Waltham, MA, USA) permite registrar a atividade locomotora de *Drosophila* e outros insetos de tamanho similar. Utilizamos o mesmo sistema, porém com monitores que utilizam tubos um pouco maiores (Fig 3.1). Para o monitoramento da atividade as fêmeas adultas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* são individualmente transferidas para tubos de vidro de sete centímetros de comprimento por um centímetro de diâmetro. Em cada tubo é colocado um algodão com solução de sacarose a 10% em uma das extremidades e ambas são seladas com *parafilm*. Estes tubos, então, são transferidos para monitores que apresentam 32 canais individuais. Em cada canal, um feixe de infravermelho atravessa o tubo de vidro lateralmente. Os monitores são colocados dentro de uma incubadora *Precision Scientific*, modelo 818 e conectados a um computador para o registro da atividade. A movimentação de cada mosquito é

detectada individualmente, pois no momento que o mosquito atravessa o meio do tubo, o feixe de infravermelho é interrompido e o computador registra este evento através do programa *DAMSystem data collection software* versão 2.0.6 (Trikinetics Waltham, MA, USA). O total de eventos é armazenado pelo programa em intervalos definidos pelo usuário, variando de cinco minutos a uma hora, gerando dados de atividade locomotora ao longo de vários dias de experimento. Para nossas análises utilizamos um intervalo de 30 minutos, embora em alguns casos, os dados tenham sido coletados a cada 5 minutos. Dentro da incubadora, foram utilizados diversos regimes de luz (ciclos de claro-escuro, claro e escuro constantes) e temperatura (ciclos de 30°C e 20°C e temperatura constante de 25°C ou 20°C) ao longo de vários dias, para quatro experimentos diferentes (ver Tabela 3.1).

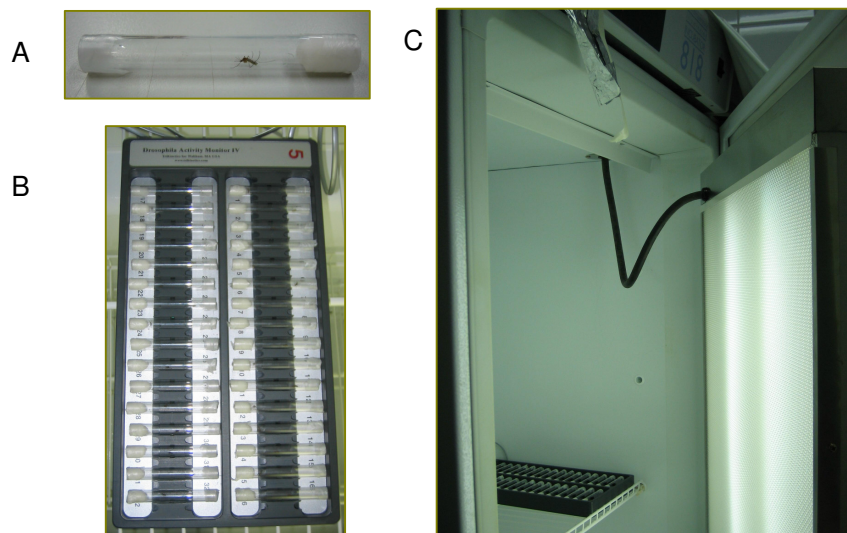


Figura 3.1: Monitor de atividade locomotora. A) Tubo de vidro contendo uma fêmea de mosquito. B) Monitor com 32 canais individuais de monitoramento da atividade locomotora. C) Incubadora utilizada para a produção de diversos regimes artificiais. (Fotos de Carla Gentile).

### 3.2.2 – Análise de dados de atividade e formas de elaboração de gráficos

Os dados de atividade foram analisados e visualizados com o programa Excel. Para esta análise, excluímos os mosquitos mortos durante o experimento. Foram excluídos também os dados relativos as primeiras 16 a 20 horas após os mosquitos serem colocados na máquina de atividade dentro da incubadora. Este intervalo, correspondendo ao final da fotofase e 12 horas da escotofase em um regime de LD12:12, foi tratado como um período inicial de “adaptação”. Sendo assim, foram considerados para análise, os dados gerados a partir do instante em que as luzes na incubadora são ligadas novamente ou, no caso de regimes com

ciclos de temperatura, a partir do instante em que a temperatura começa a aumentar.

**Tabela 3.1: Descrição dos experimentos de atividade locomotora**

Tipo de regime	Descrição do experimento e condições ambientais utilizadas
LLTC + LL	Três dias em claro constante e com ciclos de temperatura de 12 horas a 30°C, seguidos de 12 horas a 20°C (LLTC, do inglês <i>Light-Light/Thermo-Cold</i> ). Após os três dias de LLTC, os mosquitos foram submetidos a mais seis dias em claro constante, porém sem ciclos de temperatura (à temperatura constante de 20°C) (LL).
LDTC + DDTC	Quatro dias com ciclos de claro e escuro e ciclos de temperatura ao mesmo tempo (LDTC- 12 horas de claro a 30°C, seguidos de 12 horas de escuro a 20°C), seguidos de doze dias de escuro constante com ciclos de temperatura (DDTC).
LD + LDTC + LLTC + DLTC	Três dias de claro e escuro a 25°C constante (LD-12 horas de claro, seguidos de 12 horas de escuro), seguidos de quatro dias de LDTC, mais quatro dias de LLTC e, finalmente, quatro dias de DLTC (12 horas de escuro a 30°C, seguidos de 12 horas de claro a 20°C).
LD + DDTC + LD + LLTC	Quatro dias de LD a 25°C, seguidos de cinco dias de DDTC, mais quatro dias de LD a 25°C, seguidos de cinco dias de LLTC.

Para a confecção dos gráficos foi calculada a média de Williams, uma modificação da média geométrica (Haddow 1954; Williams 1937), a partir dos dados de atividade coletados de todos os indivíduos a cada 30 minutos ao longo de cada experimento. Alguns gráficos foram elaborados utilizando dados normalizados, devido à diferença de valores de atividade entre *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* (Figura 3.2A). Para isto, os valores de atividade locomotora foram normalizados separadamente pelo máximo de cada regime (ex. LD, LDTC, DDTC) (Figura 3.2B). Optamos em não incluir as barras de erros para facilitar a visualização dos gráficos de atividade locomotora (Figura 3.2C).

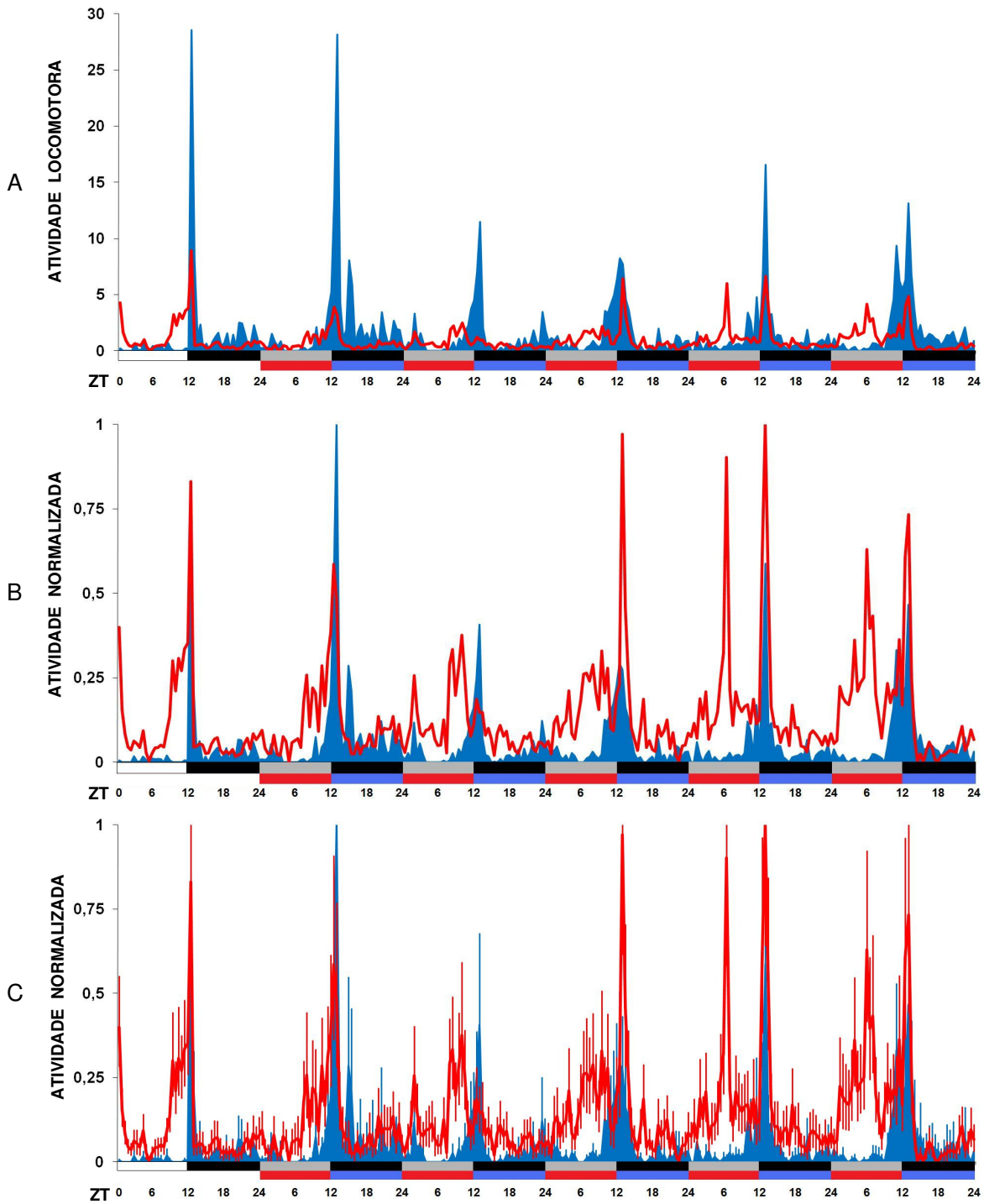


Figura 3.2: Exemplos de gráficos de atividade de *Ae. aegypti* (linha vermelha) e *Cx. quinquefasciatus* (área azul) em um dia de LD, seguidos de cinco dias em DDTC. A) Gráfico utilizando dados de atividade a partir da média de Williams. B) Gráfico com os mesmos dados, porém normalizados. O regime de LD foi normalizado pelo valor máximo entre quatro dias de LD (o gráfico só mostra o quarto dia de LD), enquanto que o regime de DDTC foi normalizado pelo valor máximo entre os cinco dias de DDTC. C) Gráfico anterior incluindo barras de erros. *Ae. aegypti* (n=30) e *Cx. quinquefasciatus* (n=12). Eixo horizontal representa o ZT (*Zeitgeber Time*: Horário do ciclo ambiental medido em horas). Barras horizontais: brancas (fotofase), pretas (escotofase), cinzas (fotofase subjetiva), vermelhas (termofase) e azuis (criofase).

### 3.3 – Análise da expressão circadiana por PCR em Tempo Real

#### 3.3.1 – Coleta de pontos para análise da expressão gênica

Para os experimentos de expressão gênica, fêmeas virgens das duas espécies de mosquitos foram mantidas durante três dias em uma incubadora em diferentes regimes de luz e temperatura, semelhantes aos utilizados nos experimentos de atividade (ver Tabela 3.2 e Resultados).

**Tabela 3.2: Descrição dos experimentos de expressão gênica, espécies coletadas e quantidade de réplicas de cada condição testada.**

Tipo de regime	Descrição do experimento e condições ambientais utilizadas	Espécie	Número de réplicas
LLTC	Três dias em claro constante e com ciclos de temperatura de 12 horas a 30°C, seguidos de 12 horas a 20°C (LLTC, do inglês <i>Light-Light/Thermo-Cold</i> ). <sup>a</sup>	<i>Ae. aegypti</i>	4
		<i>Cx. quinquefasciatus</i>	4
DDTC	Três dias em escuro constante e com ciclos de temperatura de 12 horas a 30°C, seguidos de 12 horas a 20°C (DDTC, do inglês <i>Dark-Dark/Thermo-Cold</i> ). <sup>a</sup>	<i>Ae. aegypti</i>	2
		<i>Cx. quinquefasciatus</i>	4
LL	Três dias em claro constante com temperatura constante de 25°C. <sup>a</sup>	<i>Ae. aegypti</i>	2
DD	Três dias em escuro constante com temperatura constante de 25°C. <sup>a</sup>	<i>Ae. aegypti</i>	2
DDTC*	Três dias em escuro constante e com ciclos de temperatura de 12 horas a 30°C, seguidos de 12 horas a 20°C (DDTC, do inglês <i>Dark-Dark/Thermo-Cold</i> ). <sup>b</sup>	<i>Ae. aegypti</i>	2

<sup>a</sup> criados desde ovos até adultos em LD (12 horas de claro, seguidos de 12 horas de escuro ambos a 25°C)

<sup>b</sup> criados desde ovos até adultos em LDTC (12 horas de claro a 30°C, seguidos de 12 horas de escuro a 20°C)

Como mencionado anteriormente, na maioria dos experimentos, os mosquitos foram criados de ovos até adultos em LD (12 horas de claro, seguidos de 12 horas de escuro) a 25°C. Em um experimento (DDTC\*), os mosquitos foram criados de ovos até adultos em LDTC (12 horas de claro a 30°C, seguidos de 12 horas de escuro a 20°C; ver resultados para mais detalhes).

Todas as coletas foram feitas no terceiro dia de cada regime visando um arrastamento prévio (dois primeiros dias) nas condições desejadas antes de se fazer a coleta (terceiro dia). O primeiro ponto de coleta corresponde à primeira hora do terceiro dia e prossegue em coletas a cada duas horas, totalizando 12 pontos de coleta em 24 horas de experimento. A cada coleta, os mosquitos eram imediatamente congelados em N<sub>2</sub> líquido, depois transferidos para tubos *ependorf* e armazenados em gelo seco. Ao final do experimento, as amostras foram guardadas em um freezer a -80°C até a extração do RNA.

### 3.3.2 – Extração de RNA total

Para a extração de RNA utilizamos apenas cabeças de mosquitos, previamente separadas em placas resfriadas com gelo seco. Após a separação das cabeças, estas foram maceradas (10 cabeças por tubo) em 100 µl de *Trizol* (Invitrogen) utilizando pistilos de plástico, e, posteriormente, homogeneizadas em um volume de 1 ml de *Trizol*. Os pistilos utilizados foram previamente tratados com dietil-pirocarbonato (DEPC) a 0,1% para evitar contaminação com RNAase. O procedimento de maceração envolve a homogeneização de amostras teciduais em um volume total de 1ml de *Trizol* de acordo com as instruções do fabricante (TRizol® Reagent Invitrogen; protocolo disponível no site <http://www.invitrogen.com/>). Ao final de toda a extração, o precipitado contendo o RNA total foi ressuspendido em 240 µl de água milli-Q previamente tratada com DEPC, conforme descrito previamente (Gentile, 2007).

### 3.3.3 – Purificação com Cloreto de Lítio

A purificação do RNA foi feita para retirada de restos de Fenol oriundos do *Trizol* e também de outros contaminantes provenientes das amostras que podem provocar uma inibição no processo de síntese de cDNA. Utilizamos o método de precipitação por Cloreto de Lítio a 2,5 M de acordo com o protocolo sugerido pela Ambion ([http://www.ambion.com/techlib/tb/tb\\_160.html](http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_160.html)). O RNA precipitado, purificado e seco foi ressuspendido em água milli-Q. O volume de água utilizado para ressuspende o RNA purificado varia de acordo com a amostra. Para 10 cabeças de *Aedes aegypti* ressuspendemos em 150 µl e para 10 cabeças de *Culex quinquefasciatus* em 500 µl, conforme previamente estabelecido (Gentile, 2007).

### 3.3.4 – Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi realizada uma reação de transcrição reversa com o kit *TaqMan Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems). A tabela 3.3 mostra a composição das reações. Foi utilizada uma termociclagem de 25°C/10 min, 48°C/60 min e 95°C/5 min. Após a síntese, cada cDNA foi diluído 10 x em água milli-Q apresentando um volume final de 100 µl.

Também foram feitas sínteses de cDNA a partir de diluições de RNA seriadas (diluições de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32) para testar amostras de RNA novas e também a eficiência de amplificação de oligonucleotídeos. As condições de termociclagem destes experimentos foram as mesmas que as da condição anterior. Os cDNAs gerados foram utilizados para análise de Curvas Padrão Relativas por PCR em Tempo Real (ver tópico 3.3.7).

Tabela 3.3: Composição das reações de RT-PCR para cada tubo da reação

Reagentes	Volume
10X RT Buffer	1,00 µL
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2,20 µL
dNTP (25mM)	2,00 µL
oligo d(T) <sub>16</sub> (50 µM)	0,50 µL
Inibidor de RNase (20U/µL)	0,20 µL
Transcriptase reversa (50U/µL)	0,25 µL
RNA Total (concentração desconhecida)	3,85 µL
Total	10,00 µL

### 3.3.5 – Obtenção *in silico* das seqüências dos genes de relógio

As seqüências dos genes de relógio de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* foram obtidas *in silico*, através de busca nos bancos de dados do genoma de ambas as espécies, disponível *on-line* no site do *Vector Base* (<http://www.vectorbase.org/>) utilizando como sondas os genes *vriIle* (num. acesso: AAF52237) e *Pdp1* (num. acesso: AAF04509) de *Drosophila melanogaster* e *cry2* de *Anopheles gambiae* (num. acesso: ABB29887). As seqüências genômicas e de cDNA obtidas foram então alinhadas utilizando o programa *Bioedit Sequence*

*Alignment Editor* (Hall, 1999). Destes alinhamentos, foram geradas seqüências consenso que tiveram as regiões de junção de exons determinadas, para auxiliar na escolha dos oligonucleotídeos (ver tópico 3.3.6). As seqüências dos demais genes estudados nesta tese já tinham sido previamente obtidas (Gentile, 2007).

### 3.3.6 – Escolha dos oligonucleotídeos

A partir das seqüências consenso geradas que continham apenas os exons, foram desenhados oligonucleotídeos para utilização na análise da expressão circadiana. A estratégia de escolha destes consistia em ter pelo menos um dos oligonucleotídeos na junção exon-exon, de modo a eliminar a possibilidade de amplificação de DNA genômico contaminante, sendo amplificado apenas o cDNA. Os oligonucleotídeos foram verificados quanto à temperatura de anelamento e formação de dímeros no site da *IDT Integrated DNA Technologies* (<http://www.idtdna.com/ANALYZER/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>).

### 3.3.7 – Reação de PCR em Tempo Real

Para a análise da expressão gênica em regimes de LD e DD a 25°C foram utilizados amostras de cDNA de fêmeas virgens gentilmente cedidos por Carla Gentile (Gentile, 2007). O restante das amostras de cDNA foi produzida conforme descrito previamente (tópico 3.3.4). A análise da expressão de todos os genes foi feita por uma PCR quantitativa em tempo real em um aparelho *ABI Prism 7700* e um *StepOne™ Real-Time PCR System* (ambos aparelhos da Applied Biosystems) utilizando o kit *Power SYBR® Green PCR Master Mix* da Applied Biosystems. A tabela 3.4 mostra a composição das reações.

Tabela 3.4: Composição das reações de qPCR em tempo real por poço.

Reagentes	Volume
Power SYBR® Green PCR Master Mix	7,50 µL
oligo 5' (10 µM)	0,75 µL
oligo 3' (10 µM)	0,75 µL
H <sub>2</sub> O	2,00 µL
cDNA	4,00 µL
Total	15,00 µL



A quantificação foi feita a partir da captação da fluorescência emitida pelo *SYBR Green*. Esta fluorescência não é emitida quando o *SYBR Green* está livre na solução e apenas quando este se incorpora à dupla fita formada, tornando possível a análise dos dados em tempo real.

Antes de executadas as reações, cada par de oligonucleotídeos foi testado quanto à formação de dímeros, amplificação de DNA genômico e testado também sua eficiência de amplificação. Para estes testes utilizamos os mesmos volumes de reagentes de uma reação normal (Tabela 3.4), entretanto as amostras utilizadas foram de séries de cDNA gerados de RNA diluídos (como previamente descrito no tópico 3.3.4), e uma amostra de DNA genômico (cerca de 50ng/ul).

As condições de termociclagem das reações foram: 95°C/10 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C/15 seg e 60°C/60 seg. Em seguida, dentro do programa de termociclagem foi feita uma curva de dissociação, para a observação de formação de dímeros ou presença de contaminantes. Esta curva de dissociação segue os seguintes parâmetros: 95°C/15 seg, 60°C/60 seg, mais etapas crescentes de temperatura onde são feitas as leituras de fluorescência (leituras a cada 0,3°C) de 60°C até 95°C. Por esta curva de dissociação podemos observar as temperaturas de desnaturação ( $T_m$ ) do produto de interesse e de ocasionais dímeros. Pelo fato de *SYBR Green* se ligar inespecificamente a qualquer dupla-fita de DNA, a formação de dímeros emite uma fluorescência que pode interferir no sinal. A estratégia então é procurar temperaturas de leitura de fluorescência acima das  $T_m$  do dímero, situação onde estes estão desnaturados e não há mais emissão de fluorescência inespecífica (Giulietti *et al.*, 2001). As  $T_m$  formadas por estes eventuais produtos de interferência são de temperaturas bem inferiores a  $T_m$  dos produtos de interesse. Isso permite temperaturas de leitura para as reações cerca de 2°C a 3°C abaixo da  $T_m$  dos produtos de interesse sem interferir na leitura da fluorescência.

Paralelamente, no mesmo experimento, analisamos a Curva Padrão Relativa das séries de diluições utilizadas, através do programa *StepOne™ Software v2.0* (Applied Biosystems). Este programa fornece automaticamente a reta de regressão linear da curva padrão, os valores da inclinação da reta (*Slope*) e a eficiência de amplificação do par de oligonucleotídeos utilizado no experimento. Todos os pares de oligonucleotídeos apresentaram uma eficiência de amplificação entre 90% a 100%.

Após estes testes iniciamos as reações para análise da expressão gênica. Utilizamos para as reações, placas de 48 poços para o termociclador *StepOne™ Real-Time PCR System* ou de 96 poços para o *ABI Prism 7700*. Para cada cDNA utilizamos três réplicas e as amostras foram submetidas as seguintes condições: 95°C/10 min seguido de 40 ciclos de 95°C/15 seg e 60°C/60 seg, quando ocorre o anelamento, a extensão e é feita a leitura de fluorescência. Ao final dos 40 ciclos, foi feita uma curva de dissociação para ter certeza que não houve interferência de nenhum produto inespecífico na reação.

Para os genes cujos oligonucleotídeos apresentavam dímeros previamente identificados utilizou-se um regime de ciclos igual ao anterior, porém com a adição de uma etapa de leitura por 30 seg, posterior às outras, dentro dos 40 ciclos da reação. A temperatura de leitura varia de acordo com o par de oligonucleotídeos utilizado. As tabelas 3.5 e 3.6 mostram todos os genes estudados em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, respectivamente, seus pares de oligonucleotídeos e suas temperaturas de leitura, quando esta foi utilizada.

### 3.3.8 – Método de cálculo da quantificação relativa

Ao longo da reação, o programa (*StepOne™ Software v2.0*) gera, para cada poço, valores de emissão de fluorescência a cada ciclo. Como a intensidade de fluorescência é proporcional a quantidade de amplificação, temos ao final, um gráfico de várias curvas de amplificação (uma para cada poço) na forma de valores de intensidade de fluorescência a cada ciclo (*Amplification Plot*). Estes valores são selecionados em um único ponto de escolha, chamado  $C_T$  (“*threshold cycle*”). Para chegar a este valor, uma linha de corte é estabelecida (*threshold*) de forma automática pelo programa que representa o limiar de fluorescência da reação. Esta linha passa na fração exponencial das curvas de amplificação. Valores abaixo dessa linha de corte são representados como indeterminados e são excluídos da análise. Os valores dos ciclos aonde a curva de amplificação de cada amostra encontra com a linha do limiar de fluorescência representa o  $C_T$  de cada amostra. Estes valores de  $C_T$  foram importados para uma planilha do programa Microsoft Excel.

