

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

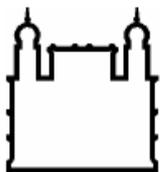
RAYANE TELES DE FREITAS

A influência dos ciclos de temperatura na sincronização do relógio circadiano e amplitude de atividade do mosquito *Aedes aegypti*.

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

Orientadora: Dra. Rafaela Vieira Bruno

Rio de Janeiro
2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: RAYANE TELES DE FREITAS

**A influência dos ciclos de temperatura na sincronização do relógio circadiano
e amplitude de atividade do mosquito *Aedes aegypti*.**

Orientadora: Dra. Rafaela Vieira Bruno

Examinadores:

Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira – Presidente da banca examinadora
FIOCRUZ / Instituto Oswaldo Cruz

Dra. Gisele Akemi Oda
USP / Instituto de Biociências

Dr. Marcos Rochedo Ferraz
UERJ / Departamento de Farmacologia e Psicobiologia

Dr. Marcos Henrique Sorgine
UFRJ / Instituto de Bioquímica Médica

Dr. Fernando Ariel Genta
FIOCRUZ / Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro, 01 de junho de 2015

Dedico esta dissertação a Janaína Teles,
Sâmara Cassani e Rafaela Bruno.



Laboratório de Biologia Molecular de Insetos

Instituto Oswaldo Cruz

Fundação Oswaldo Cruz

Apoio:



Qual o segredo? Amar o que se faz.
Steve Jobs

ÍNDICE

I – Agradecimentos	VIII
II – Lista de figuras e anexos	X
III – Lista de tabelas	XII
IV – Lista de siglas e abreviaturas	XIII
V – Resumo	XVI
VI – Abstract	XVII
<u>1 – INTRODUÇÃO</u>	1
1.1 – Propriedades do relógio circadiano	1
1.2 – O controle genético do relógio circadiano em <i>Drosophila</i>	7
1.3 – Efeitos da luz no relógio circadiano	12
1.4 – Efeitos da temperatura no relógio circadiano	13
1.4.1– Ciclos graduais de temperatura	16
1.4.2– Sincronização neuronal pelos ciclos de temperatura	21
1.4.3– O gene <i>nocte</i> e os órgãos cordotonais	22
1.5 – O relógio circadiano em <i>Aedes aegypti</i>	24
<u>2 – OBJETIVOS</u>	29
2.1 – Objetivo geral	29
2.2 – Objetivos específicos	29
<u>3 – METODOLOGIA</u>	30
3.1 – Criação de mosquitos	30
3.2 – Simulação de regimes graduais em laboratório	30
3.3 – Atividade locomotora	30
3.3.1 – Determinação do <i>onset</i> , <i>offset</i> e picos individuais	31

3.4 – Análise molecular	32
3.4.1 – Análise da expressão de genes do relógio circadiano	32
3.4.1.1 – Extração e purificação de RNA	32
3.4.1.2 – Síntese de cDNA	32
3.4.1.3 – PCR em tempo-real	32
3.4.1.4 – Análise do silenciamento de <i>nocte</i> em mosquitos injetados com dsRNA	34
3.5 – Síntese <i>in vitro</i> de RNA dupla-fita	35
3.5.1 – Clonagem de um fragmento do <i>nocte</i> de <i>Ae. aegypti</i>	35
3.6 – Síntese <i>in vitro</i> de RNA dupla-fita	36
3.7 – Injeção em mosquitos	38
3.8 – Análise estatística	38
<u>4 – RESULTADOS</u>	39
4.1 – Condições Seminaturais	39
4.2 – Sincronização por diferentes ciclos de temperatura	40
4.3 – Atividade sob ciclos de claro/escuro e temperatura	43
4.4 – Expressão de genes do relógio circadiano	46
4.5 – O papel de <i>nocte</i> para a sincronização por ciclos de temperatura	48
<u>5 – DISCUSSÃO</u>	53
<u>6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</u>	60
<u>8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	62

I – Agradecimentos

D. Janaina Teles sempre se orgulhou de dizer que o principal patrimônio que deixaria para os filhos seria a educação, mas acredito que na verdade o que ela nos deu foi o exemplo. Mesmo sendo mãe muito nova, assumiu sua responsabilidade sem fugir à luta. Trabalhar, cuidar da casa, dos filhos e estudar à noite... Sempre me esforcei por ver o seu esforço. Seu exemplo é meu maior incentivo.