Tabela 3.5: Genes e oligonucleotídeos usados para análise quantitativa por PCR em Tempo Real de *Ae. aegypti*. Na tabela constam os genes, nomes e seqüências do pares de oligonucleotídeos correspondente a cada gene (*forward* em cima e *reverse* em baixo) e as temperaturas de leitura utilizadas, quando diferentes da leitura da termociclagem padrão (60°C).

Gene	Nome	Seqüência (5'----3')	Temperatura de leitura
<i>rp49</i>	5aeexpRP	GCTATGACAAGCTTGCCCCCA	81°C
	3aeaquRP1b	TCATCAGCACCTCCAGCTC	
<i>per</i>	5aeexpper3	CGTTGAAAAGTCTCAATCAACCT	---
	3aegyper3	GCTGAGTGAAAGCTTCGCCG	
<i>tim</i>	5aegytim7	ATCGAACAACTTTGGGAGC	---
	3aeexptim3	CGATCCCGTAAACCTGTAG	
<i>cyc</i>	5aegycyc1a	CCGACCAGGAGCTGAAAATG	78°C
	3aeexpcyc1	GACCTAGCAAATCACCCCTGTG	
<i>Clk</i>	5aeexpclk2	ACGCAGCATAGTTCAAATC	---
	3aegyclk2	CATCATCTGCTGCTGGAGTA	
<i>vri</i>	5aevri1	AACGGTTCGCCAATTAACGG	74°C
	3aeexpvri1	AGCAAGGCACTGTGTGCAGG	
<i>Pdp1</i>	5aepdp1	ACAACATGGCGGCCAAGC	80°C
	3aeexppdp1	CTCGGTGCAGGTTTCATGTTCTC	
<i>cry2</i>	5aeexpcry2	ACTTGCCGGTGCTGAAGAACT	77°C
	3aecry2	CGATGATACACTTGCCCGTGCG	

Tabela 3.6: Genes e oligonucleotídeos usados para análise quantitativa por PCR em Tempo Real de *Culex quinquefasciatus*. Na tabela constam os genes, nomes e seqüências do pares de oligonucleotídeos correspondente a cada gene (*forward* em cima e *reverse* em baixo) e as temperaturas de leitura utilizadas, quando diferentes da leitura da termociclagem padrão (60°C).

Gene	Nome	Seqüência (5'----3')	Temperatura de leitura
<i>rp49</i>	5cxexprp1	CGATATGACAAACTTGCACCAA	82°C
	3cxrp1	TTGAAGCCGTTCCGGGAGCAT	
<i>per</i>	5cxexpper1	CGCTCAAGAATGTCAACCAGCC	---
	3cxper1	ACTTGCCGAGAGGCCCTC	
<i>tim</i>	5cxexptim1	GTCCCTTATCATTGCATTCTG	---
	3cxtim1	GGTGGAAATCCCAGCTTGTG	
<i>cyc</i>	5cxcyc1	ATGGCAGAGAAATACAACGAATG	79°C
	3cxexpcyc1	GGTCCGGACTGCTCTCAGC	
<i>Clk</i>	5cxClk1	GGCACCCGTACAACACCTACCA	---
	3cxexpClk1	AAGCGCATTCCGGGATTTCGA	
<i>vri</i>	5cpexpvri01	CTCCAACAGTATGCCTGCACAC	79°C
	3cpvri01	GCCGTTATAGTCTCGTCGCC	
<i>Pdp1</i>	5cppdp02	AGAGCAACATGGCGGCCAA	79°C
	3cpexppdp01	GGTGCAGGTTCAAGTTCTCT	
<i>cry2</i>	5cpcry2d	GTGGATGTGGCTGTCGTGTTCCG	---
	3cpexpcry2d	GGATGTAACGGGTTGAAAGTTCTT	

Os valores de  $C_T$  das réplicas de cada amostra foram transformados em valores médios. As réplicas que apresentaram valores muito fora (*outliers*) dos valores críticos de *Grubbs* eram excluídos da análise (Sokal & Rohlf, 1995). Os valores médios de  $C_T$  de cada amostra eram subtraídos do  $C_T$  mínimo entre as 12 amostras da série, promovendo uma normalização destes valores.

Os valores normalizados foram utilizados no cálculo da quantificação relativa. O método utilizado para a quantificação foi o “Método do  $C_T$  Comparativo” (*Comparative  $C_T$  Method*; Método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) (Livak & Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001). A validação para a utilização deste método foi feita a partir de análises prévias de Curvas Padrão Relativas conforme previamente descrito (tópico 3.3.7). O normalizador endógeno utilizado foi o gene *rp49* respectivo para cada espécie de mosquito. As etapas de cálculo foram feitas de acordo com Manuais da Applied Biosystems (Applied Biosystems 1997, 2004) disponíveis na internet (<http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/04371095.pdf> e <http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/043303859.pdf>).

Ao final foi feita uma curva de expressão para cada gene, pela média entre as curvas normalizadas das séries de 12 amostras. O gráfico representa a abundância relativa do gene de interesse em um período de 24 horas. A significância da variação temporal na expressão foi testada através de análise de variância (ANOVA) (Sokal & Rohlf, 1995) utilizando os valores de  $\Delta C_T$  calculados a partir de valores de  $C_T$  previamente normalizados pelo valor mínimo de cada gene em cada série de amostras. No caso dos experimentos com apenas duas réplicas, os pontos de horários próximos (ZT 1 e ZT 3, ZT 5 e ZT 7, etc.) foram agrupados antes da análise estatística. Para comparar a abundância relativa nos níveis de expressão entre as duas espécies foi utilizado o teste *t* de *Student* e o ranking dos valores de  $\Delta C_T$  de cada série de amostras (Sokal & Rohlf, 1995).

## 4 – Resultados

Os resultados desta tese estão apresentados em quatro capítulos. O primeiro apresenta um artigo científico, publicado na *Journal of Biological Rhythms* em 2009, que inclui os resultados da análise da expressão circadiana em ciclos de claro-escuro e escuro constante dos genes *vrille*, *Pdp1* e *cry2* de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. Estes resultados complementam os dados obtidos com outros genes em nosso laboratório (Gentile, 2007) e foram, por isso, publicados em um único artigo. O Capítulo 2 apresenta um estudo comparativo dos ritmos de atividade locomotora das duas espécies em ciclos de temperatura combinado a ciclos de claro-escuro e luz/escuro constantes. O Capítulo 3 complementa o estudo do comportamento com uma análise da expressão circadiana dos genes do relógio de duas espécies em ciclos de temperatura. Finalmente, o Capítulo 4 apresenta algumas análises complementares da expressão circadiana em *Aedes aegypti* em diferentes condições.

4.1 Capítulo 1: Análise da atividade locomotora e da expressão dos genes do relógio circadiana de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em ciclos de claro escuro e escuro constante.

4.1.1. Artigo: Gentile C, **Rivas GB**, Meireles-Filho AC, Lima JB, Peixoto AA (2009) *Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: cry2 is different. Journal of Biological Rhythms. 24:444-51.*

Esse artigo científico foi publicado na Journal of Biological Rhythms em 2009 e descreve uma análise comparativa dos padrões de atividade locomotora e da expressão circadiana, em ciclos de claro-escuro e escuro constante, de 8 genes do relógio em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. Minha participação neste trabalho inclui o experimento com a atividade locomotora de *Cx. quinquefasciatus*, a análise da expressão de *vriille*, *Pdp1* e *cry2*, e o modelo proposto para a regulação de *cry2* nas duas espécies. Fiz também uma análise preliminar das regiões regulatórias de *cry2* de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*.

# Circadian Expression of Clock Genes in Two Mosquito Disease Vectors: *cry2* Is Different

Carla Gentile,<sup>\*1</sup> Gustavo B. S. Rivas,<sup>\*</sup> Antonio C. A. Meireles-Filho,<sup>\*2</sup>  
José B. P. Lima,<sup>†</sup> and Alexandre A. Peixoto<sup>\*,3</sup>

<sup>\*</sup>Laboratório de Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz—FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil,

<sup>†</sup>Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz—FIOCRUZ  
& Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro, Brazil

**Abstract** Different mosquito species show a full range of activity patterns, including diurnal, crepuscular, and nocturnal behaviors. Although activity and blood-feeding rhythms are controlled by the circadian clock, it is not yet known whether such species-specific differences in behavior are controlled directly by core clock genes or instead reflect differences in how the information of the central clock is translated into output signals. The authors have analyzed the circadian expression of clock genes in two important mosquito vectors of tropical diseases, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Although these two species show very different locomotor activity patterns and are estimated to have diverged more than 22 million years ago, they show conserved circadian expression patterns for all major cycling clock genes except mammalian-like *cryptochrome2* (*cry2*). The results indicate that different mechanisms for *cry2* regulation may exist for the two species. The authors speculate that the correlation between the differences in behavior between *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* and their corresponding *cry2* mRNA profiles suggests a potential role for this clock gene in controlling species-specific rhythmic behavior. However, further work is needed to establish that this is the case as the different *cry2* expression patterns might reflect differences between the *Aedes* and *Culex* lineages that are not directly related to changes in behavior.

**Key words** circadian rhythms, clock genes, *cry2*, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, mosquitoes, tropical diseases

In the model species *Drosophila melanogaster*, a number of genes have been implicated in the control of circadian rhythms, revealing a mechanism consisting of transcriptional negative feedback loops

that control the cyclic expression of some of its components (Hall, 2003). The two main regulatory loops of the *Drosophila* circadian clock involve the genes *period* (*per*), *timeless* (*tim*), *Clock* (*Clk*), *cycle* (*cyc*), *vriille*

1. Present address: School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary University of London, London, E1 4NS, United Kingdom.

2. Present address: IMP—Research Institute of Molecular Pathology, 1030 Vienna, Austria.

3. To whom all correspondence should be addressed: Alexandre A. Peixoto, Laboratório de Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz—FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos CEP 21045-900, Rio de Janeiro, Brazil; e-mail: apeixoto@fiocruz.br.



(*vri*), and *Par-domain-protein-1* (*Pdp1*) (Hardin, 2005; Zheng and Sehgal, 2008). These regulatory loops of the *Drosophila* clock not only control the circadian expression of its genes but also play a role in determining the abundance of a large number of fluctuating transcripts that are thought to be indicators of both the state of the pacemaker and the different phases of output signals controlling various aspects of the physiology and behavior (e.g., Keegan et al., 2007).

Another important clock gene in *Drosophila* is *cryptochrome* (*cry*), which encodes a photoreceptor with a crucial role in the light-induced resetting mechanism of the circadian pacemaker that allows the synchronization of endogenous rhythms to the environmental cycles (Stanewsky et al., 1998). In addition, this gene has also been implicated in transcriptional repression in peripheral clocks (Collins et al., 2006). Although *Drosophila* and closely related flies have only one *cry* gene, some insects, such as moths and *Anopheles* mosquitoes (Yuan et al., 2007; Zhu et al., 2005), have two types of *cryptochrome*: one, *cry1*, which is orthologous to *Drosophila cry*, and a second, *cry2*, that is more closely related to the mammalian *Cry* genes. On the other hand, some other insects, such as *Apis mellifera*, have only *cry2* (Rubin et al., 2006; Yuan et al., 2007). In contrast to *cry1*, *cry2* is not involved in the light-resetting mechanism but is instead a strong negative circadian transcriptional regulator (Yuan et al., 2007; Zhu et al., 2005).

Despite our considerable knowledge about the *Drosophila* clock, relatively little is known about the molecular and evolutionary genetics of circadian rhythms in insect vectors of disease. Mosquitoes possess a wide range of distinct activity patterns, including diurnal, crepuscular, and nocturnal species (reviewed in Clements, 1999). Although activity and blood-feeding rhythms are controlled by the circadian clock (Clements, 1999; Das and Dimopoulos, 2008), it is as yet unknown whether species-specific differences in behavior are directly controlled by the genes that form the core molecular pacemaker or reflect differences in how the information of the central clock is translated into output signals. To begin addressing this question, we analyzed the circadian expression of clock genes in two mosquito species, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*, both important vectors of tropical diseases but with different activity patterns (Clements, 1999). The results provide interesting insights into the evolution of circadian expression in mosquitoes.

## MATERIALS AND METHODS

### Mosquitoes

All experiments were carried out with female mosquitoes from laboratory colonies of *Ae. aegypti* (Rockefeller strain) and *Cx. quinquefasciatus* (IBEX strain) maintained at IBEX (Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro, Brazil). Mosquitoes were synchronized from pupa stage to 12 h of light and 12 h of dark (LD), and newly emerged females were separated from males while still virgins.

### Behavioral Analysis

Circadian locomotor activity rhythms of *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* females were recorded automatically using a larger version of the *Drosophila* Activity Monitoring (DAM) system (Trikinetics, Waltham, MA) as previously described (Gentile et al., 2006). The activity of 2- to 3-day-old females was monitored for 2 days under LD, followed by 5 days under constant dark (DD) and a further 3 days in LD. The temperature was kept constant at  $25 \pm 0.5$  °C. Only individuals that survived throughout the experiment were taken into consideration for the analysis. The free-running period was determined by autocorrelation analysis using the mean activity data under constant darkness.

### Sample Collection for Gene Expression Analysis

The design and general procedures for the preparation and collection of the 12 time point samples for gene expression analysis followed the same protocol described in Gentile et al. (2006), except that in the current study, each sample corresponds to 10 female heads and sampling was conducted under LD and DD conditions (temperature always constant at  $25 \pm 0.5$  °C). In the latter condition, the mosquitoes were entrained in LD for 3 days before going into constant darkness when the samples were collected. Up to 5 independent groups of 12 time point samples were collected for LD and DD conditions.

### Sample Processing, RNA Extraction, and cDNA Synthesis

For each sample, a group of 10 females was beheaded on a metal plate placed on dry ice, and the



heads were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Total RNA was extracted with 1 mL TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol, followed by purification with lithium chloride 2.5 M. cDNA was synthesized with TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA). Reactions were performed with oligo-dT in a final volume of 20  $\mu\text{L}$ , according to the manufacturer's protocol and temperature conditions of  $25^{\circ}\text{C}$  for 10 min,  $48^{\circ}\text{C}$  for 1 h, and  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min. After synthesis, cDNA was diluted with milli-Q water in a 1:9 proportion.

### Quantitative Real-Time PCR

Quantitative real-time PCRs (qPCRs) were performed in ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems) using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), oligonucleotides at a final concentration of 0.5  $\mu\text{M}$  and 4.0  $\mu\text{L}$  of cDNA, in a final reaction volume of 15  $\mu\text{L}$ . Reactions were performed in 3 replicas for each sample and independently for the genes *tim*, *per*, *Clk*, *cyc*, *vri*, *Pdp1*, *cry1*, *cry2*, and the constitutive control *rp49*. For each of these genes, we designed one pair of oligonucleotides (see supplementary online material on the journal's Web site) with one oligonucleotide spanning an exon-exon boundary to prevent unwanted signal from eventual genomic DNA contaminants in the samples. The sequence of *Ae. aegypti tim* was previously published (Gentile et al., 2006). For the remaining genes, a combination of degenerate primer PCR, cloning, and analysis of available sequences of the two species (www.vectorbase.org) was carried out to obtain their coding sequences and intron positions.

### RESULTS

Figure 1 shows the locomotor activity of *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* females monitored for 2 days under LD, followed by 5 days under constant dark (DD) and a further 3 days under LD. *Ae. aegypti* is mainly active in the photophase, while for *Cx. quinquefasciatus*, activity is largely restricted to the scotophase. In addition, *Ae. aegypti* has a shorter rhythm in constant darkness (period  $\sim 22$  h) than *Cx. quinquefasciatus* (period  $\sim 24$  h). As a result, the activity pattern of *Aedes* seems "jetlagged" in the first light-dark cycle after 5 days of constant darkness, while no such effect is observed in *Cx. quinquefasciatus* (Fig. 1).

As mentioned before, the two main regulatory loops of the *Drosophila* circadian clock involve the genes *per*, *tim*, *Clk*, *cyc*, *vri*, and *Pdp1* (Hardin, 2005; Zheng and Sehgal, 2008). Using a combination of degenerate primer PCR and in silico analysis, we obtained sequences of these 6 clock genes from *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* and used quantitative real-time PCR to compare their circadian expression in light-dark (LD) and constant darkness (DD) (Fig. 2 and Table 1). Overall, the results reveal remarkably conserved expression patterns between the two species in all the genes and in both conditions. Only *tim* seems to present consistent interspecies differences at ZT1/CT1, but these are not significant ( $t = 2.08$ ,  $df = 14$ ,  $p > 0.05$ ).

We next focused on the *cryptochrome* genes. Again we obtained sequences of *cry1* and *cry2* from *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* and used quantitative real-time PCR to compare their circadian expression in light-dark and constant darkness (Fig. 3). In both mosquito species, *cry1* does not cycle. However, *cry2* does and shows interesting differences in the circadian pattern between the two species. In *Cx. quinquefasciatus*, the expression pattern resembles that of *per* with a single peak at ZT17/CT17. *Ae. aegypti*, however, shows a bimodal pattern with much higher relative expression levels during the early morning compared to *Cx. quinquefasciatus*, particularly at ZT1/CT1, and this difference is highly significant ( $t = 4.92$ ,  $df = 14$ ,  $p < 0.001$ ).

### DISCUSSION

In the wild, *Ae. aegypti*, a vector of dengue and yellow fever viruses, is more active during the day, while *Cx. quinquefasciatus*, a vector of filariasis and West Nile fever virus, is a nocturnal mosquito. Behavioral analysis carried out with the strains used in the present study (Fig. 1) confirmed that under controlled laboratory conditions, the two species show similar differences in activity patterns (reviewed in Clements, 1999). Therefore, we analyzed the circadian expression of a number of clock genes in these two mosquito species to verify if they also show differences at the molecular level.

Initially, we looked at the circadian expression of *per*, *tim*, *Clk*, *cyc*, *vri*, and *Pdp1*. The results revealed conserved expression patterns between the two species in all 6 genes (Fig. 2). In mammals, the molecular rhythms of clock gene expression in nocturnal and diurnal



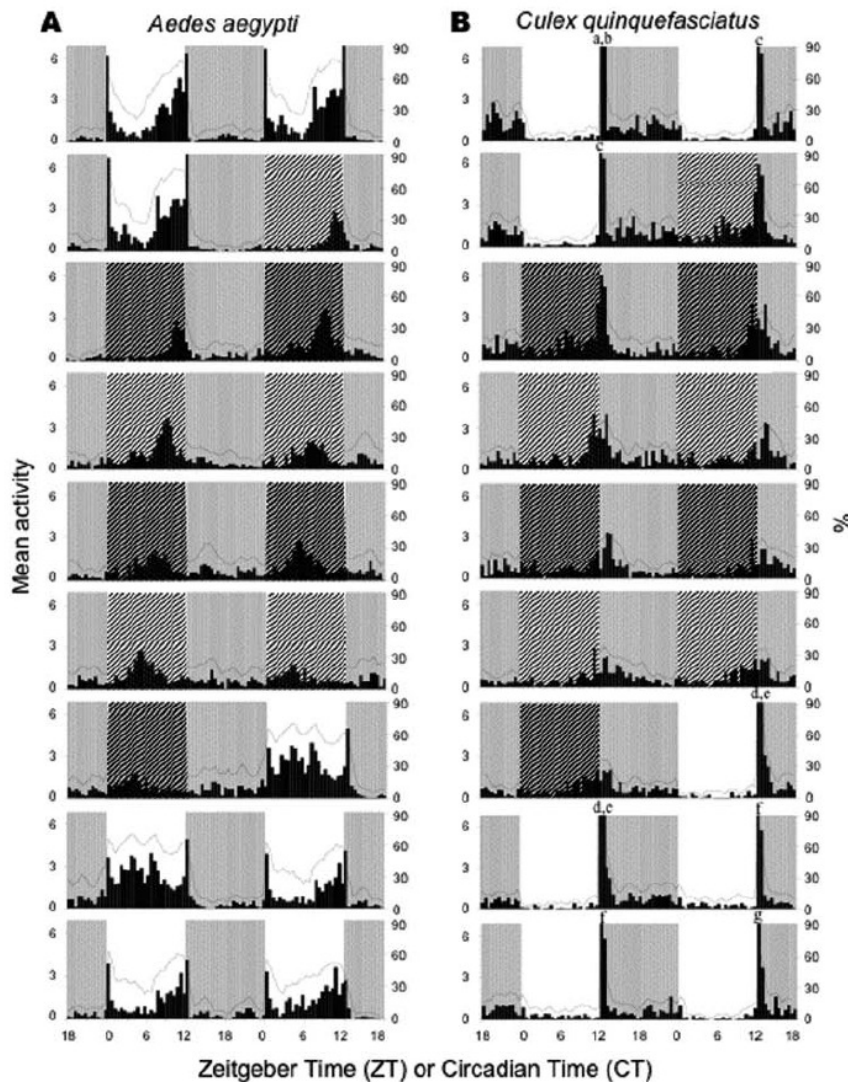


Figure 1. Behavioral analysis. Double-plotted actograms of locomotor activity patterns of (A) *Aedes aegypti* and (B) *Culex quinquefasciatus* entrained under cycles of 12 h of light and 12 h of dark (LD) followed by 5 days under constant darkness (DD) and a further 3 days in LD. In the LD cycle, white and dark backgrounds indicate photophase and scotophase, respectively. In DD, hatched background represents "subjective day" and dark background the "subjective night." Columns depict the geometric mean (mean of Williams) of activity from 32 females in both species (primary y-axis). In *Cx. quinquefasciatus*, some reading time points exceeding the scale are indicated with letters, and their values are as follows: a = 45.5, b = 10.9, c = 43.7, d = 17.3, e = 7.1, f = 14.4, and g = 17.2. Lines depict the percentage of active individuals (3-point moving average; secondary y-axis). The x-axis represents ZT or CT (readings at every 30 min).

species are also conserved in most genes despite the fact that a number of daily biological rhythms show opposite phases with respect to the light-dark cycle (Challet, 2007). Comparisons of insect clocks, however, have revealed important evolutionary changes in the circadian expression patterns of certain genes (Chang

et al., 2003; Meireles-Filho et al., 2006a, 2006b; Rubin et al., 2006; Sandrelli et al., 2008), suggesting that a difference between *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* might be found in other components of the clock. Consequently, we examined the two *cryptochrome* genes.

The *cry* genes have a complex pattern of molecular evolution involving the duplication and loss of genes that seems to have led to the formation of different types of insect clocks (Yuan et al., 2007). This raises interesting questions regarding the possible roles they hold within and downstream of the circadian clock in species with different behavioral/ecological characteristics. *cry1* has been implicated in the control of mating time differences in tephritid fruit flies (An et al., 2004) and in magnetosensitivity in *Drosophila* (Gegear et al., 2008), while *cry2* is probably involved in sun compass orientation in migratory monarch butterflies (Zhu et al., 2008). The *cry* genes, therefore, may represent particularly good candidates for mediating species-specific behavioral differences among insect vectors that are relevant to disease transmission.

Although *cry1* did not show significant changes in mRNA abundance in either species, we have observed striking differences in *cry2* mRNA cycling with a single peak in *Cx. quinquefasciatus* and a bimodal pattern in *Ae. aegypti* (Fig. 3). This indicates that the regulation of *cry2* in the two mosquito species may be



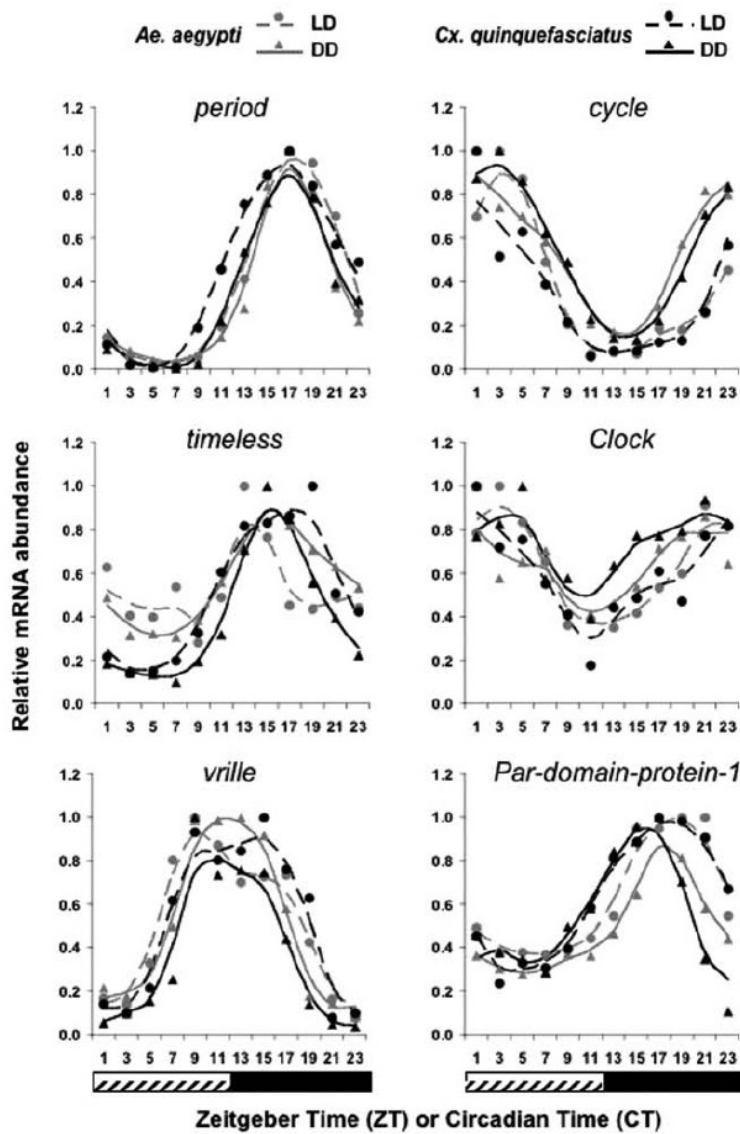


Figure 2. Circadian expression of clock genes in mosquitoes. The graphs show the expression of *period*, *cycle*, *timeless*, *Clock*, *vrille*, and *Par-domain-protein-1* in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* female heads in cycles of 12 h of light and 12 h of dark (LD, dashed lines) and constant darkness (DD, continuous lines) depicted in gray (*Ae. aegypti*) and black (*Cx. quinquefasciatus*). The y-axis indicates the relative mRNA abundance and the x-axis the time points (ZT for LD cycle and CT for DD cycle). Bars below the x-axis indicate the light regime: white = lights on ("day" in LD cycles); hatched = lights off ("subjective day" in DD cycle); black = lights off (night in both LD and DD cycles). These graphs were obtained through averaging data from 3 to 5 independent experiments (see Materials and Methods for details). Dots (LD) and triangles (DD) depict the average value in each time point, and the curves were obtained through a 3-point weighted moving average of these values (weight of 2 for the central time point). Error bars are not shown for clarity. The statistical analysis of the data can be found in Table 1. The temporal variation in the mRNA abundance is significant in all cases except for *Ae. aegypti tim* in LD and *Clk* in LD and DD.

quite different. One possibility is that *Ae. aegypti cry2* expression is controlled by two different circadian response elements, one responsible for the morning peak and the other for the more conserved evening peak (Fig. 4). A similar idea has been proposed to explain the delay of mammalian *Cry1* expression relative to *Per2* (Ueda et al., 2005), although recent evidence suggests that this may not be the case (Fustin et al., 2009).

The insect CRY2 protein, as well as its mammalian orthologs, inhibits the CLK/CYC (or CLK/BMAL) heterodimer by binding to the C-terminal domain of the latter (Shearman et al., 2000; Yuan et al., 2007; Zhu et al., 2005). This domain is lacking in *Drosophila* CYC but is present in a number of other insects, including *Anopheles* mosquitoes (Chang et al., 2003; Meireles-Filho et al., 2006a; Rubin et al., 2006; Sandrelli et al., 2008). We examined the sequences of *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* CYC orthologs, and this activation domain is present in both species (data not shown). In these two species, therefore, CRY2 is also likely to function as a negative transcription factor (Yuan et al., 2007; Zhu et al., 2005) and could directly regulate the activity of CYC and, as a consequence, the expression of the output genes it activates. If this is the case, we speculate that differences in *cry2* mRNA cycling between *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* could be associated with the expression of output genes that might possibly control the differences in activity behavior between these two mosquitoes. In addition, the morning peak seen in *Ae. aegypti cry2* might be related to the proposed role for cytoplasmic CRY2 in the control of output signals in monarch butterflies (Zhu et al., 2008). This would explain why the observed

Table 1. Statistical Analysis of the Circadian Expression of Clock Genes in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* in LD and DD Depicted in Figures 2 and 3

Gene	<i>Ae. aegypti</i>				<i>Cx. quinquefasciatus</i>			
	LD		DD		LD		DD	
	F	P	F	P	F	P	F	P
<i>per</i>	$F_{11,36} = 12.08$	<0.001	$F_{11,48} = 33.36$	<0.001	$F_{11,36} = 161.04$	<0.001	$F_{11,36} = 72.85$	<0.001
<i>tim</i>	$F_{11,24} = 1.90$	NS	$F_{11,48} = 3.17$	0.003	$F_{11,36} = 18.31$	<0.001	$F_{11,36} = 18.44$	<0.001
<i>cyc</i>	$F_{11,36} = 4.76$	<0.001	$F_{11,48} = 15.40$	<0.001	$F_{11,36} = 18.78$	<0.001	$F_{11,36} = 17.56$	<0.001
<i>Clk</i>	$F_{11,36} = 0.64$	NS	$F_{11,36} = 1.10$	NS	$F_{11,36} = 2.60$	0.015	$F_{11,36} = 2.56$	0.017
<i>vri</i>	$F_{11,36} = 10.68$	<0.001	$F_{11,48} = 7.89$	<0.001	$F_{11,36} = 14.14$	<0.001	$F_{11,36} = 28.22$	<0.001
<i>Pdp1</i>	$F_{11,36} = 2.14$	0.043	$F_{11,48} = 4.79$	<0.001	$F_{11,36} = 2.46$	0.021	$F_{11,36} = 3.11$	0.005
<i>cry1</i>	$F_{11,36} = 0.27$	NS	$F_{11,36} = 0.54$	NS	$F_{11,36} = 0.73$	NS	$F_{11,36} = 0.69$	NS
<i>cry2</i>	$F_{11,36} = 2.77$	0.010	$F_{11,36} = 12.56$	<0.001	$F_{11,36} = 9.24$	<0.001	$F_{11,36} = 19.87$	<0.001

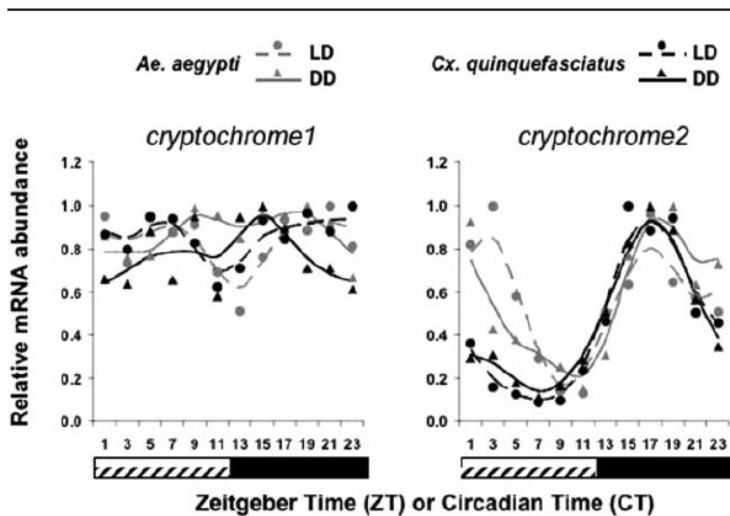


Figure 3. Circadian expression of *cryptochrome1* and *cryptochrome2* in mosquitoes. The graphs show the expression of *cry1* and *cry2* in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* female heads in cycles of 12 h of light and 12 h of dark (LD, dashed lines) and constant darkness (DD, continuous lines) depicted in gray (*Ae. aegypti*) and black (*Cx. quinquefasciatus*). The y-axis indicates the relative mRNA abundance and the x-axis the time points (ZT for LD cycle and CT for DD cycle). Bars below the x-axis indicate the light regime: white = lights on ("day" in LD cycles); hatched = lights off ("subjective day" in DD cycle); black = lights off (night in both LD and DD cycles). These graphs were obtained through averaging data from 4 independent experiments (see Materials and Methods for details). Dots (LD) and triangles (DD) depict the average value in each time point, and the curves were obtained through a 3-point weighted moving average of these values (weight of 2 for the central time point). Error bars are not shown for clarity. The statistical analysis of the data can be found in Table 1. The differences in *cry1* mRNA abundance between time points are not significant, while the temporal variation in *cry2* mRNA is significant in all cases.

morning peak does not affect the expression of other clock genes via feedback loops.

In summary, although *Ae. aegypti* is a diurnal species and *Cx. quinquefasciatus* is nocturnal, and the two probably diverged between 22 and 52 million years ago (Foley et al., 1998), both species show conserved circadian expression patterns in most clock genes in both light-dark and constant dark conditions. These

results show that differences in mosquito behavior (nocturnal vs. diurnal) are not directly correlated with the transcriptional regulation of the main *Drosophila* clock gene orthologs. It is possible that posttranslational modification of clock proteins is what really matters (Zheng and Sehgal, 2008). Nevertheless, we have observed a clear difference in *cry2* expression patterns between the two species. Although it is not yet clearly understood how distinct the mosquito and *Drosophila* molecular pacemakers are, it is tempting to speculate that the differences in *cry2* mRNA cycling between *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* suggest a potential role for this mammalian-like *cryptochrome* in the control of mosquito activity patterns. However, because our analysis involved the comparison of only two mosquito species belonging to different genera, it does not allow us to state that the divergence in *cry2* circadian regulation is linked to the activity patterns as it might be the result of gene expression differences between the *Aedes* and *Culex* lineages that are not directly related

to changes in behavior. Future work comparing *cry2* expression in other pairs of diurnal and nocturnal mosquitoes (e.g., diurnal *Culex* X nocturnal *Aedes* species) might help determine whether the differences we observed at the molecular level are indeed associated with the differences in activity behavior or simply reflect divergence in other aspects of the circadian clock of *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*.



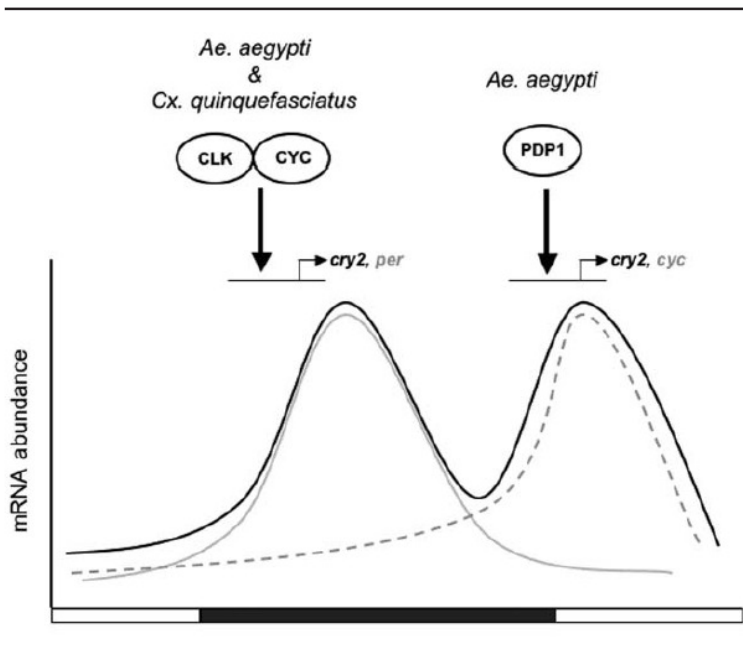


Figure 4. Model of the regulation of *cry2* circadian expression in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. During the late afternoon/early evening, *cry2* is activated by the CLK/CYC heterodimer and later repressed by PER and/or CRY2, as is *per* (and other genes with E-boxes such as *tim*, *vri*, and *Pdp1* not shown in the figure). This would explain the peak in their mRNA abundances (*cry2* in black and *per* in gray continuous lines) during the early/middle of the night. Consistent with that is the finding of putative E-box sequences (Darlington et al., 2000; Kyriacou and Rosato, 2000) in the first intron of the *Ae. aegypti cry2* gene and in the orthologous intron of *Cx. quinquefasciatus cry2* (www.vectorbase.org; data not shown). The first intron has also been shown to be important in the regulation of *Drosophila* and mammalian *cry* genes (Ueda et al., 2005; Zheng et al., 2008). At the end of the night/early morning, *Ae. aegypti cry2* expression is activated again and subsequently repressed by the same factors (possibly PDP1 and VRI, respectively) responsible for the cyclic expression of *cycle* (gray dashed line) and *Clock* (not shown in the figure), causing a second peak at approximately the same time as is observed in these two genes. Consistent with this is the finding of putative V/P binding sites (Cyran et al., 2003) upstream of *Ae. aegypti cry2*. These binding sites were not found upstream of *Cx. quinquefasciatus cry2*, but they are also present in the *cyc* upstream sequences of both species (www.vectorbase.org; data not shown). The two peaks of *cry2* mRNA abundance in *Ae. aegypti* might be occurring in the same cells or in different tissues. As we have analyzed mRNA expression in heads, we cannot yet distinguish between the two possibilities.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Rudi Costa, Julian Gray, Bambos Kyriacou, Ralf Stanewsky, and 3 anonymous referees for comments on earlier versions of the manuscript. This work was funded by the Howard Hughes Medical Institute with additional funds from Guggenheim Foundation, CNPq, FAPERJ, and FIOCRUZ.

#### NOTE

Supplementary online material is available from the journal's Web site: <http://jbr.sagepub.com/supplemental>.

#### REFERENCES

- An X, Tebo M, Song S, Frommer M, and Raphael KA (2004) The *cryptochrome* (*cry*) gene and a mating isolation mechanism in tephritid fruit flies. *Genetics* 168:2025-2036.
- Challet E (2007) Minireview: Entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology* 148:5648-5655.
- Chang DC, McWatters HG, Williams JA, Gotter AL, Levine JD, and Reppert SM (2003) Constructing a feedback loop with circadian clock molecules from the silkworm, *Antheraea pernyi*. *J Biol Chem* 278:38149-38158.
- Clements AN (1999) *The Biology of Mosquitoes: Vol. 2. Sensory Reception and Behaviour*. New York: CABI Publishing.
- Collins B, Mazzoni EO, Stanewsky R, and Blau J (2006) *Drosophila* CRYPTOCHROME is a circadian transcriptional repressor. *Curr Biol* 16:441-449.
- Cyran SA, Buchsbaum AM, Reddy KL, Lin MC, Glossop NR, Hardin PE, Young MW, Storti RV, and Blau J (2003) *vri*, *Pdp1*, and *dClock* form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 112:329-341.
- Darlington TK, Lyons LC, Hardin PE, and Kay SA (2000) The *period* E-box is sufficient to drive circadian oscillation of transcription in vivo. *J Biol Rhythms* 15:462-471.
- Das S and Dimopoulos G (2008) Molecular analysis of photic inhibition of blood-feeding in *Anopheles gambiae*. *BMC Physiol* 8:23.
- Foley DH, Bryan JH, Yeates D, and Saul A (1998) Evolution and systematics of *Anopheles*: Insights from a molecular phylogeny of Australasian mosquitoes. *Mol Phylogenet Evol* 9:262-275.
- Fustin JM, O'Neill JS, Hastings MH, Hazlerigg DG, and Dardente H (2009) Cry1 circadian phase in vitro: Wrapped up with an E-box. *J Biol Rhythms* 24:16-24.
- Gegeer RJ, Casselman A, Waddell S, and Reppert SM (2008) Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in *Drosophila*. *Nature* 454:1014-1018.
- Gentile C, Meireles-Filho AC, Britto C, Lima JB, Valle D, and Peixoto AA (2006) Cloning and daily expression of the *timeless* gene in *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *Insect Biochem Mol Biol* 36:878-884.
- Hall JC (2003) Genetics and molecular biology of rhythms in *Drosophila* and other insects. *Adv Genet* 48:1-280.
- Hardin PE (2005) The circadian timekeeping system of *Drosophila*. *Curr Biol* 15:R714-R722.

- Keegan KP, Pradhan S, Wang JP, and Allada R (2007) Meta-analysis of *Drosophila* circadian microarray studies identifies a novel set of rhythmically expressed genes. *PLoS Comput Biol* 3:e208.
- Kyriacou CP and Rosato E (2000) Squaring up the E-box. *J Biol Rhythms* 15:483-490.
- Meireles-Filho AC, Amoretty PR, Souza NA, Kyriacou CP, and Peixoto AA (2006a) Rhythmic expression of the *cycle* gene in a hematophagous insect vector. *BMC Mol Biol* 7:38.
- Meireles-Filho AC, da S Rivas GB, Gesto JS, Machado RC, Britto C, de Souza NA, and Peixoto AA (2006b) The biological clock of an hematophagous insect: Locomotor activity rhythms, circadian expression and downregulation after a blood meal. *FEBS Lett* 580:2-8.
- Rubin EB, 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.
- Sandrelli F, Costa R, Kyriacou CP, and Rosato E (2008) Comparative analysis of circadian clock genes in insects. *Insect Mol Biol* 17:447-463.
- Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume K, Lee CC, van der Horst GT, Hastings MH, et al. (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288:1013-1019.
- Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, Kay SA, Rosbash M, and Hall JC (1998) The *cryb* mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95:681-692.
- Ueda HR, Hayashi S, Chen W, Sano M, Machida M, Shigeyoshi Y, Iino M, and Hashimoto S (2005) System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat Genet* 37:187-192.
- Yuan Q, Metterville D, Briscoe AD, and Reppert SM (2007) Insect cryptochromes: Gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *Mol Biol Evol* 24:948-955.
- Zheng H, Ng F, Liu Y, and Hardin PE (2008) Spatial and circadian regulation of *cry* in *Drosophila*. *J Biol Rhythms* 23:283-295.
- Zheng X and Sehgal A (2008) Probing the relative importance of molecular oscillations in the circadian clock. *Genetics* 178:1147-1155.
- Zhu H, Sauman I, Yuan Q, Casselman A, Emery-Le M, Emery P, and Reppert SM (2008) Cryptochromes define a novel circadian clock mechanism in monarch butterflies that may underlie sun compass navigation. *PLoS Biol* 6:e4.
- 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.

## 4.2. Capítulo 2: Análise da atividade locomotora de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em ciclos de temperatura.

Neste capítulo estudamos a atividade locomotora de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em ciclos de temperatura. Para tal foram feitos quatro grandes experimentos em diversas condições de fotoperíodo com a presença ou não dos ciclos de temperatura. As condições e duração dos experimentos encontram-se descritos na tabela 3.1 na seção Material e Métodos, enquanto os gráficos de cada um dos quatro experimentos completos estão apresentados no Anexo da Tese. Contudo, a apresentação e interpretação dos dados foram feitas analisando individualmente cada regime utilizado ou comparando dois ou mais regimes entre si.

### 4.2.1 – Atividade em ciclos de claro-escuro com ou sem ciclos de temperatura

As Figuras 4.1A e 4.1B mostram respectivamente a atividade locomotora de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* durante três dias em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro à temperatura constante de 25°C (LD), seguido de 4 dias em um regime onde o ciclo de claro/escuro é combinado com ciclos de temperatura de 12 horas a 30°C durante a fase clara e 12 horas a 20°C na fase escura (LDTC).

Como observado no Capítulo 1, em LD *Ae. aegypti* apresenta um padrão de atividade diurno com dois picos principais, um localizado no início da fotofase (fase clara), logo após o acender das luzes, e outro na transição claro/escuro, logo após o apagar das luzes. Observa-se também que ao longo da fotofase a atividade de *Ae. aegypti* aumenta gradativamente com a proximidade do “crepúsculo” mostrando uma antecipação a transição claro/escuro. Por outro lado, *Cx. quinquefasciatus* é um mosquito noturno, praticamente não apresentando atividade durante a fase clara.

Quando um ciclo de temperatura é acrescentado ao ciclo de claro-escuro (LDTC), observa-se que, de forma geral, as duas espécies mantêm as aproximadamente os mesmos padrões de atividade (diurno para *Ae. aegypti* e noturno para *Cx. quinquefasciatus*). Contudo, em *Ae. aegypti* se observa uma mudança nos picos de atividade com uma diminuição do pico matutino e um aumento do pico vespertino (Figura 4.1A).



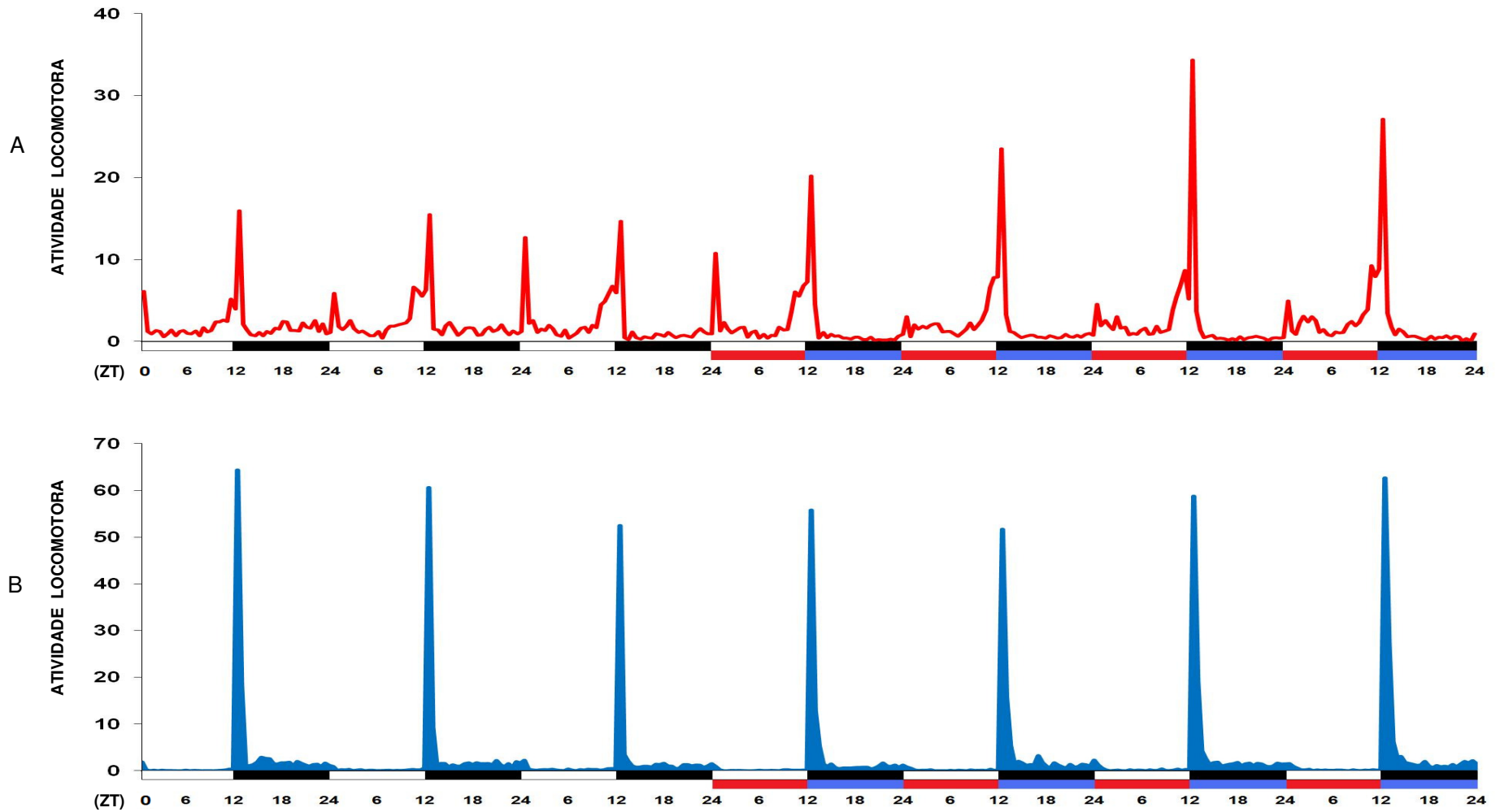


Figura 4.1: Atividade locomotora de *Ae aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em três dias de LD, seguidos de mais quatro dias em LDTC. A) *Ae aegypti* (linha vermelha; n=50). B) *Cx. quinquefasciatus* (área azul; n=59). Barras horizontais: brancas (fotofase), pretas (escotofase), vermelhas (termofase) e azuis (criofase). O eixo horizontal consiste do tempo em horas para cada dia de experimento. ZT: *Zeitgeber time* (tempo do ciclo ambiental medido em horas).

#### 4.2.2 – Atividade em escuro constante com ciclos de temperatura.

A figura 4.2 mostra as duas espécies em 12 dias de escuro constante com ciclos de temperatura (DDTC), vindo de um regime de claro-escuro com ciclos de temperatura (LDTC). Após a entrada em DDTC, *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* apresentam respostas bastante distintas. *Cx. quinquefasciatus* mantém aparentemente os mesmos padrões vistos em LDTC, enquanto *Ae. aegypti* apresenta o surgimento de dois picos vespertinos, após o segundo dia de DDTC, onde um deles apresenta uma antecipação a cada dia com um período de 23 horas (cálculo feito através do site <http://www.circadian.org/periodogram.html>). Este pico vai surgindo cada vez mais cedo, até o sexto dia de DDTC, e a partir daí se estabiliza, voltando a apresentar um período de 24 horas (Figura 4.2B). Após este período, *Ae. aegypti* passa a concentrar parte de sua atividade na primeira metade da termofase.

A figura 4.3, mostra as duas espécies por um dia em LD, seguidos de cinco dias em DDTC. Neste caso, ao retirar-se o ciclo de claro-escuro e acrescentar apenas ciclos de temperatura pode-se notar que as duas espécies apresentaram padrões de atividade locomotora em DDTC semelhantes aos vistos anteriormente (LDTC+DDTC) (Figura 4.2), principalmente em relação ao pico vespertino de *Ae. aegypti*, que apresenta essencialmente a mesma antecipação entre os dois experimentos em três dias distintos (Figura 4.4).

#### 4.2.3 – Atividade em claro constante com e sem ciclos de temperatura

Assim como em DDTC, foi observada também a atividade em LLTC vindo de duas condições prévias de LD (Figuras 4.5 e Figuras 7.3B e 7.4 do Anexo). *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, vindo tanto de LD (Figura 4.5A), quanto de LDTC (Figura 4.5B), precisam de apenas um ou dois dias, nestas condições, para começar a apresentar padrões sem diferenças marcantes entre os dois experimentos (Figura 4.5). Nota-se que, em LLTC, *Ae. aegypti* apresenta seu pico em ZT 12.5, no início da transição “quente/frio”, além da maior parte de seus níveis de atividade na termofase, enquanto *Cx. quinquefasciatus*, desloca seu pico até uma hora e meia depois do início da queda de temperatura (ZT 13.5) e apresenta níveis maiores de atividade durante a criofase.

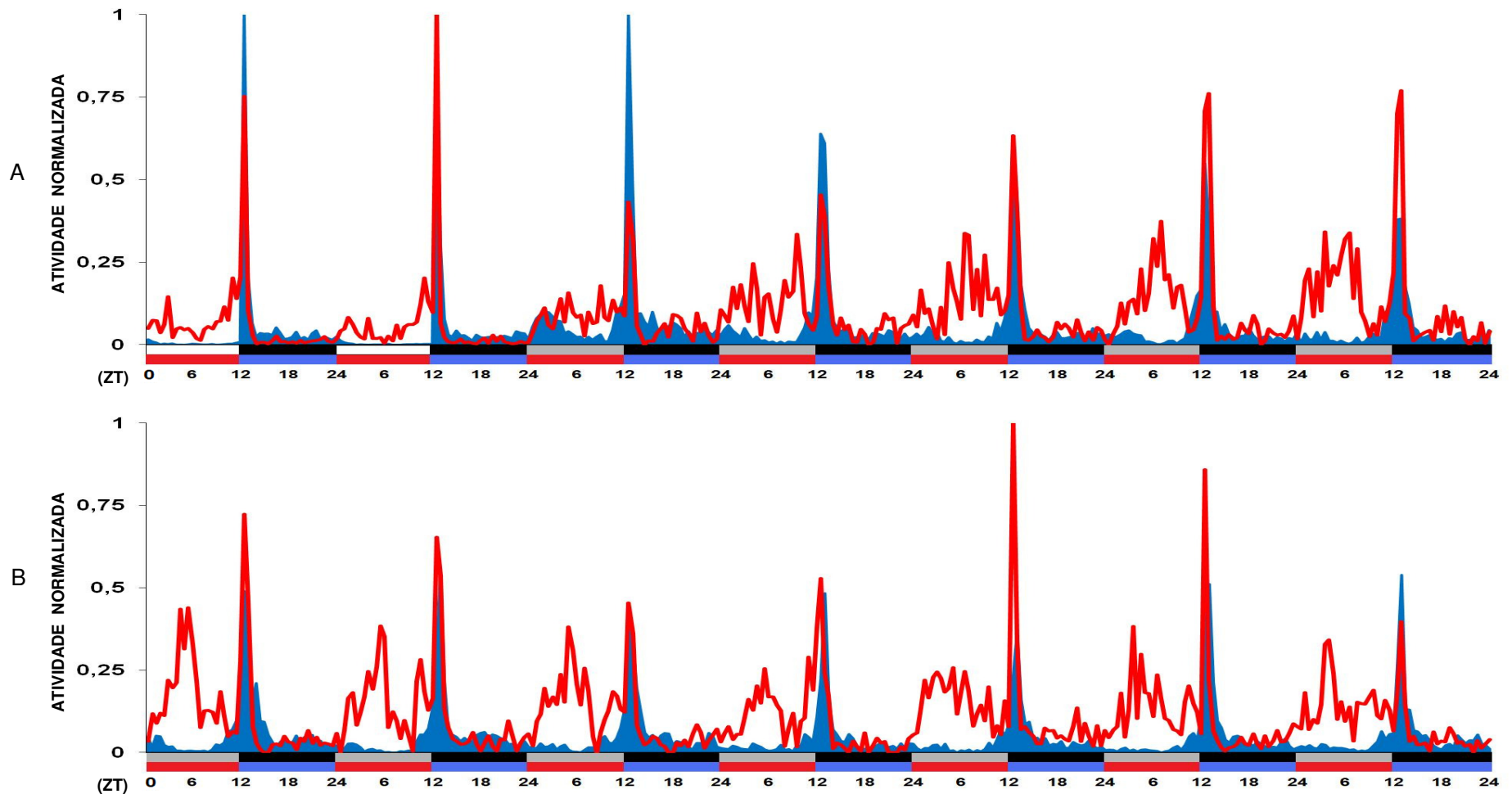


Figura 4.2: Atividade locomotora de *Ae. aegypti* (linha vermelha; n=21) e *Cx. quinquefasciatus* (área azul; n=49) em dois dias de LDTC, seguidos de doze dias em DDTC. A) Dois dias de LDTC, seguidos de cinco dias de DDTC. B) sexto ao décimo segundo dia em DDTC. Barras horizontais: brancas (fotofase), pretas (escotofase), cinzas (fotofase subjetiva ou dia subjetivo), vermelhas (termofase) e azuis (criofase). Os dados de atividade foram normalizados. O eixo horizontal consiste do tempo em horas para cada dia de experimento. ZT: *Zeitgeber time* (tempo do ciclo ambiental medido em horas).

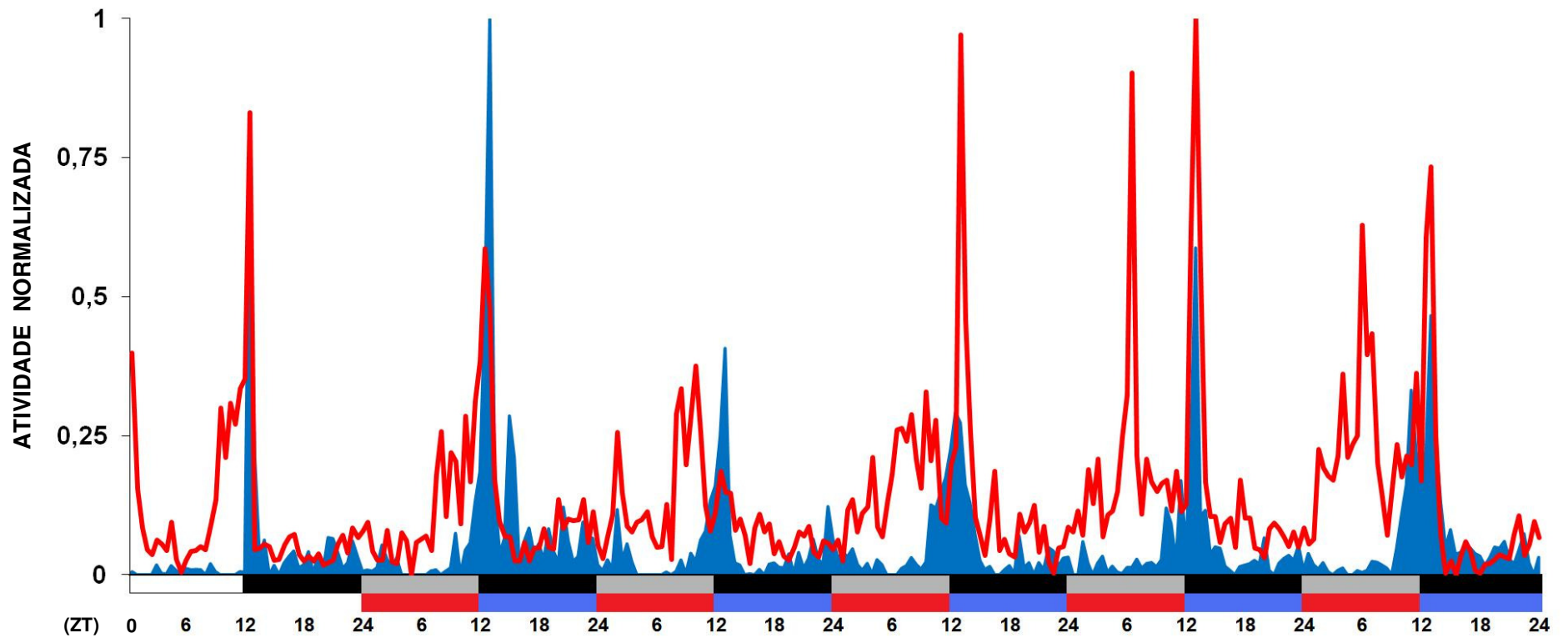


Figura 4.3: Atividade locomotora de *Ae aegypti* (linha vermelha; n=30) e *Cx. quinquefasciatus* (área azul; n=12) em um dia de LD (temperatura constante de 25°C), seguidos de cinco dias em DDTC. Barras horizontais: brancas (fotofase), pretas (escotofase), cinzas (fotofase subjetiva ou dia subjetivo), vermelhas (termofase) e azuis (criofase). Os dados de atividade foram normalizados. O eixo horizontal consiste do tempo em horas para cada dia de experimento. ZT: *Zeitgeber time* (tempo do ciclo ambiental medido em horas).

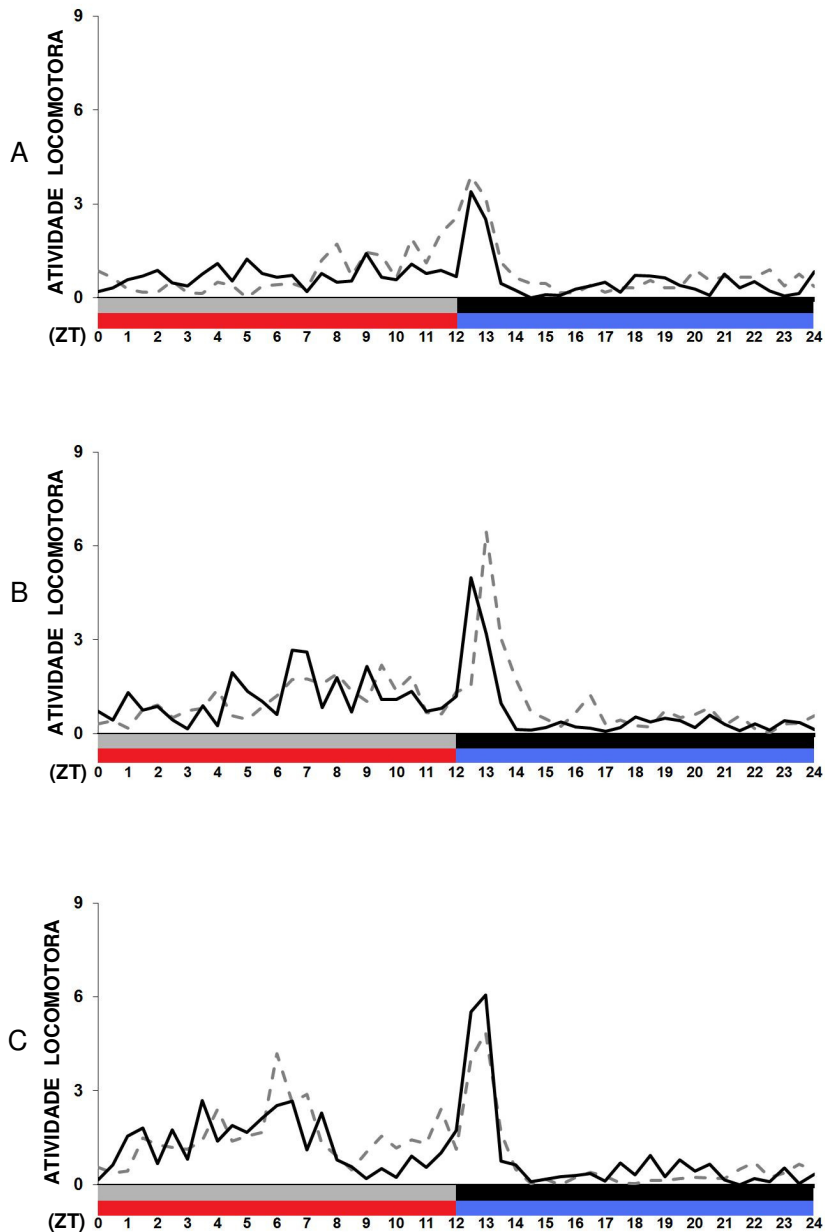


Figura 4.4: Atividade locomotora de *Aedes aegypti* em escuro constante com ciclos de temperatura (DDTC) vindo de duas condições prévias diferentes, analisadas em três dias distintos. Linhas sólidas pretas representam os dados de atividade em DDTC vindo de um regime prévio de LDTC, enquanto as linhas pontilhadas cinzas representam os dados de atividade em DDTC vindo de um regime prévio de LD (25°C constante). A) primeiro dia em DDTC. B) terceiro dia em DDTC. C) quinto dia em DDTC. A variação de fase dos picos vespertinos (ZT 12.5 ou ZT 13) entre os dias de DDTC é resultado de uma variação dos valores dos picos entre os indivíduos que se reflete na média final, mas que não parece representar nenhum padrão circadiano. Barras horizontais: cinzas (fotofase subjetiva ou dia subjetivo), pretas (escotofase), vermelhas (termofase) e azuis (criofase). O eixo horizontal consiste do tempo em horas para cada dia de experimento. ZT: *Zeitgeber time* (tempo do ciclo ambiental medido em horas).

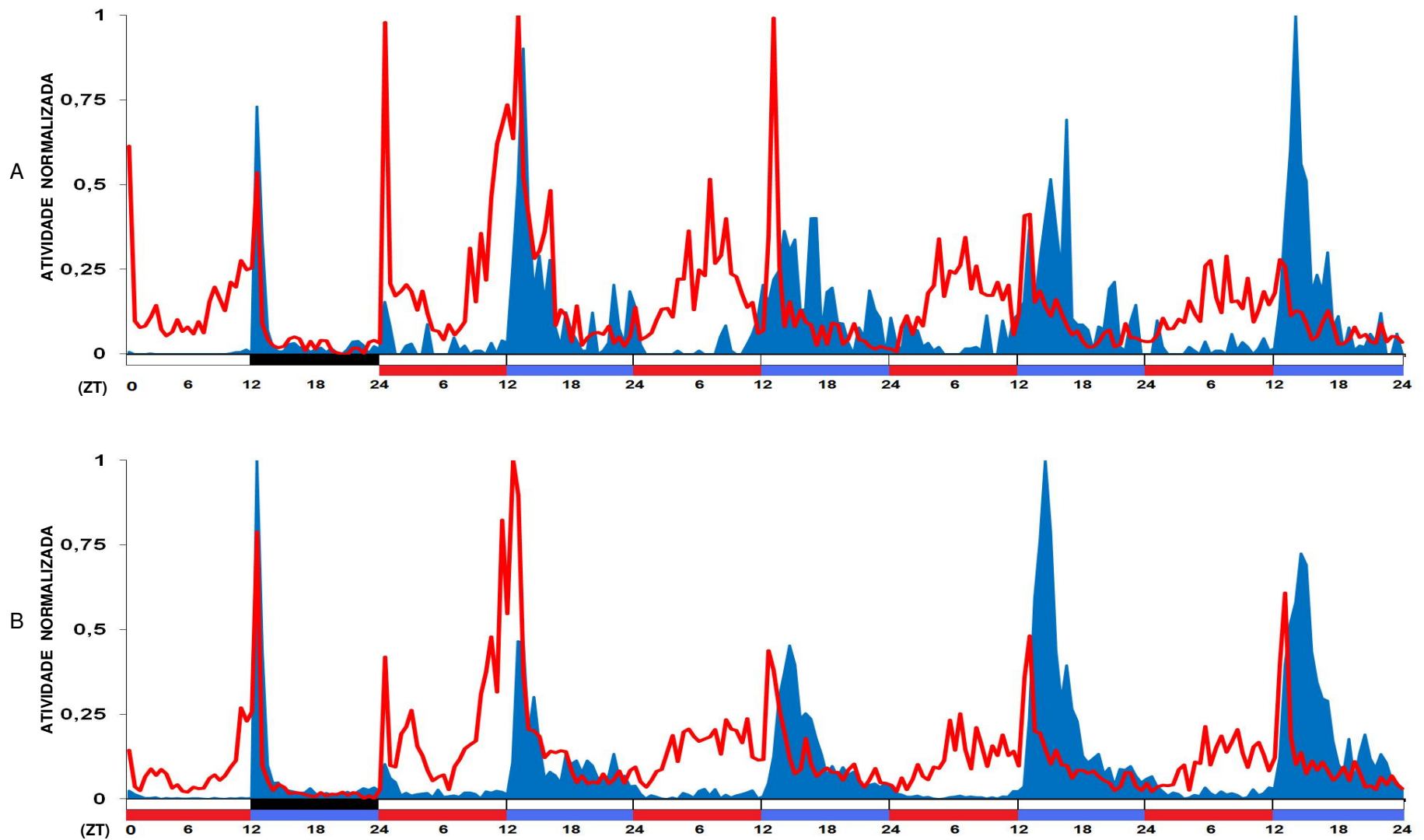


Figura 4.5: Atividade locomotora de *Ae aegypti* (linha vermelha) e *Cx. quinquefasciatus* (área azul) em LLTC vindo de duas condições prévias de claro-escuro. A) Um dia de LD, seguidos de quatro dias de LLTC. *Ae aegypti* (n=30) e *Cx. quinquefasciatus* (n=12). B) Um dia de LDTC seguidos de quatro dias de LLTC. *Ae aegypti* (n=50) e *Cx. quinquefasciatus* (n=59). Barras horizontais: brancas (fotofase), pretas (escotofase), vermelhas (termofase) e azuis (criofase). Os dados de atividade foram normalizados. O eixo horizontal consiste do tempo em horas para cada dia de experimento. ZT: *Zeitgeber time* (tempo do ciclo ambiental medido em horas).

Em outro experimento em claro constante, foram retirados os ciclos de temperatura, após três dias nestas condições. Como pode ser observado, a partir do momento em que as condições de temperatura tornaram-se constantes, *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* apresentaram padrões de atividade locomotora aparentemente arrítmicos (Figura 4.6).

#### 4.2.4 – Atividade em regimes de claro-escuro “invertidos” em relação aos ciclos de temperatura

A Figura 4.7A mostra a atividade das duas espécies de mosquitos em ciclos de claro-escuro “invertidos” (em anti-fase), em relação aos ciclos de temperatura. Neste regime, a fotofase coincide com a criofase (claro à 20°C) e a escotofase com a termofase (escuro à 30°C). Observa-se que *Ae. aegypti* apresenta um padrão de atividade com dois picos: um menor em ZT 0.5, e, outro de valor maior, em ZT 12.5, ambos muito próximos das transições de luz e temperatura. Já *Cx. quinquefasciatus*, também apresenta dois picos, porém o pico maior encontra-se em ZT 0.5, logo após a transição fotofase/escotofase e o pico menor em ZT 12.5. Este pico menor é quase imperceptível (Figura 4.7B), entretanto apresenta valores mais altos nos primeiros dois dias de DLTC (Figura 7.4B; ver Anexo). Observando a atividade fora dos valores dos picos principais (Figura 4.7B), nota-se que *Ae. aegypti* apresenta um padrão intermediário de atividade entre a fotofase fria (58,78% da atividade total) e a escotofase quente (41,21% da atividade total), enquanto *Cx. quinquefasciatus* apresenta grande parte de sua atividade na escotofase quente (88,42% da atividade total).

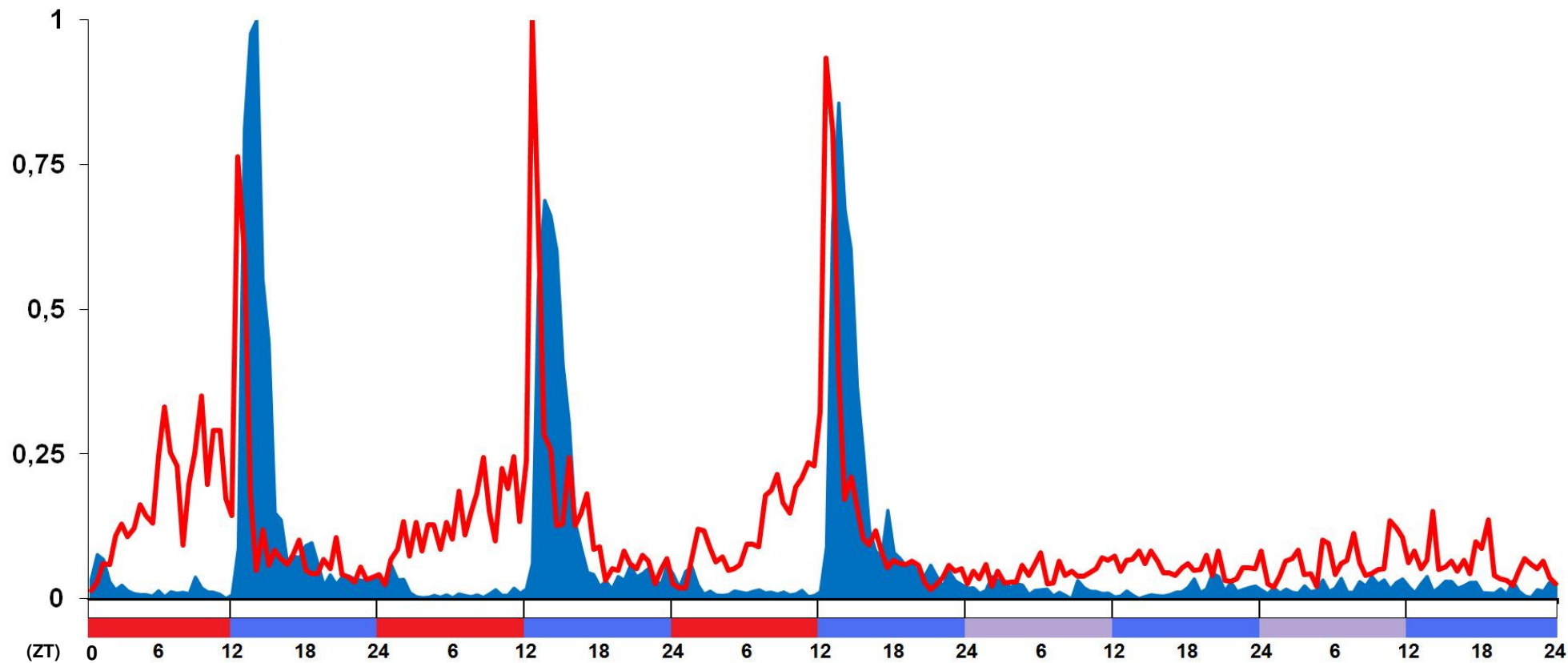


Figura 4.6: Atividade locomotora de *Ae. aegypti* (linha vermelha; n=51) e *Cx. quinquefasciatus* (área azul; n=52) em três dias de LLTC seguidos de dois dias de LL (temperatura constante de 20°C). Barras horizontais: brancas (fotofase), vermelhas (termofase) e azuis (criofase) e lilás (termofase subjetiva). Os dados de atividade foram normalizados. O eixo horizontal consiste do tempo em horas para cada dia de experimento. ZT: *Zeitgeber time* (tempo do ciclo ambiental medido em horas).



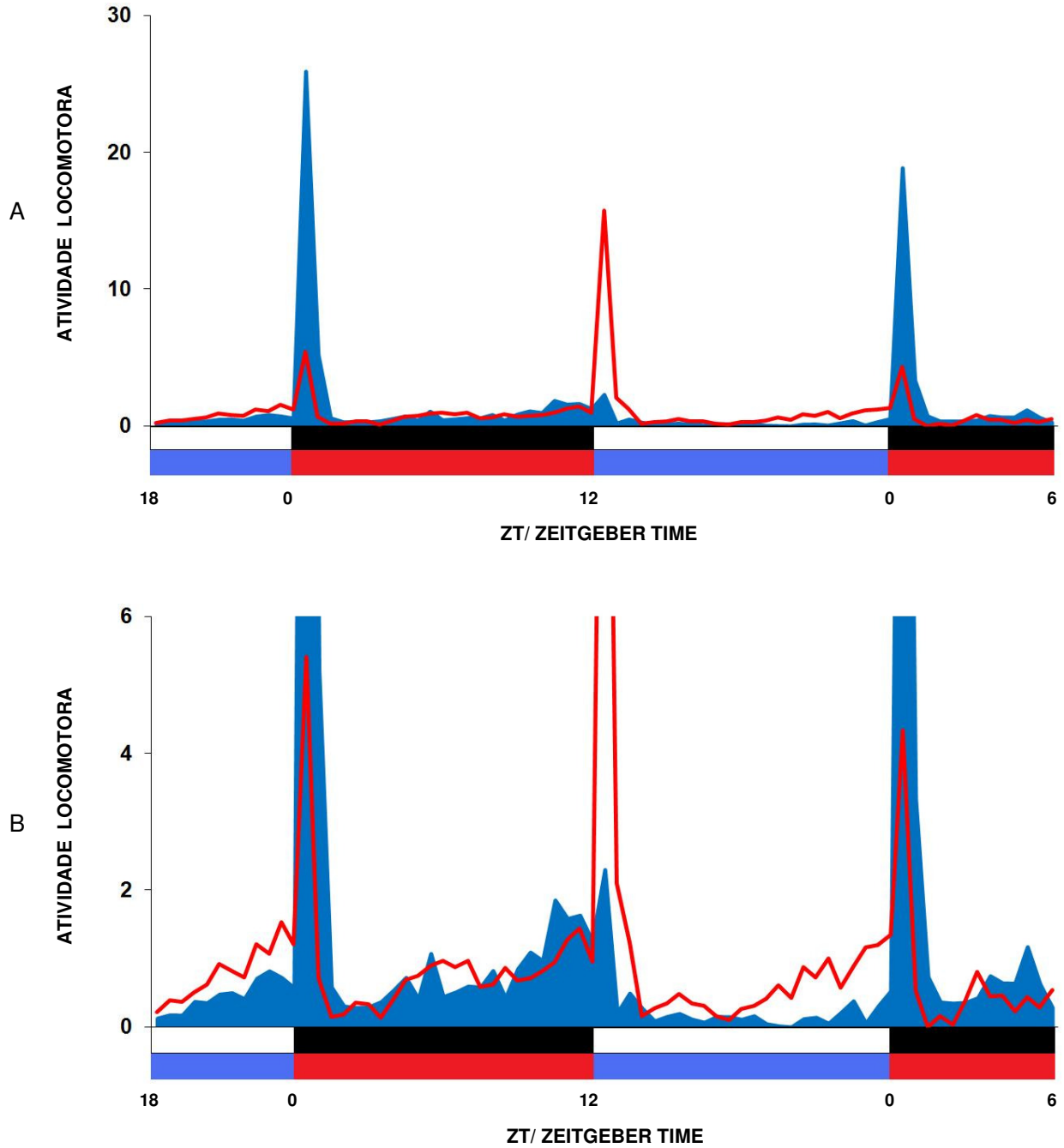


Figura 4.7: Atividade locomotora de *Aedes aegypti* (linhas vermelhas; n=50) e de *Culex quinquefasciatus* (área azul; n=59) em um regime de escuro/claro com ciclos de temperatura (DLTC). A) Gráfico destacando o terceiro dia em DLTC. B) Gráfico com os mesmos valores, porém com a escala do eixo vertical reduzida, para destacar a atividade locomotora em outros pontos fora dos picos principais. Valores dos picos: a=25,91 b=15,71 c=18,87. Barras horizontais: brancas (fotofase), pretas (escotofase), vermelhas (termofase) e azuis (criofase). O eixo horizontal consiste do tempo em horas para cada dia de experimento. ZT: *Zeitgeber time* (tempo do ciclo ambiental medido em horas).

### 4.3. Capítulo 3: Análise comparativa da expressão circadiana dos genes do relógio de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em ciclos de temperatura.

#### 4.3.1 – Análise da expressão em claro constante com ciclos de temperatura

A Figura 4.8 apresenta as curvas de expressão circadiana de sete genes do relógio em claro constante com ciclos de temperatura, para as duas espécies de mosquitos. A Tabela 4.1 mostra os resultados da ANOVA realizados para verificar se há significância estatística na variação temporal da abundância do mRNA de cada gene. Nota-se que *Ae. aegypti* apresenta ritmicidade com valores significativos para quase todos os genes exceto *Clk* e *Pdp1*. Já no caso de *Cx. quinquefasciatus*, apenas *per*, *tim* e *cry2* oscilam significativamente (Tabela 4.1 e Figura 4.8). Dentre os genes que apresentaram abundância rítmica, nota-se que *per* e *tim* apresentam curvas semelhantes entre as espécies (Figuras 4.8A e 4.8B, respectivamente). Para *cry2*, observa-se que as curvas de expressão são similares, com um pico em ZT 15 (Figura 4.8G), porém os dois últimos ZTs apresentam diferenças com valores significativos entre as espécies ( $t = 2.324$ ,  $gl = 14$ ,  $p = 0.036$ ). No caso de *cyc*, este gene é rítmico em LLTC apenas em *Ae. aegypti* e não em *Cx. quinquefasciatus* (Figura 4.8D e Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Análise de variância (ANOVA) da expressão circadiana de genes de relógio de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em LLTC.

Gene	<i>Aedes aegypti</i>		<i>Culex quinquefasciatus</i>	
	LLTC		LLTC	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>per</i>	$F_{11,36}=31.598$	<0.001	$F_{11,36}=13.409$	<0.001
<i>tim</i>	$F_{11,36}=6.194$	<0.001	$F_{11,36}=2.538$	0.017
<i>Clk</i>	$F_{11,36}=0.508$	NS	$F_{11,36}=1.459$	NS
<i>cyc</i>	$F_{11,36}=13.158$	<0.001	$F_{11,36}=0.839$	NS
<i>vri</i>	$F_{11,36}=2.885$	0.008	$F_{11,36}=1.586$	NS
<i>Pdp1</i>	$F_{11,36}=1.302$	NS	$F_{11,36}=1.194$	NS
<i>cry2</i>	$F_{11,36}=3.095$	0.005	$F_{11,36}=2.133$	0.043

NS=não significativo

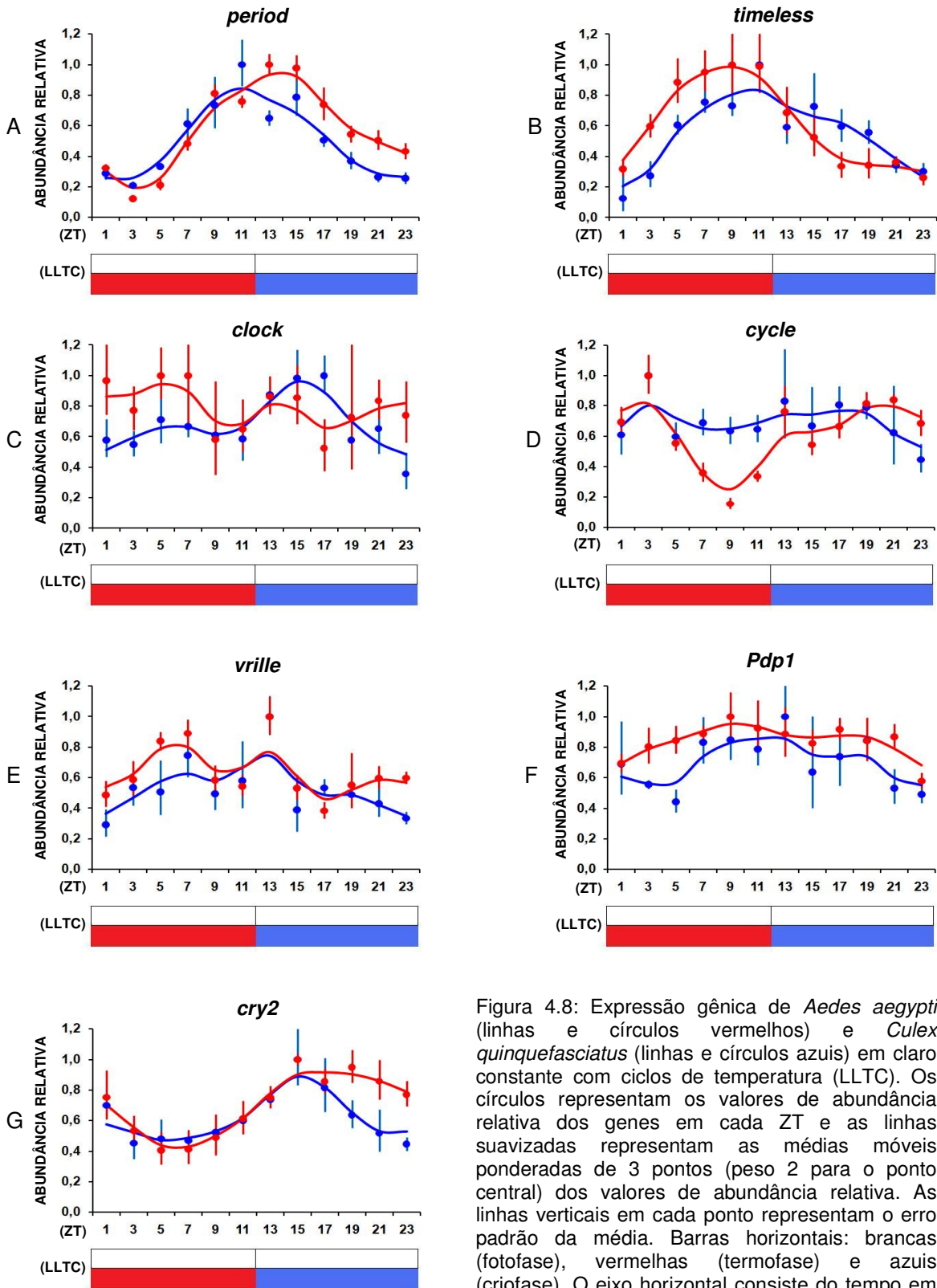


Figura 4.8: Expressão gênica de *Aedes aegypti* (linhas e círculos vermelhos) e *Culex quinquefasciatus* (linhas e círculos azuis) em claro constante com ciclos de temperatura (LLTC). Os círculos representam os valores de abundância relativa dos genes em cada ZT e as linhas suavizadas representam as médias móveis ponderadas de 3 pontos (peso 2 para o ponto central) dos valores de abundância relativa. As linhas verticais em cada ponto representam o erro padrão da média. Barras horizontais: brancas (fotofase), vermelhas (termofase) e azuis (criofase). O eixo horizontal consiste do tempo em horas para cada dia de experimento. ZT: *Zeitgeber time* (tempo do ciclo ambiental medido em horas).

#### 4.3.2 – Análise da expressão em escuro constante com ciclos de temperatura

Em seguida foi feita a análise da expressão na ausência da luz, apenas com a temperatura atuando como agente oscilador. Apenas três genes (*per*, *cyc* e *cry2*) foram incluídos nesta análise. Em DDTC, os três apresentaram padrões rítmicos (Figura 4.9 e Tabela 4.2). *per* e *cyc* apresentam picos de abundância em ZT 13 (Figura 4.9A) e ZT 3 (Figura 4.9B), respectivamente, que são semelhantes entre as espécies, embora se observe uma pequena diferença na fase de *cyc*. Em *cry2* (Figura 4.9C), a distinção de padrões entre as espécies parece um pouco mais evidente. Pode ser notado que *cry2* de *Ae. aegypti* apresenta um padrão que sugere bimodalidade com um pico em ZT 19 e um discreto pico em ZT 11. Já *cry2* de *Cx. quinquefasciatus*, apresenta apenas um pico de abundância em ZT 17.

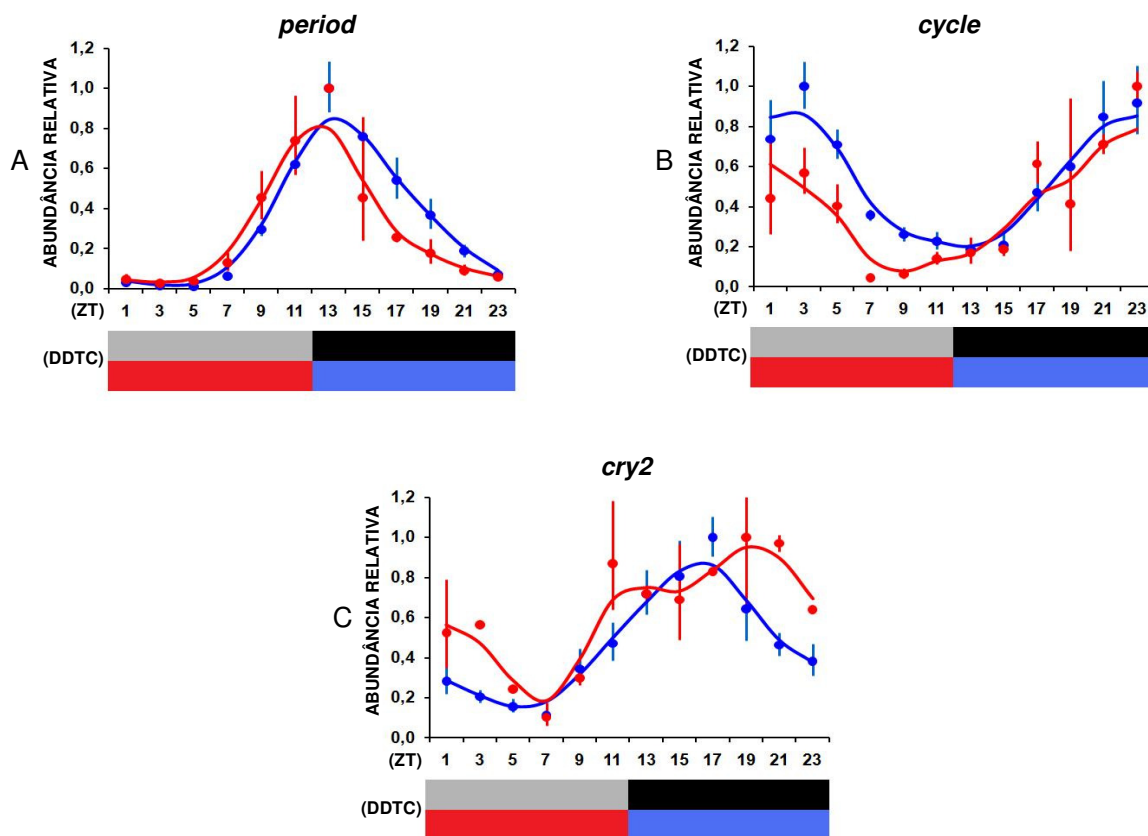


Figura 4.9: Expressão gênica de *Aedes aegypti* (linhas e círculos vermelhos) e *Culex quinquefasciatus* (linhas e círculos azuis) em escuro constante com ciclos de temperatura (DDTC). Os círculos representam os valores de abundância relativa dos genes em cada ZT e as linhas suavizadas representam as médias móveis ponderadas de 3 pontos (peso 2 para o ponto central) dos valores de abundância relativa. As linhas verticais em cada ponto representam o erro padrão da média. Barras horizontais: cinzas (fotofase subjetiva ou dia subjetivo), pretas (escotofase), vermelhas (termofase) e azuis (criofase). O eixo horizontal consiste do tempo em horas para cada dia de experimento. ZT: *Zeitgeber time* (tempo do ciclo ambiental medido em horas).

Esta diferença entre as espécies pode ser o resultado de um adiantamento de fase dos picos em *Ae. aegypti* que não é tão evidente para *Cx. quinquefasciatus* (ver Discussão para mais detalhes).

Tabela 4.2: Análise de variância (ANOVA) expressão circadiana de genes de relógio de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em DDTC.

Gene	<i>Aedes aegypti</i>		<i>Culex quinquefasciatus</i>	
	DDTC		DDTC	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>per</i>	$F_{5,18}=18.399$	<0.001	$F_{11,36}=87.647$	<0.001
<i>cyc</i>	$F_{5,18}=6.285$	0.002	$F_{11,36}=12.826$	<0.001
<i>cry2</i>	$F_{5,18}=7.441$	0.001	$F_{11,36}=10.894$	<0.001

#### 4.4. Capítulo 4: Análise complementar da expressão circadiana em *Aedes aegypti*.

##### 4.4.1 – Análise da expressão circadiana de *Ae. aegypti* em condições constantes.

A Figura 4.10 mostra curvas de expressão de *per*, *cyc* e *cry2* de *Ae. aegypti* em claro constante. Observa-se que a ritmicidade de *per* (Figura 4.10A) e *cry2* (Figura 4.10C) é visivelmente afetada em LL, com níveis de pouquíssima ou nenhuma amplitude (valores não significativos; Tabela 4.3). Entretanto, *cyc* (Figura 4.10B) apresenta oscilação significativa em LL (Tabela 4.3), embora apresente um padrão diferente do observado em LLTC (Figura 4.8D; ver Discussão para mais detalhes).

Foi feita também uma análise em escuro constante (sem ciclos de temperatura), três dias após um regime de LD12:12 (temperatura constante). Nestas condições *per*, *cyc* e *cry2* continuam apresentando padrões rítmicos (Tabela 4.3). Além disso, *per* (Figura 4.11A) e *cry2* (Figura 4.11C) apresentam curvas de expressão unimodais com picos em ZT 15, enquanto *cyc* apresenta um padrão bimodal com picos em ZT 5 e ZT 19 (Figura 4.11B). Estes resultados são, portanto, um pouco diferentes daqueles observados no primeiro dia de DD (Gentile *et al.*, 2009; ver Discussão para mais detalhes).

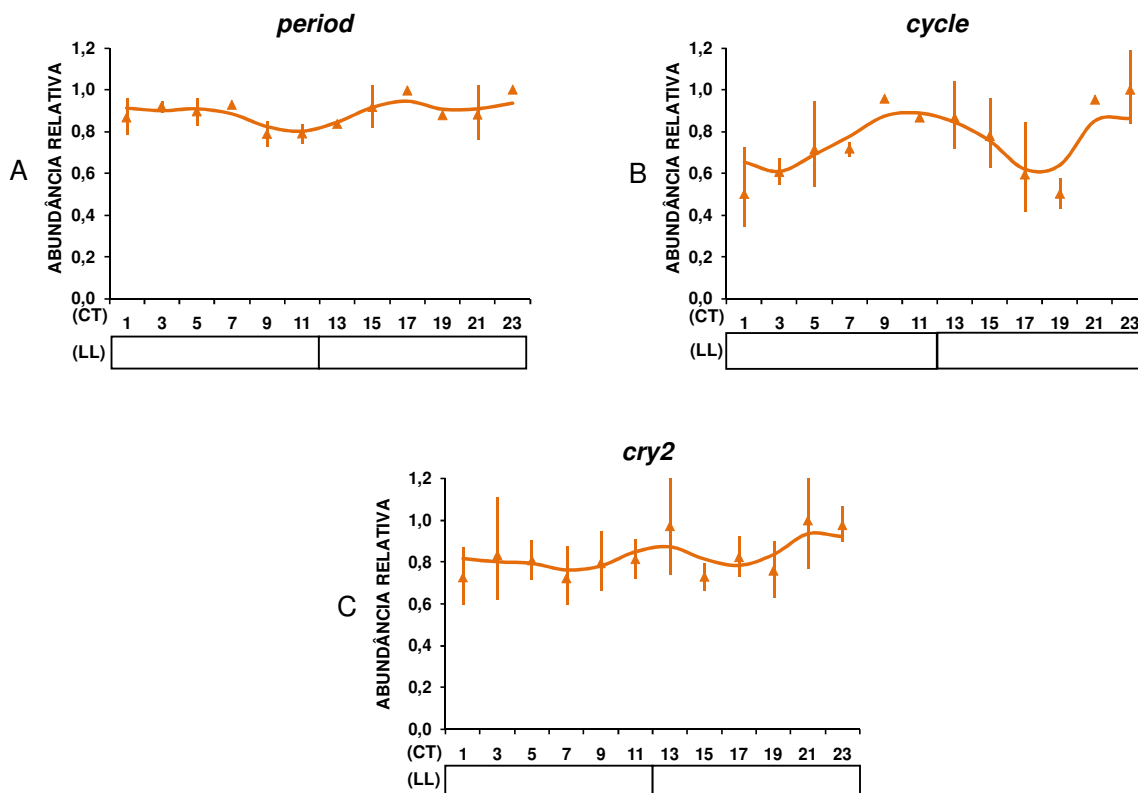


Figura 4.10: Expressão gênica de *Aedes aegypti* (linhas e triângulos laranjas) em claro constante (LL). Os triângulos representam os valores de abundância relativa dos genes em cada ZT e as linhas suavizadas representam as médias móveis ponderadas de 3 pontos (peso 2 para o ponto central) dos valores de abundância relativa. As linhas verticais em cada ponto representam o erro padrão da média. As barras horizontais brancas representam a fotofase. O eixo horizontal consiste do tempo em horas para cada dia de experimento. CT: *Circadian time* (tempo medido em horas de um período sem variações ambientais).

Tabela 4.3: Análise de variância (ANOVA) da expressão circadiana de genes de relógio de *Aedes aegypti* em LL, DD e DDTC.

	LL		DD		DDTC*	
Gene	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>per</i>	$F_{5,18}=1.772$	NS	$F_{5,18}=9.728$	<0.001	$F_{5,18}=43.620$	<0.001
<i>cyc</i>	$F_{5,18}=4.137$	0.011	$F_{5,18}=4.800$	0.0058	$F_{5,18}=10.408$	<0.001
<i>cry2</i>	$F_{5,18}=0.703$	NS	$F_{5,18}=8.204$	<0.001	$F_{5,18}=6.403$	0.001

NS= não significativo.

\*criados em LDTC desde ovos até adultos.

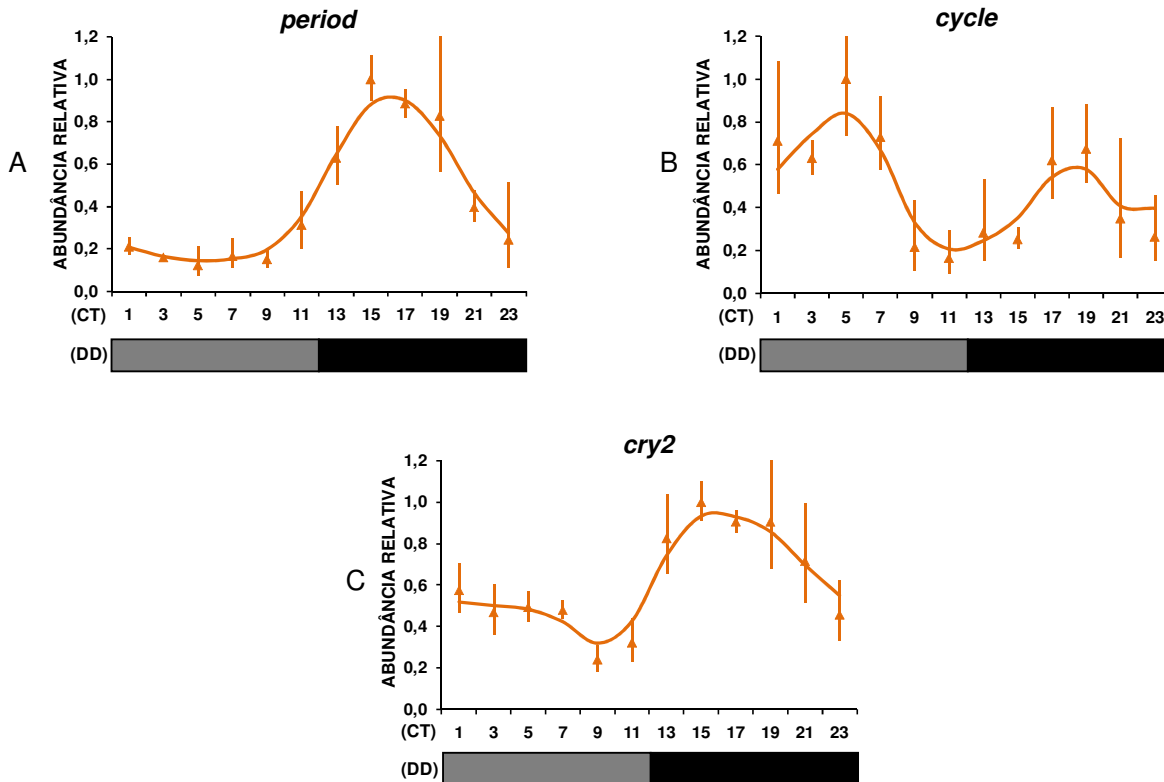


Figura 4.11: Expressão gênica de *Aedes aegypti* (linhas e triângulos laranjas) em escuro constante (DD). Os triângulos representam os valores de abundância relativa dos genes em cada CT e as linhas suavizadas representam as médias móveis ponderadas de 3 pontos (peso 2 para o ponto central) dos valores de abundância relativa. As linhas verticais em cada ponto representam o erro padrão da média. As barras horizontais cinzas representam a fotofase subjetiva, enquanto que as pretas representam a escotofase. O eixo horizontal consiste do tempo em horas para cada dia de experimento. CT: *Circadian time* (tempo medido em horas de um período sem variações ambientais).

#### 4.4.2 – Expressão circadiana de *Ae. aegypti* em escuro constante com ciclos de temperatura, criados em um regime de claro-escuro com ciclos de temperatura.

Para esta análise, os mosquitos foram submetidos a um regime de escuro constante com ciclos de temperatura (DDTC), porém sua criação foi feita em um regime de claro-escuro com ciclos de temperatura (Tabela 3.2, na seção Material e Métodos para mais detalhes). Assim como na outra condição de DDTC (subitem 4.3.2), os genes *per*, *cycle* e *cry2* apresentaram padrões rítmicos (Tabela 4.3; Figura 4.12). *per* apresenta uma curva de expressão com um pico em ZT 17, e *cyc* apresenta um pico não muito bem definido entre os ZTs 3 e 5. Já *cry2*, apresenta uma curva bimodal com picos em ZT 3 e ZT 17. Todas as curvas de expressão, nesta análise, apresentam uma mudança de fase em relação condição anterior de DDTC tendo, na verdade, padrões muito similares aos vistos em LD (Gentile *et al.*, 2009; ver Discussão para mais detalhes).

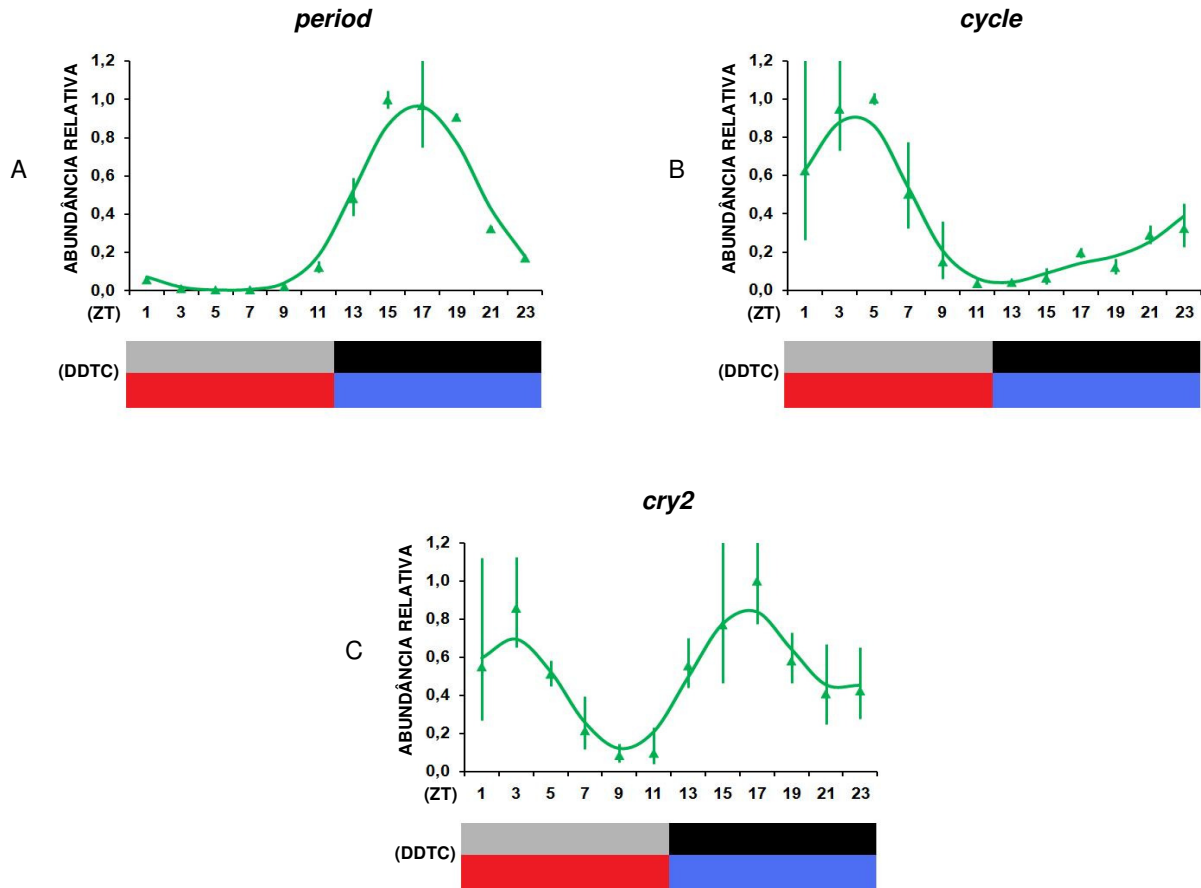


Figura 4.12: Expressão circadiana de *Ae. aegypti* (linhas e triângulos verdes) em escuro constante com ciclos de temperatura (DDTC), criados em um regime de claro/escuro com ciclos de temperatura (LDTC). Os triângulos representam os valores de abundância relativa dos genes em cada ZT e as linhas suavizadas representam as médias móveis ponderadas de 3 pontos (peso 2 para o ponto central) dos valores de abundância relativa. As linhas verticais em cada ponto representam o erro padrão da média. Barras horizontais: cinzas (fotofase subjetiva ou dia subjetivo), pretas (escotofase), vermelhas (termofase) e azuis (criofase). O eixo horizontal consiste do tempo em horas para cada dia de experimento. ZT: *Zeitgeber time* (tempo do ciclo ambiental medido em horas). período sem variações ambientais).



## 5 – Discussão

O relógio biológico controla os ritmos de atividade e alimentação de insetos vetores que são importantes na dinâmica de transmissão de doenças (Klowden, 1996). Um de nossos objetivos, neste trabalho, foi comparar a expressão de alguns genes do relógio circadiano de duas espécies de mosquitos vetores com padrões de atividade locomotora distintos. Estudos prévios mostraram que alguns dos genes centrais no relógio circadiano (*per*, *tim*, *Clk*, *cyc* e *cry1*) apresentaram perfis de expressão muito semelhantes entre *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* (Gentile, 2007). Sendo assim, estendemos esta análise a outros três genes: *vri*, *Pdp1* e *cry2*. Encontramos uma diferença clara na expressão de *cry2*, com um padrão bimodal em *Ae. aegypti* e unimodal em *Cx. quinquefasciatus* (Figura 5.1) (Gentile *et al.*, 2009). Assim enquanto ambas as espécies apresentam um pico de expressão no meio da noite, em *Ae. aegypti* um pico adicional é observado no início da fotofase.

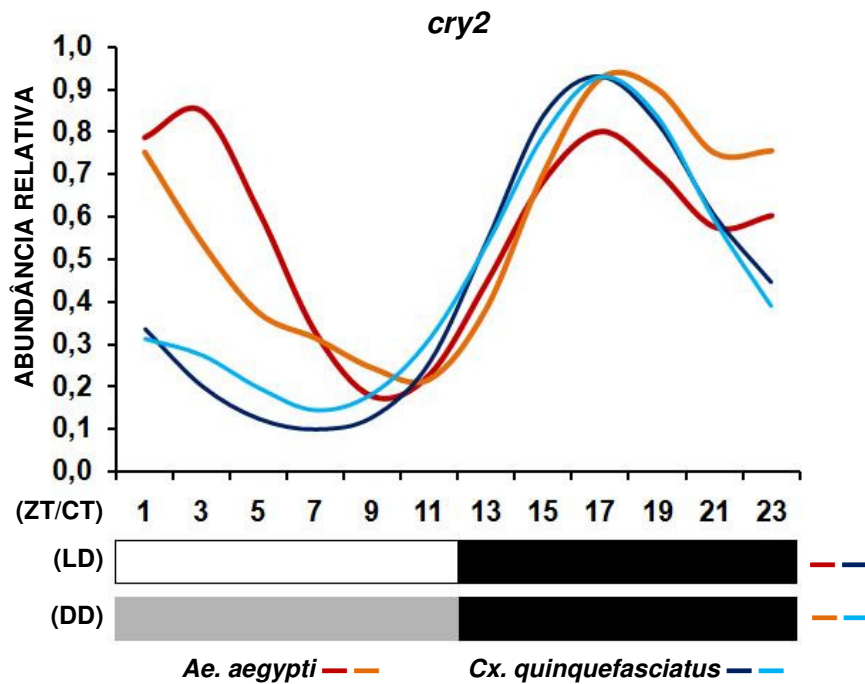


Figura 5.1: Expressão de *cry2* de *Aedes aegypti* (linha vermelho-escuro em LD e linha laranja em DD) e *Culex quinquefasciatus* (linha azul-marinho em LD e azul-clara em DD) em claro-escuro (LD) e escuro constante (DD) (Gentile *et al.*, 2009). As linhas suavizadas representam as médias móveis ponderadas de 3 pontos (peso 2 para o ponto central) dos valores de abundância relativa. Barras horizontais: brancas (fotofase), cinzas (fotofase subjetiva ou dia subjetivo) e pretas (escotofase). O eixo horizontal consiste do tempo em horas para cada dia de experimento. ZT: *Zeitgeber time* (tempo do ciclo ambiental medido em horas). CT: *Circadian time* (tempo medido em horas de um período sem variações ambientais).

Como mencionado na Introdução, embora ausente em *Drosophila*, CRY2 é encontrado em diversas ordens de insetos atuando provavelmente como repressor da transcrição via CLK/CYC (Yuan *et al.*, 2007), possuindo assim um papel central no controle do relógio nestes organismos. Em borboletas, CRY2 apresenta um duplo papel, pois atua no marcapasso central, como um repressor de CLK/CYC, e participa mais diretamente do controle dos *outputs* do relógio circadiano (Zhu *et al.*, 2008). CRY2 apresenta um acúmulo circadiano em projeções e arborizações neurais que convergem para órgãos de controle do *output* do relógio, como o Complexo Central (CC) (Zhu *et al.*, 2008). Este órgão é importante para o controle da navegação de insetos orientada pelo Sol (Heinze & Homberg, 2007). Outra característica de CRY2 é uma marcação citoplasmática intensa observada em alguns tecidos no cérebro. Este acúmulo citoplasmático, segundo Zhu e colaboradores, seria importante para a participação de CRY2 no controle do *output* do relógio em borboletas (Zhu *et al.*, 2008). O pico extra, observado em *Ae. aegypti*, no início da manhã, poderia atuar de maneira semelhante ao que ocorre em borboletas, promovendo um acúmulo de proteínas no citoplasma que poderiam atuar de alguma maneira, ainda desconhecida, no comportamento sem interferir no marcapasso central. De fato, isto explicaria como a presença de um pico extra em *Ae. aegypti*, não gera, também, padrões de expressão diferentes em outros genes entre as duas espécies, que possivelmente são regulados por CRY2.

Uma análise preliminar que realizamos nas regiões 5' não traduzida e nos introns das seqüências de *cry2* das duas espécies sugere que uma possível explicação para a diferença vista na expressão deste gene estaria na presença de um sítio exclusivo de regulação em *Ae. aegypti*, que não estaria presente em *cry2* de *Cx. quinquefasciatus*. A partir daí, foi elaborado um modelo para explicar a regulação de *cry2* nas duas espécies (Figura 5.2). No final do crepúsculo e início da noite, *cry2* e *per* seriam ativados pelo heterodímero CLK/CYC, que se ligaria ao E-box presente em ambos os genes produzindo um pico de abundância comum a todos, em ZT 17. Este E-box foi localizado na região 5' não traduzida de *per* (Ricardo Machado; comunicação pessoal), enquanto que em *cry2* este localiza-se no primeiro intron de *Ae. aegypti* e no intron ortólogo em *Cx. quinquefasciatus*. Já no final da noite e início da manhã, apenas em *Ae. aegypti*, *cry2* seria ativado novamente e depois reprimido (por PDP1 e VRI, respectivamente, que se ligariam ao *V/P binding site* encontrado na região 5' não traduzida de *cry2* somente de *Ae.*

*aegypti*) pelos mesmos fatores transcricionais que regulam *cyc* e *Clk*, promovendo o surgimento de um segundo pico, em *cry2* que coincide com o pico de *cyc* (Figura 5.2). Este sítio não foi localizado nem nos introns, nem na região 5' não traduzida de *cry2* de *Cx. quinquefasciatus*. É possível que estes dois picos ocorram nas mesmas células ou em diferentes grupos de tecidos da cabeça, já que os estudos realizados envolveram a cabeça inteira. Uma análise futura, em cultura de células, com estes fatores transcricionais e construções com um gene repórter contendo as regiões regulatórias de *cry2* dará uma idéia mais clara da regulação deste gene em *Ae. aegypti*.

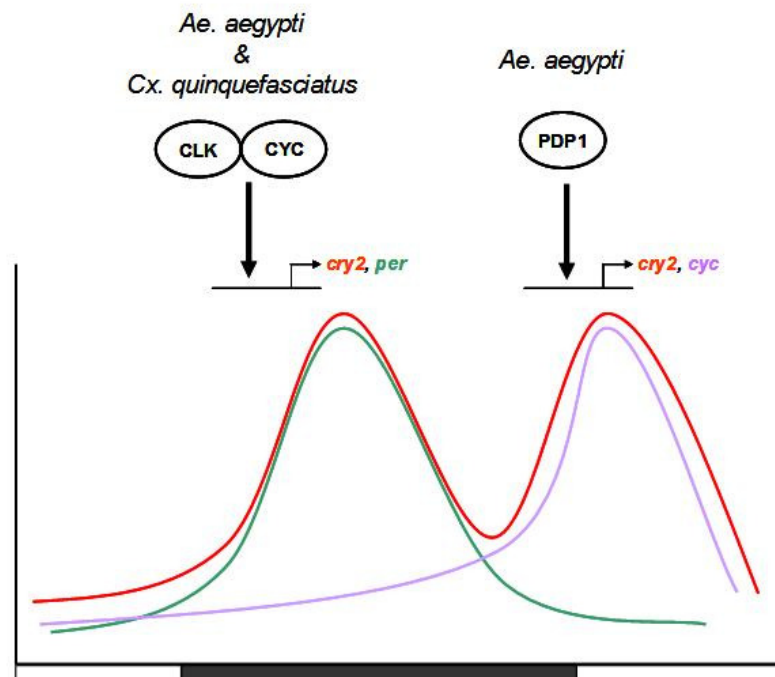


Figura 5.2: Modelo da regulação da expressão circadiana de *cry2* em *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. Os genes estão diferenciados por cores, assim como suas respectivas curvas de expressão. As setas mais largas indicam a ligação dos fatores transcricionais aos sítios regulatórios dos genes, enquanto as finas apontando para os genes indicam a transcrição.

Nossa hipótese, que ainda precisa ser testada, é que CRY2 seria o elo de conexão entre o marcapasso central e os genes de *output* em mosquitos modulando, de forma indireta, as diferenças nos padrões de atividade locomotora entre as duas espécies. Entretanto, é possível que a diferença no comportamento entre *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* esteja relacionada a outros genes ainda não identificados ou a controles pós-transcricionais. De fato, alguns trabalhos,

discutem que alterações na transcrição rítmica afetam relativamente pouco a funcionalidade do relógio de diversos organismos e que as modificações pós-traducionais do relógio é que seriam cruciais para o seu funcionamento (Lakin-Thomas, 2006; Zheng & Sehgal, 2008).

A partir da análise da atividade locomotora de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em diversos regimes com ciclos de temperatura observamos alguns resultados interessantes. *Ae. aegypti* nos regimes de LDTC e DLTC apresenta diferenças nos picos de atividade em comparação com LD (Figura 4.1A e Figura 4.7). Em ambos os casos, o ciclo de temperatura parece modular a resposta às transições de luz de *Ae. aegypti*. Ao contrário dos ciclos de claro-escuro onde a transição é abrupta nas incubadoras que utilizamos, as mudanças de temperatura ocorrem de forma gradual, levando cerca de uma hora para subir ou descer 10°C. Sendo assim, o pico matutino, de valores mais baixos em LDTC que LD, que ocorre no início da transição criofase/termofase, está submetido a temperaturas baixas, enquanto que o pico vespertino, que apresenta níveis mais altos em LDTC que LD, ocorre no início da transição termofase/criofase, e está submetido a temperaturas altas. O efeito oposto é observado em DLTC. Portanto, temperaturas baixas têm um efeito inibitório sobre os picos de atividade que ocorrem durante as transições, enquanto temperaturas altas produzem o efeito oposto.

Além disso, as oscilações de temperatura e luz parecem influenciar de forma diferente *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* (Figura 4.7). Em DLTC, a inversão da fase de claro-escuro em relação ao ciclo de temperatura, promove uma distribuição dos padrões de atividade de *Ae. aegypti* de uma forma quase equivalente entre a fotofase e a escotofase. *Cx. quinquefasciatus*, por outro lado, parece ser menos influenciado pela oscilação na temperatura, pois seu padrão de atividade é controlado principalmente pelos ciclos de claro-escuro, ficando restrito à escotofase.

Entretanto, apesar de *Cx. quinquefasciatus* ser principalmente influenciado pela luz como observado em DLTC, o agente oscilador ou *zeitgeber* temperatura também é importante para seu padrão rítmico de atividade, como pode ser visto em DDTTC (Figuras 4.2 e 4.3) e em LLTC (figuras 4.5 e 4.6). Esta espécie apresenta uma atividade restrita a criofase entre estes dois regimes, entretanto isto se torna mais evidente em LLTC, visto que *Cx. quinquefasciatus* desloca seu pico principal para depois da transição da temperatura tentando evitar temperaturas altas. Já *Ae.*

*aegypti*, além de estar mais restrito a termofase, se comporta de maneira diferente de *Cx. quinquefasciatus*, principalmente em DDTC, pois apresenta uma antecipação de sua atividade por alguns dias (padrão transiente) nesta condição (Figuras 4.2 e 4.3), que não é observado em LLTC (Figura 4.6), embora, em ambos os regimes, *Ae. aegypti* apresente uma concentração de atividade na primeira metade da termofase.

O fato de não se observar esta transiência no padrão de atividade para *Cx. quinquefasciatus* em DDTC pode ser um reflexo da diferença do período endógeno entre as duas espécies descrito anteriormente para DD (Gentile *et al.*, 2009, Capítulo 4.1). Em DD, *Cx. quinquefasciatus* apresenta um período muito próximo de 24 horas, e, desta forma, nestas condições, não se observa uma antecipação de sua atividade ao longo de vários dias, ao contrário de *Ae. aegypti*, que, por apresentar um período de ~22,5 horas, apresenta, nestas condições, uma antecipação de sua atividade a cada período de 24 horas. Sendo assim, é possível que em DDTC, *Cx. quinquefasciatus* também apresente um período muito próximo ao visto em DD, que acabaria se refletindo em nenhum deslocamento de fase visível.

Com relação aos dados obtidos de *Ae. aegypti* em DDTC, observa-se que seu padrão de atividade em ciclos de temperatura é muito parecido com o mutante *per<sup>S</sup>* de *Drosophila*, uma vez que este mutante é arrastado por ciclos de temperatura em LLTC, mas apresenta um avanço de fase na atividade locomotora em DDTC (Tomioka *et al.*, 1998). Entretanto, *Ae. aegypti* em DDTC não apresenta um livre-curso como *per<sup>S</sup>*, mas sim uma transiência ao ciclo de temperatura que se estabiliza, após alguns dias neste regime. Esta transiência, em DDTC, também é observada em estudos com o mosquito *Culex pipiens pallens* (Chiba *et al.*, 1993), embora este padrão visto por Chiba tenha ocorrido em regimes de LD e ciclos de temperatura diferentes dos nossos.

Observando alguns genes que compõem o relógio de mosquitos pode-se notar que os ciclos de temperatura são importantes na manutenção de abundância rítmica dos mesmos. Em LLTC, alguns deles encontram-se rítmicos, embora com uma amplitude baixa. A causa desta baixa amplitude é, provavelmente, a presença de luz constante, fator que favorece direta, ou indiretamente, a degradação de fatores de transcrição importantes para o funcionamento do relógio, afetando a expressão dos genes (Figura 4.8; Tabela 4.1) e aspectos do comportamento como a

atividade locomotora (Figura 4.6) destes mosquitos. Entre os genes que apresentaram os padrões claros de abundância rítmica, uma comparação entre as espécies apontou diferenças para *cry2* e *cyc*, embora no caso de *cyc* essa diferença seja possivelmente provocada por uma maior sensibilidade à luz em *Cx. quinquefasciatus* do que propriamente pelos ciclos de temperatura, já que em DDTC, com a mesma oscilação de temperatura, mas sem a presença de luz constante, *cyc* é similar entre as duas espécies (Figura 4.9B).

No caso de *cry2* de *Ae. aegypti* em LLTC e DDTC, este parece antecipar o pico de expressão “matutino” que esta espécie possui, ao contrário de *Cx. quinquefasciatus*, em LD (e DD) (Capítulo 1). A antecipação deste pico do início da termofase para o final da criofase gera diferenças entre as espécies, desta vez, nos últimos ZTs (Figura 4.8G e Figura 4.9C). No regime de DDTC também foi observado que o pico no meio da escotofase, comum às duas espécies em LD (e DD) e também em LLTC (ZT 17 para LD e DD - Capítulo 1; ZT15 para LLTC - Figura 4.8G) parece, em *Ae. aegypti*, sofrer uma antecipação de fase diferente de *Cx. quinquefasciatus* e localizar-se em ZT 11 (Figura 4.9C). Estas diferenças na expressão circadiana de *cry2* entre as duas espécies podem, de forma direta ou indireta, estar associadas aos padrões distintos de atividade locomotora observados em ciclos de temperatura, assim como foi anteriormente sugerido para LD e DD (Capítulo 1).

Entretanto, é possível que as diferenças na atividade em ciclos de temperatura não estejam diretamente relacionadas ao relógio circadiano. Em *Drosophila*, por exemplo, a temperatura pode afetar diretamente a transcrição de alguns genes, envolvidos em aspectos do comportamento, de forma independente do relógio circadiano (Boothroyd *et al.*, 2007). É possível que, entre *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, um ou mais genes que participam do controle da atividade locomotora sejam afetados pela temperatura da mesma maneira que *Drosophila*.

Nas análises de expressão feitas apenas em *Ae. aegypti* foi possível observar que *per* e *cry2* em claro constante (LL) apresentam padrões arrítmicos (Figura 4.10) onde anteriormente a presença dos ciclos de temperatura (em LLTC) promovia ritmicidade (Figura 4.8). No caso de *cyc*, nesta condição, são necessários mais experimentos para confirmar se sua abundância apresenta, de fato, valores significativos. Em escuro constante (DD), os genes não estão sob influência de

nenhum agente oscilador, e, portanto entram em livre-curso. Ao compararmos nossos dados de DD (três dias nesta condição), com dados prévios obtidos em nosso laboratório (um dia de DD; Gentile *et al.*, 2009) nota-se que estes genes, após três dias, apresentam uma antecipação discreta de fase resultante do livre-curso (Figura 5.3). Além disso, ao comparar estes dados de DD com os de DDTC pode ser observada uma fase diferente e influenciada pelo ciclo de temperatura para os três genes (Figura 5.3). Caso a temperatura não estivesse de maneira alguma afetando a fase dos picos de expressão dos genes, seria de se esperar que *per*, *cyc* e *cry2* estivessem também em livre-curso e apresentassem curvas idênticas as de DD, o que não ocorre.

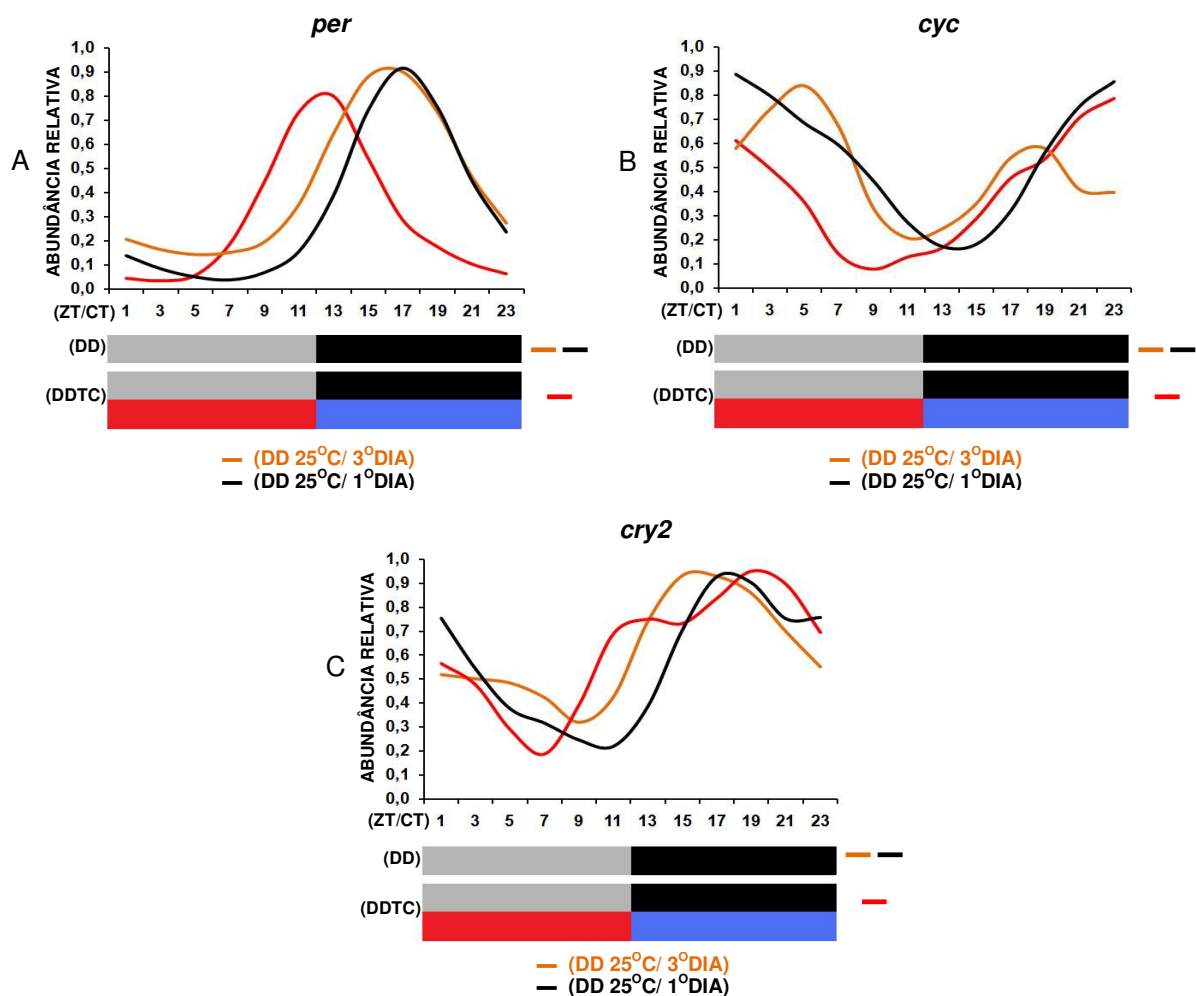


Figura 5.3: Expressão circadiana de *per*, *cyc* e *cry2* de *Aedes aegypti* em escuro constante (DD) e escuro constante com ciclos de temperatura (DDTC). As linhas suavizadas representam as médias móveis ponderadas de 3 pontos (peso 2 para o ponto central) dos valores de abundância relativa. Linhas marrons (três dias em DD), linhas pretas (primeiro dia em DD; Gentile *et al.*, 2009) e linhas vermelhas (DDTC). Barras horizontais: cinzas (fotofase subjetiva ou dia subjetivo), pretas (escotofase), vermelhas (termofase) e azuis (criofase). O eixo horizontal consiste do tempo em horas para cada dia de experimento. ZT: *Zeitgeber time* (tempo do ciclo ambiental medido em horas). CT: *Circadian time* (tempo medido em horas de um período sem variações ambientais).

Em outro experimento com *Ae. aegypti*, a criação desde ovos até adultos em LDTC fez com que *per*, *cyc* e *cry2*, em DDTC, apresentassem curvas muito semelhantes às de LD (Gentile *et al.*, 2009), porém diferentes das anteriormente vistas para DDTC (Figura 5.4). Isto sugere que a presença de ciclos de temperatura em todas as fases do desenvolvimento afeta de alguma forma a expressão gênica nos adultos fazendo com que os arrastamentos de temperatura e luz fiquem muito semelhantes. Embora se saiba que as condições durante o desenvolvimento, como por exemplo, fotoperíodo, possa afetar o período em livre-curso de insetos adultos (Saunders, 2002), não é do nosso conhecimento nenhuma observação deste tipo na literatura com relação à expressão circadiana.

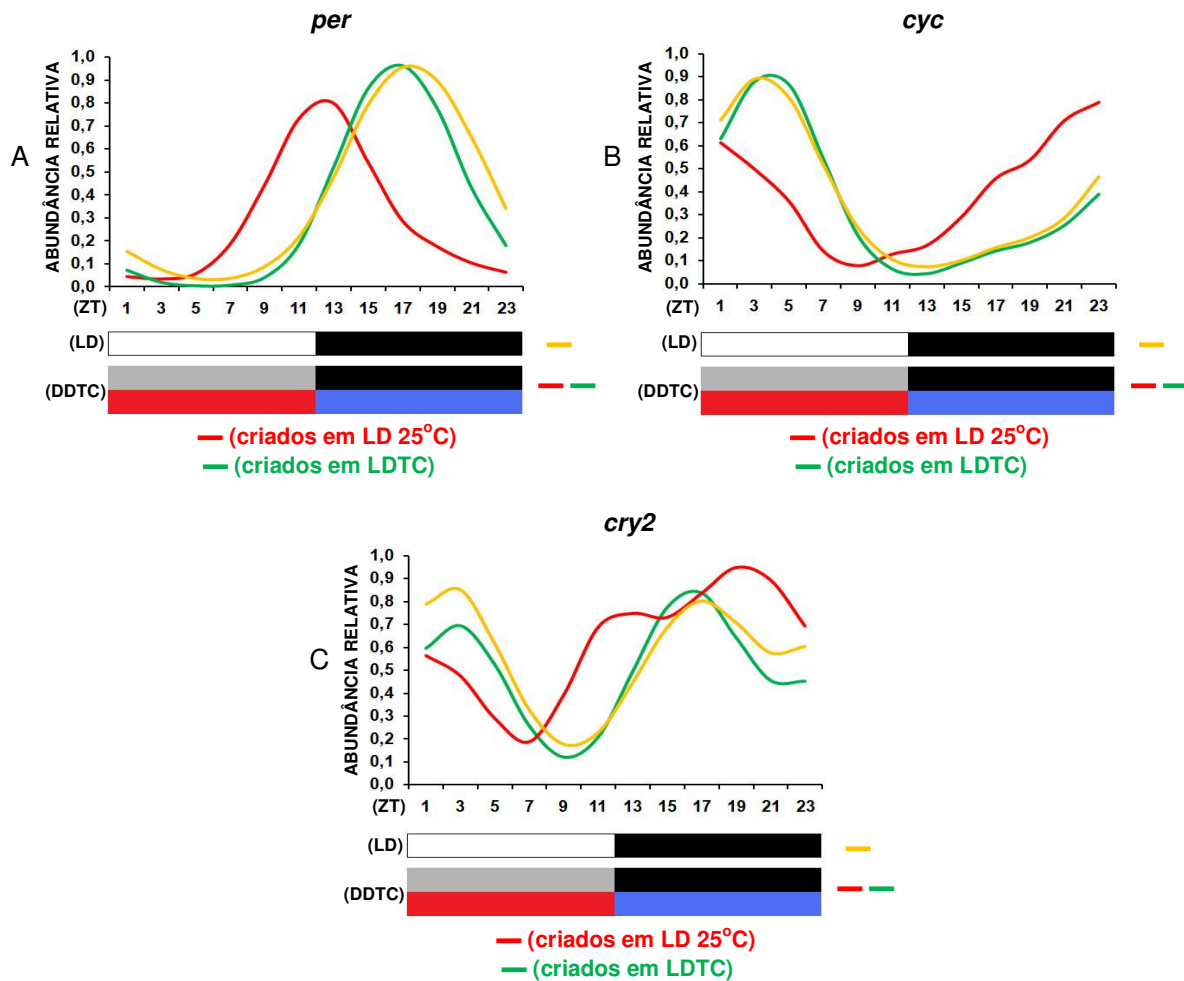


Figura 5.4: Expressão circadiana de *per*, *cyc* e *cry2* de *Aedes aegypti* em ciclos de claro/escuro (LD) e escuro constante com ciclos de temperatura (DDTC) criados em regimes distintos. As linhas suavizadas representam as médias móveis ponderadas de 3 pontos (peso 2 para o ponto central) dos valores de abundância relativa. Linhas amarelas (LD; Gentile *et al.*, 2009), linhas vermelhas (DDTC; criados em LD 25°C) e linhas verdes (DDTC; criados em LDTC). Barras horizontais: brancas (fotofase), cinzas (fotofase subjetiva ou dia subjetivo), pretas (escotofase), vermelhas (termofase) e azuis (criofase). O eixo horizontal consiste do tempo em horas para cada dia de experimento. ZT: *Zeitgeber time* (tempo do ciclo ambiental medido em horas).



Este dado molecular gera novas perspectivas para o que foi observado inicialmente para a atividade locomotora, uma vez que a presença ou não por alguns dias de LDTC não gerou diferenças em DDTC ou LLTC (Figuras 4.2 e 4.3; Figura 4.5). É importante ressaltar que, neste caso, o regime de LDTC só foi empregado na fase adulta destes mosquitos, portanto, futuros experimentos de atividade locomotora com insetos criados em condições similares aos de expressão poderão gerar novas interpretações a este respeito.

Muito do que é sabido a respeito dos efeitos da temperatura no relógio circadiano de *D. melanogaster* foi baseado em trabalhos feitos com moscas criadas em regimes de claro-escuro com temperatura constante, utilizando apenas os ciclos de temperatura na fase adulta, durante os experimentos (Tomioka *et al.*, 1998; Yoshii *et al.*, 2002; Miyasako *et al.*, 2007; Glaser & Stanewsky, 2005; Sehadova *et al.*, 2009). Caso nossos dados sejam confirmados futuramente com novos experimentos, talvez seja necessária uma reavaliação do que já foi feito até então a este respeito para *Drosophila*. Se nesta espécie modelo, as condições de criação durante o desenvolvimento apresentarem o mesmo efeito na expressão gênica de adultos, será possível então utilizar o arsenal de ferramentas disponíveis em *Drosophila* para investigar em mais detalhes as bases genéticas deste fenômeno. Por outro lado, se isto se mostrar uma particularidade de mosquitos, então fica ainda mais evidente a importância de estendermos os conhecimentos gerados acerca do relógio circadiano em espécies modelo para outros organismos.

Como mencionado anteriormente, mosquitos hematófagos são vetores de uma série de importantes doenças tropicais. Nossos resultados, alguns ainda preliminares, indicam importantes diferenças de como os ciclos de claro-escuro e temperatura regulam a função do relógio circadiano e a atividade locomotora entre *Ae. aegypti* e de *Cx. quinquefasciatus*. Estes dois tipos de ciclos ambientais são importantes para determinar o momento em que estes mosquitos irão picar e transmitir patógenos para os humanos. Portanto, será muito importante continuar estes estudos para que possamos entender melhor como estes dois *zeitgebers* sincronizam o relógio circadiano destes insetos.

## 6 – Conclusões

- As análises de expressão circadiana em LD e DD mostram diferenças no gene *cry2* entre *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, que são possivelmente causadas por mecanismos da regulação de *cry2* distintos nas duas espécies. Os resultados sugerem um possível envolvimento de *cry2* nas diferenças nos padrões de atividade locomotora entre *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. No entanto, este envolvimento ainda precisa ser demonstrado experimentalmente.
- Foi observado que ciclos de temperatura, mesmo na ausência de ciclos de claro-escuro, são capazes de promover ritmos na atividade locomotora e na expressão de genes do relógio circadiano em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*.
- As diferenças nos padrões de atividade de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em ciclos de temperatura em luz constante se assemelham aquelas observadas em ciclos de claro-escuro e temperatura constante. *Ae. aegypti* é mais ativo na fotofase e termofase enquanto *Cx. quinquefasciatus* é mais ativo na escotofase e criofase. As duas espécies, portanto, utilizam o *zeitgeber* da temperatura, assim como o da luz, para concentrar sua atividade em uma fase específica.
- No regime de claro-escuro com a fase invertida em relação aos ciclos de temperatura (DLTC), *Ae. aegypti* parece concentrar sua atividade locomotora de acordo com os ciclos de temperatura e de claro-escuro, enquanto que *Cx. quinquefasciatus* aparentemente concentra sua atividade, principalmente, de acordo com a fase do ciclo de claro-escuro.
- Em ciclos de temperatura os genes *cyc* e *cry2* são os que apresentam as maiores diferenças nos perfis de expressão circadiana entre *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*.
- Em escuro constante com ciclos de temperatura (DDTC), após um arrastamento por ciclos de claro-escuro, *Ae. aegypti* apresenta um padrão de atividade locomotora transiente por alguns dias, enquanto *Cx. quinquefasciatus* permanece arrastado pela temperatura, mantendo aproximadamente a mesma fase.
- *Ae. aegypti* adultos criados em condições de claro-escuro com ciclos de temperatura (LDTC), posteriormente submetidos apenas a ciclos de temperatura (DDTC) apresentam um perfil de expressão gênica muito similar ao que é observado

no arrastamento pela luz, mas diferente daquele observado em mosquitos criados em temperatura constante. Isto sugere um papel importante do desenvolvimento no padrão de expressão circadiana dos insetos adultos.

## 7 – Anexo

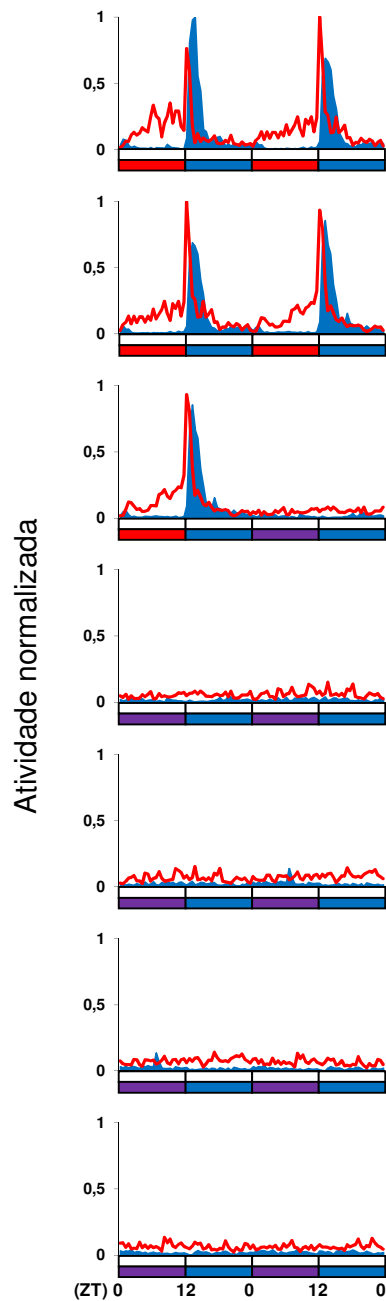


Figura 7.1: Atividade locomotora de *Ae. aegypti* (linha vermelha; n=51) e *Cx. quinquefasciatus* (área azul; n=52) em três dias de LLTC, seguidos de cinco dias em LL (temperatura constante de 20°C). Cada gráfico representa dois dias consecutivos de experimento, sendo que o segundo dia de cada gráfico é igual ao primeiro dia do gráfico subsequente. Barras horizontais: brancas (fotofase), vermelhas (termofase), azuis (criofase) e roxas (termofase subjetiva). Os dados de atividade foram normalizados. O eixo vertical mostra os valores normalizados de atividade. O eixo horizontal consiste do tempo em horas para cada dia de experimento. ZT: *Zeitgeber time* (tempo do ciclo ambiental medido em horas).

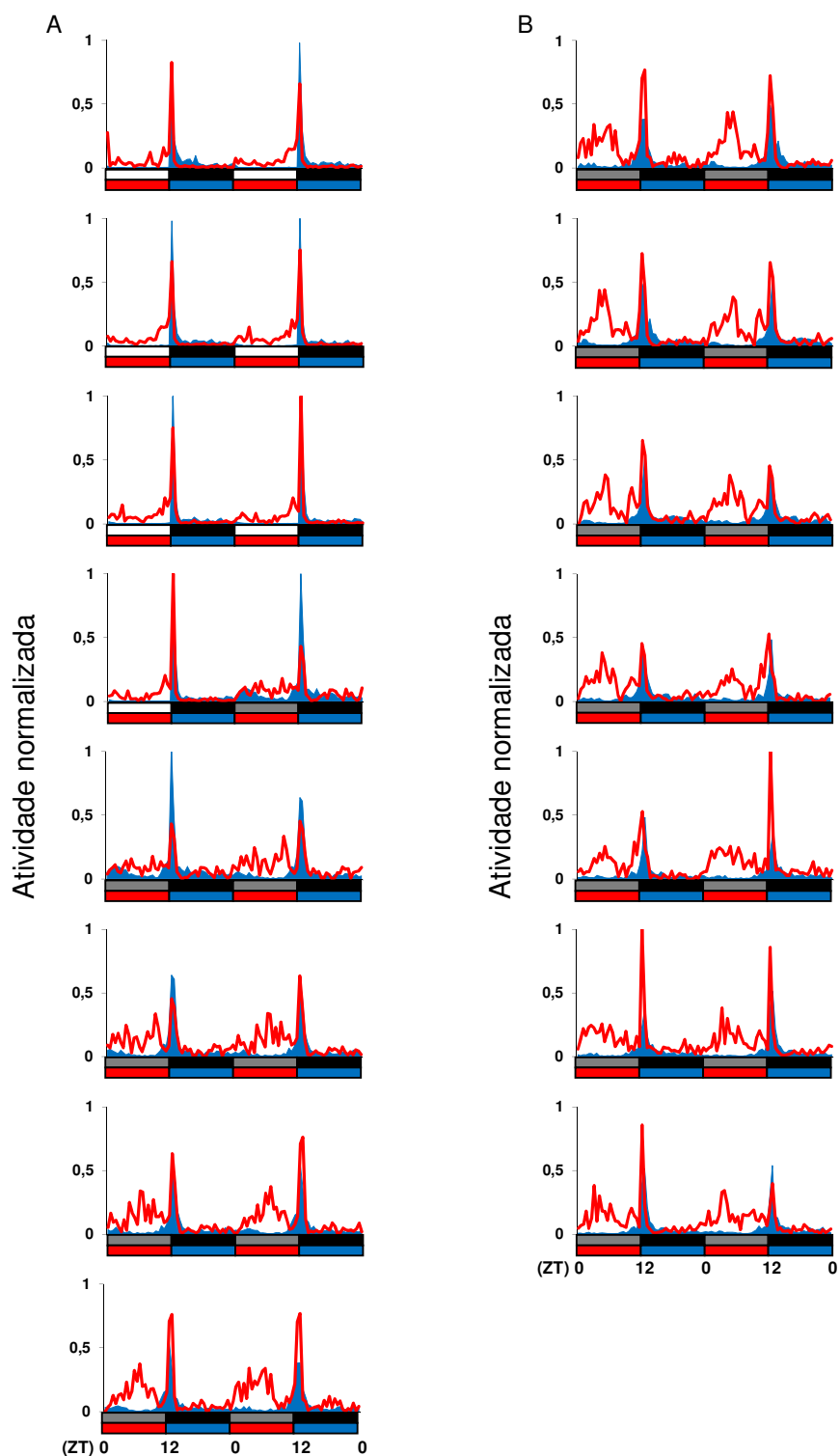


Figura 7.2: Atividade locomotora de *Ae. aegypti* (linha vermelha; n=21) e *Cx. quinquefasciatus* (área azul; n=49) em quatro dias de LDTC, seguidos de doze dias em DDTC. Cada gráfico representa dois dias consecutivos de experimento, sendo que o segundo dia de cada gráfico é igual ao primeiro dia do gráfico subsequente. A) Quatro dias de LDTC seguidos de cinco dias de DDTC. B) Quinto ao décimo segundo dia de DDTC. Barras horizontais: brancas (fotofase), pretas (escotofase), cinzas (fotofase subjetiva ou dia subjetivo), vermelhas (termofase) e azuis (criofase). Os dados de atividade foram normalizados. O eixo vertical mostra os valores normalizados de atividade. O eixo horizontal consiste do tempo em horas para cada dia de experimento. ZT: *Zeitgeber time* (tempo do ciclo ambiental medido em horas).

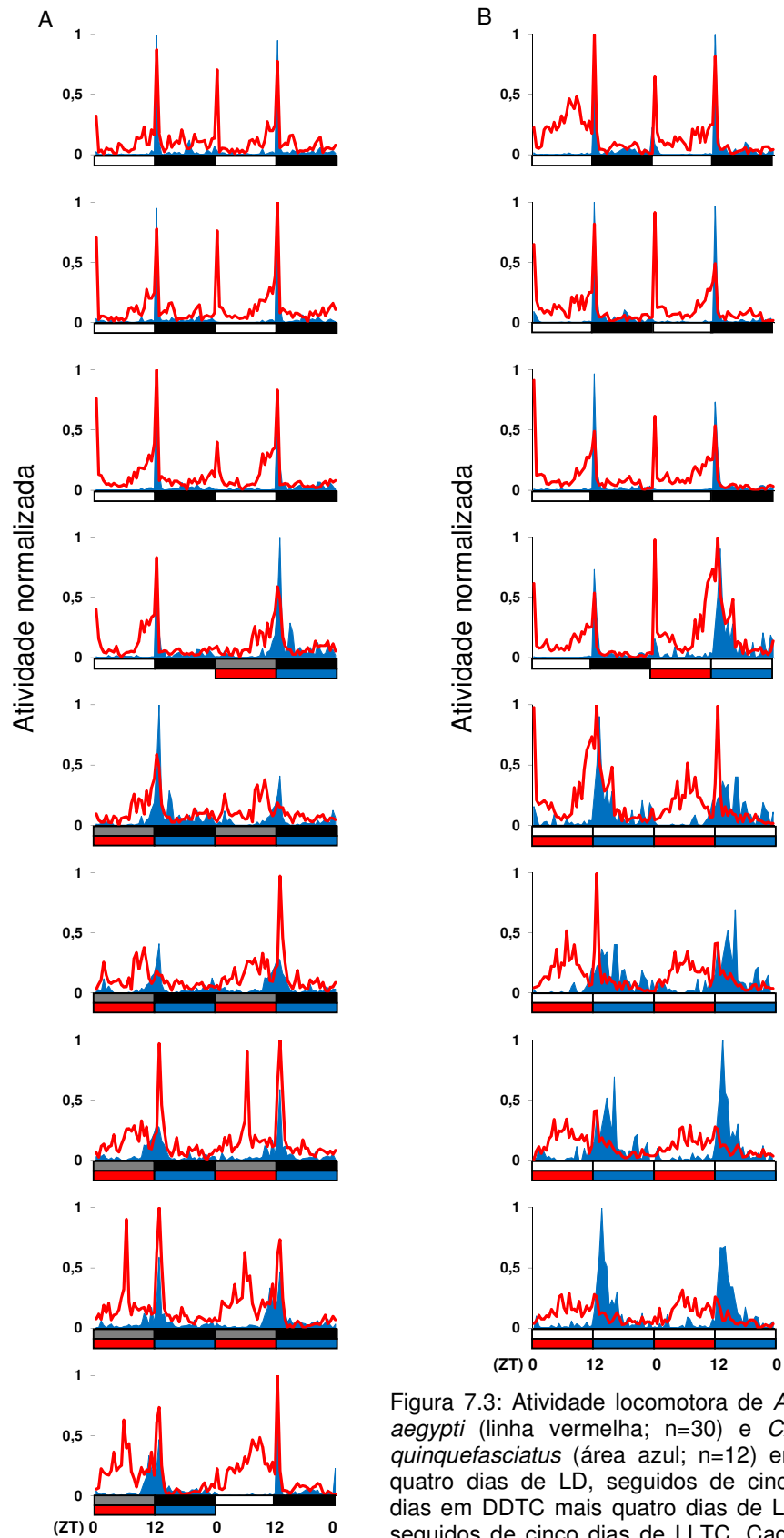


Figura 7.3: Atividade locomotora de *Ae. aegypti* (linha vermelha; n=30) e *Cx. quinquefasciatus* (área azul; n=12) em quatro dias de LD, seguidos de cinco dias em DDTc mais quatro dias de LD seguidos de cinco dias de LLTC. Cada gráfico representa dois dias consecutivos de experimento, sendo que o segundo dia de cada gráfico é igual ao primeiro dia do gráfico subsequente. A) Quatro dias de LD seguidos de cinco dias de DDTc mais um dia de LD. B) Quatro dias de LD seguidos de cinco dias de LLTC.

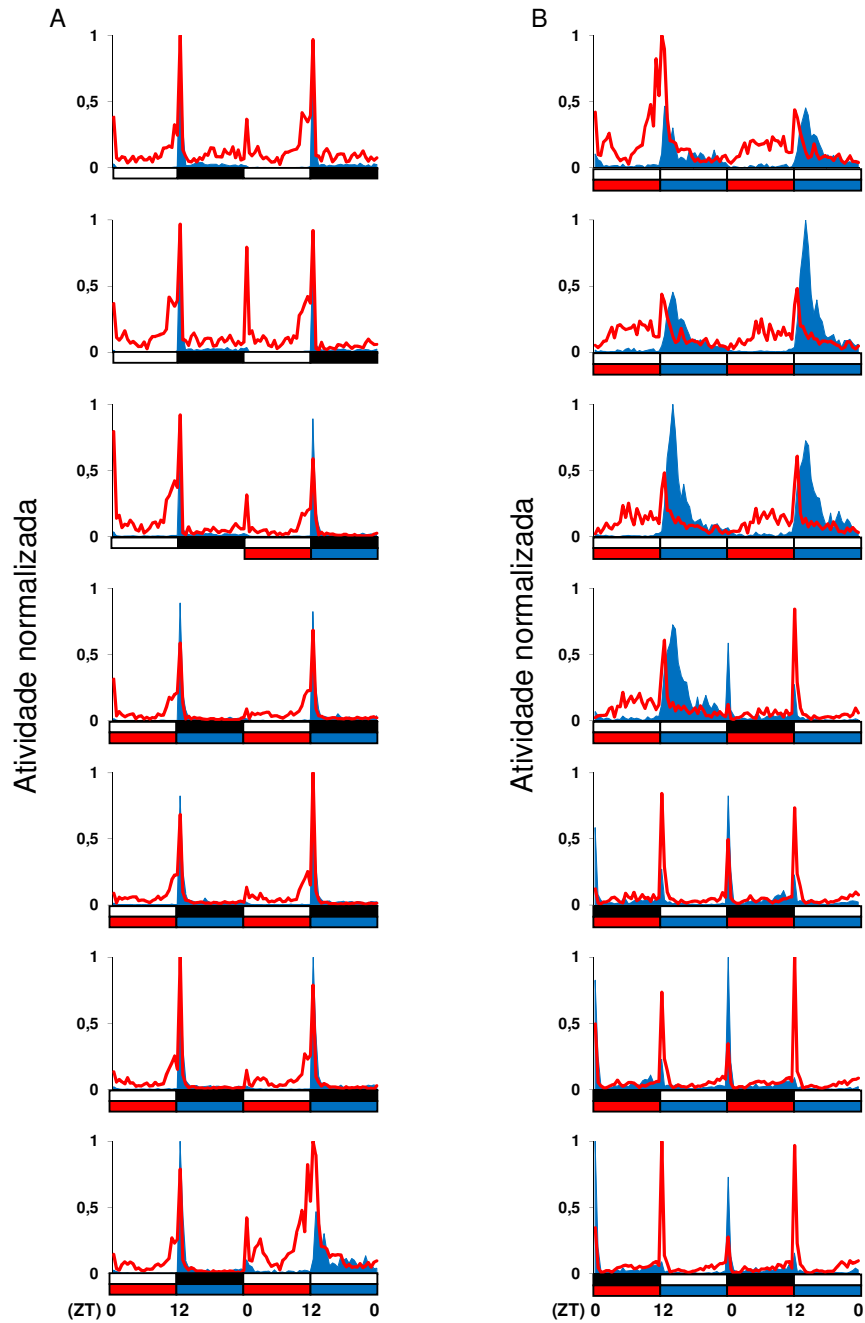


Figura 7.4: Atividade locomotora de *Ae. aegypti* (linha vermelha; n=50) e *Cx. quinquefasciatus* (área azul; n=59) em três dias de LD, seguidos de quatro dias de LDTL mais quatro dias de LLTL e finalmente quatro dias de DLTL. Cada gráfico representa dois dias consecutivos de experimento, sendo que o segundo dia de cada gráfico é igual ao primeiro dia do gráfico subsequente. A) Três dias de LD mais quatro dias de LDTL e um dia de LLTL. B) Quatro dias de LLTL mais quatro dias de DLTL. Barras horizontais: brancas (fotofase), pretas (escotofase), vermelhas (termofase) e azuis (criofase). Os dados de atividade foram normalizados. O eixo vertical mostra os valores normalizados de atividade. O eixo horizontal consiste do tempo em horas para cada dia de experimento. ZT: *Zeitgeber time* (tempo do ciclo ambiental medido em horas).

## 8 – Referências Bibliográficas

Akten B, Jauch E, Genova GK, Kim EY, Edery I, Raabe T, Jackson FR. A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator. **Nat. Neurosci** 2003; 6 (3): 251–257.

Bae K, Lee C, Sidote D, Chuang KY, Edery I. Circadian regulation of a *Drosophila* homolog of the mammalian clock gene: PER and TIM function as positive regulators. **Mol Cell Biol** 1998; 18 (10): 6142–6151

Bargiello, TA, Jackson FR, Young MW. Restoration of circadian behavioral rhythms by gene transfer in *Drosophila*. **Nature** 1984; 312: 752–754.

Boothroyd CE, Wijnen H, Naef F, Saez L, Young MW. Integration of light and temperature in the regulation of circadian gene expression in *Drosophila*. **PLoS Genet** 2007; 3 (4): e54.

Ceriani MF, Hogenesch JB, Yanovsky M, Panda S, Straume M, Kay SA. Genome-wide expression analysis in *Drosophila* reveals genes controlling circadian behavior. **J Neurosci** 2002; 22 (21): 9305-19.

Chang DC, Reppert SM. A novel C-terminal domain of *Drosophila* PERIOD inhibits dCLOCK:CYCLE-mediated transcription. **Curr Biol** 2003; 13 (9): 758–762.

Chiba Y, Uki M, Kawasaki Y, Matsumoto A, Tomioka K. Entrainability of circadian activity of the mosquito *Culex pipiens pallens* to 24-hr temperature cycles, with special reference to involvement of multiple oscillators. **J Biol Rhythms** 1993; 8 (3): 211-220.

Citri Y, Colot HV, Jacquier AC, Yu Q, Hall JC, Baltimore D, Rosbash M. A family of unusually spliced biologically active transcripts encoded by a *Drosophila* clock gene. **Nature** 1987; 326 (6108): 42-7.

Clements AN. **The Biology of Mosquitoes: Sensory, Reception and Behaviour**. Vol 2. New York: CABI Publishing; 1999.

Cyran SA, Buchsbaum AM, Reddy KL, Lin MC, Glossop NR, Hardin PE, Young MW, Storti RV, Blau J. *vriille*, *Pdp1*, and *dClock* form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. **Cell** 2003; 112: 329-341.



Cyran SA, Yiannoulos G, Buchsbaum AM, Saez L, Young MW, Blau J. The double-time protein kinase regulates the subcellular localization of the *Drosophila* clock protein period. **J Neurosci** 2005; 25 (22): 5430-7.

Darlington TK, Wager-Smith K, Ceriani MF, Staknis D, Gekakis N, Steeves TD, Weitz CJ, Takahashi JS, Kay SA. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. **Science** 1998; 280: 1599-1603.

Das S, Dimopoulos G. Molecular analysis of photic inhibition of blood-feeding in *Anopheles gambiae*. **BMC Physiol** 2008; 8: 23.

Dubruille R, Emery P. A plastic clock: how circadian rhythms respond to environmental cues in *Drosophila*. **Mol Neurobiol** 2008; 38 (2): 129-45.

Emery P, Stanewsky R, Helfrich-Förster C, Emery-Le M, Hall JC, Rosbash M. *Drosophila* CRY is a deep-brain circadian photoreceptor. **Neuron** 2000; 26 (2): 493-504.

Gekakis N, Saez L, Delahaye-Brown AM, Myers MP, Sehgal A, Young MW, Weitz CJ. Isolation of TIMELESS by PER protein interaction: defective interaction between TIMELESS protein and long-period mutant *PER<sup>L</sup>*. **Science** 1995; 270: 811-815.

Gentile C. **Genética Molecular dos Ritmos Circadianos em Mosquitos Vetores (Diptera: Culicidae)**. Rio de Janeiro; 2007. Doutorado [Biologia Celular e Molecular] – Instituto Oswaldo Cruz.

Gentile C, Rivas GB, Meireles-Filho AC, Lima JB, Peixoto AA. Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: *cry2* is different. **J Biol Rhythms** 2009; 24 (6): 444-51.

Glaser FT, Stanewsky R. Synchronization of the *Drosophila* Circadian Clock by Temperature Cycles. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** 2007; 72: 233-42.

Glaser FT, Stanewsky R. Temperature synchronization of the *Drosophila* circadian clock. **Curr Biol** 2005; 15 (15): 1352-63.

Haddow AJ. Studies of the biting-habits of African mosquitoes. An appraisal of methods employed, with special to the twenty-four hours. **Bull Ent Res** 1954; 45: 199-242.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** 1999; 41: 95-98.

Hardin PE, Hall JC, Rosbash M. Feedback of the *Drosophila period* gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. **Nature** 1990; 343: 536-340.

Hardin PE. The circadian timekeeping system of *Drosophila*. **Curr Biol** 2005; 15 (17): R714-22.

Hardin PE. Essential and expendable features of the circadian timekeeping mechanism. **Curr Opin Neurobiol** 2006; 16 (6): 686-92.

Heinze S, Homberg U. Maplike representation of celestial E-vector orientations in the brain of an insect. **Science** 2007; 16 (315): 995-7.

Helfrich-Förster C. The locomotor activity rhythm of *Drosophila melanogaster* is controlled by a dual oscillator system. **J. Insect Physiol** 2001; 47: 877-87.

Helfrich-Förster C, Winter C, Hofbauer A, Hall JC, Stanewsky R. The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. **Neuron** 2001; 30: 249-261.

Houl, J. H., W. Yu, S. M. Dudek and P. E. Hardin, *Drosophila* CLOCK is constitutively expressed in circadian oscillator and non-oscillator cells. **J Biol Rhythms** 2006; 21: 93-103.

Huang ZJ, Edery I, Rosbash M. PAS is a dimerization domain common to *Drosophila period* and several transcription factors. **Nature** 1993; 364: 259-262.

Jackson FR, Bargiello TA, Yun SH, Young MW. Product of *per* locus of *Drosophila* shares homology with proteoglycans. **Nature** 1986; 320 (6058): 185-8.

Kadener S, Stoleru D, McDonald M, Nawathean P, Rosbash M. *Clockwork Orange* is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. **Genes Dev** 2007; 21 (13): 1675-86.

Kim EY, Edery I. Balance between DBT/CKIepsilon kinase and protein phosphatase activities regulate phosphorylation and stability of *Drosophila* CLOCK protein. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2006; 103 (16): 6178-83.

Kloss B, Price JL, Saez L, Blau J, Rothenfluh A, Wesley CS, Young MW. The *Drosophila* clock gene *double-time* encodes a protein closely related to human casein kinase 1 epsilon. **Cell** 1998; 94: 97-107.

Klowden M. Vector Behavior. In: B. J. Beaty & W. C. Marquardt, eds. **The biology of disease vectors**. Colorado: University Press of Colorado; 1996. p.34-50.

Konopka, R. J. & Benzer, S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci USA** 1971; 68 (9): 2112-6.

Lakin-Thomas PL. Transcriptional feedback oscillators: maybe, maybe not... **J Biol Rhythms** 2006; 21 (2): 83-92.

Landskron J, Chen KF, Wolf E, Stanewsky R. A role for the PERIOD:PERIOD homodimer in the *Drosophila* circadian clock. **PLoS Biol** 2009; 7 (4): e3.

Lim C, Chung BY, Pitman JL, McGill JJ, Pradhan S, Lee J, Keegan KP, Choe J, Allada R. *Clockwork orange* encodes a transcriptional repressor important for circadian-clock amplitude in *Drosophila*. **Curr Biol** 2007; 17 (12): 1082-9.

Lin JM, Kilman VL, Keegan K, Paddock B, Emery-Le M, Rosbash M, Allada R. A role for *casein kinase 2alpha* in the *Drosophila* circadian clock. **Nature** 2002; 420 (6917): 816-20.

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

Majercak J, Sidote D, Hardin PE, Edery I. How a circadian clock adapts to seasonal decreases in temperature and day length. **Neuron** 1999; 24: 219.

Martinek S, Inonog S, Manoukian AS, Young MW. A role for the segment polarity gene *shaggy*/GSK-3 in the *Drosophila* circadian clock. **Cell** 2001; 105: 769–779.

Matsumoto A, Ukai-Tadenuma M, Yamada RG, Houl J, Uno KD, Kasukawa T, Dauwalder B, Itoh TQ, Takahashi K, Ueda R, Hardin PE, Tanimura T, Ueda HR. A functional genomics strategy reveals *clockwork orange* as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. **Genes Dev** 2007; 21 (13): 1687-700.

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

Meireles-Filho AC, da S Rivas GB, Gesto JS, Machado RC, Britto C, de Souza NA, Peixoto AA. The biological clock of an hematophagous insect: Locomotor activity rhythms, circadian expression and downregulation after a blood meal. **FEBS Lett** 2006a; 580 (1): 2-8.

Miyasako Y, Umezaki Y, Tomioka K. Separate sets of cerebral clock neurons are responsible for light and temperature entrainment of *Drosophila* circadian locomotor rhythms. **J Biol Rhythms** 2007; 22 (2): 115-26.

Moore-Ede MC, Sulzman FM & Fuller CA. **The clock that time us - Physiology of the circadian timing system**. Harvard University Press; 1982.

Myers MP, Wager-Smith K, Wesley CS, Young MW & Sehgal A. Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, *timeless*. **Science** 1995; 270: 805-808.

Myers MP, Wager-Smith K, Rothenfluh-Hilfiker A, Young MW. Light-induced degradation of TIMELESS and entrainment of the *Drosophila* circadian clock. **Science** 1996; 271: 1736–1740.

Nawathean P, Rosbash M. The Doubletime and CKII kinases collaborate to potentiate *Drosophila* PER transcriptional repressor activity. **Mol Cell** 2004; 13: 213–223.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucl Acids Res** 2001; 29: 2002-2007.

Pittendrigh CS. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. **Cold Spring Harbor Symp Quant Biol** 1960; 25: 159-182.

Pittendrigh CS. On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. **Proc Natl Acad Sci USA** 1954; 40: 1018-1029.

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

Richier B, Michard-Vanhée C, Lamouroux A, Papin C, Rouyer F. The clockwork orange *Drosophila* protein functions as both an activator and a repressor of clock gene expression. **J Biol Rhythms** 2008; 23 (2): 103-16.

Rieger D, Stanewsky R, Helfrich-Forster C. Cryptochrome, compound eyes, Hofbauer-buchner, eyelets and ocelli play different roles in the entrainment and masking pathway of the locomotor activity rhythm in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **J Biol Rhythms** 2003; 18 (5): 377-391.

Rothenfluh A, Young MW, Saez L. A TIMELESS-independent function for PERIOD proteins in the *Drosophila* clock. **Neuron** 2000; 26 (2): 505-14.

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

Sandrelli F, Costa R, Kyriacou CP, Rosato E. Comparative analysis of circadian clock genes in insects. **Insect Mol Biol** 2008; 17 (5): 447-63.

Sathyanarayanan, S, Zheng X, Xiao R, Sehgal A. Posttranslational regulation of *Drosophila* PERIOD protein by protein phosphatase 2A. **Cell** 2004; 116: 603–615.

Saunders DS. **Insect Clocks**. 3rd edition. Elsevier; 2002.

Sehadova H, Glaser FT, Gentile C, Simoni A, Giesecke A, Albert JT, Stanewsky R. Temperature entrainment of *Drosophila*'s circadian clock involves the gene *nocte* and signaling from peripheral sensory tissues to the brain. **Neuron** 2009; 64 (2): 251-66.

Sehgal A, Price JL, Man B, Young MW. Loss of circadian behaviour rhythms and *per* RNA oscillations in the *Drosophila* mutant *timeless*. **Science** 1994; 263: 1603-1606.

Shafer OT, Rosbash M, Truman JW. Sequential nuclear accumulation of the clock proteins period and timeless in the pacemaker neurons of *Drosophila melanogaster*. **J Biol Rhythms** 2002; 17 (4): 293-306.

Sheeba V. The *Drosophila melanogaster* circadian pacemaker circuit. **J Genet** 2008; 87 (5): 485-93.

Sokal RR, Rohlf FJ. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. 3rd edition. New York: W. H. Freeman; 1995.

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

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

Taylor B, Jones MD. The circadian rhythm of flight activity in the mosquito *Aedes aegypti* (L.). The phase-setting effects of light-on and light-off. **J Exp Biol** 1969; 51 (1): 59-70.

Tomioka K, Sakamoto M, Harui Y, Matsumoto N, Matsumoto A. Light and temperature cooperate to regulate the circadian locomotor rhythm of wild type and *period* mutants of *Drosophila melanogaster*. **J Insect Physiol** 1998; 44: 587–96.

Tomioka K, Yoshii T. Entrainment of *Drosophila* circadian rhythms by temperature cycles. **Sleep and Biological Rhythms** 2006; 4: 240–247.

Veleri S, Brandes C, Helfrich-Forster C, Hall JC, Stanewsky R. A Self-sustaining, light-entrainable circadian oscillator in the *Drosophila* brain. **Curr Biol** 2003; 13: 1758-1767.

Williams CB. The use of logarithms in the interpretation of certain entomological problems. **Ann Appl Biol** 1937; 24: 404-414.

Yoshii T, Funada Y, Ibuki-Ishibashi T, Matsumoto A, Tanimura T, Tomioka K. *Drosophila cry<sup>b</sup>* mutation reveals two circadian clocks that drive locomotor rhythms with different responsiveness to light. **J Insect Physiol** 2004; 50 (6): 479-88.

Yoshii T, Heshiki Y, Ibuki-Ishibashi T, Matsumoto A, Tanimura T, Tomioka K. Temperature cycles drive *Drosophila* circadian oscillation in constant light that otherwise induces behavioural arrhythmicity. **Eur J Neurosci** 2005; 22: 1176–84.

Yoshii T, Sakamoto M, Tomioka K. A temperature dependent timing mechanism is involved in the circadian system that drives locomotor rhythms in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. **Zoolog Sci** 2002; 15: 841–50.

Yoshii T, Vanin S, Costa R, Helfrich-Förster C. Synergic entrainment of *Drosophila's* circadian clock by light and temperature. **J Biol Rhythms** 2009; 24 (6): 452-64.

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

Yuan Q, Metterville D, Briscoe AD, Reppert SM. Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. **Mol Biol Evol** 2007; 24 (4): 948-55.

Zehring WA, Wheeler DA, Reddy P, Konopka RJ, Kyriacou CP, Rosbash M, Hall JC. P-element transformation with *period* locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. **Cell** 1984; 46: 53–61.

Zheng X, Sehgal A. Probing the relative importance of molecular oscillations in the circadian clock. **Genetics** 2008; 178 (3): 1147-55.

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

Zhu H, Sauman I, Yuan Q, Casselman A, Emery-Le M, Emery P, Reppert SM. Cryptochromes define a novel circadian clock mechanism in monarch butterflies that may underlie sun compass navigation. **PLoS Biol** 2008; 6 (1): e4.