Agradeço à Sâmara Cassani. Junto com D. Janaina, foram as pessoas que mais ouviram meus projetos, angústias e expectativas nesses últimos anos. É muito bom contar com aqueles já apoiam mesmo antes de conhecer as nossas loucuras (rsrs).

Agradeço à Rafaela Bruno. Acho que nos tornamos amigas muito antes de aluna ou orientadora. Lembro que as caronas para casa rendiam altos papos sobre ciência desde a iniciação científica. Então veio um dos momentos mais difíceis da minha vida (ou das nossas vidas) e a Rafa literalmente me adotou. Sempre será minha mãe científica. O tipo de orientadora que dá liberdade para a gente fazer o que gosta, incentiva a participação em novos projetos e puxa orelha quando necessário.

Agradeço ao Sr. Fernando de Freitas, meu pai que sem dúvida foi uma das pessoas que mais me influenciaram. Jamais vou esquecer sobre as nossas teorias sobre a origem do universo e das estrelas. Os meus primeiros “papos científicos” que continuam rendendo muito assunto até hoje.

Não menos importante, quero agradecer às seguintes pessoas da minha família pelo apoio incondicional: Leda Freitas (avó), Ezilete Teixeira (avó), Fernando Soares (avô), Rayan Teles (irmão), Maria Fernanda Freitas (irmã), Valéria Freitas (tia), Solange Freitas (tia), Bruna Teixeira (tia), Débora Lisboa (tia), Gleice Lisboa (tia), Luiz Lisboa (padrasto).

Agradeço a Gustavo Rivas, por ter me apresentado ao mundo científico, pela paciência e incentivo. Agradeço a Alexandre Peixoto por ter aberto as portas do seu laboratório, pela oportunidade de conviver e aprender durante esses anos. Junto com a saudade, fica a eterna gratidão. Esse passo não poderia ter sido dado sem seu voto de confiança.

Agradeço à família do laboratório, onde mais do que uma equipe de trabalho encontrei amigos: Karine Padilha, Luana Farnesi, Robson Silva, Lourdes Barros, Christine Barbosa, João Gesto, Israel Pinto, Pablo Lemos, Luciana Araripe, Alejandra Saori e Paulo Amoretty.

Agradeço muitíssimo aos professores que moldaram a minha formação desde a educação básica até o ciclo superior, os represento aqui por: Adriana Nogueira, Soraia Pires, Adriano Alves, Marcos Ferraz, Milton Moraes e Irineu Garcia.

E, não menos importante, agradeço àquelas pessoas que sem parentesco algum cruzaram à minha vida e dividiram momentos especiais, cada um guardando um pedacinho fundamental da minha história: Lindemberg Campos, Jéssica Costa, Bruna Righi, Ercilia Cavalcanti, Miriam Ferreira, Gustavo Gomes, Roberta Calixto.

II – Lista de figuras e anexos

(com versão simplificada das legendas)

Figura. 1.1: Relógio de flores desenhado por Carolus Linnaeus	2
Figura. 1.2: Esquema representando o experimento conduzido por de Mairan	2
Figura 1.3: As três principais propriedades do relógio circadiano.....	4
Figura 1.4: Esquema do sistema de temporização dos ritmos biológicos.....	5
Figura 1.5: Protocolo de diferenciação entre arrastamento e mascaramento.....	6
Figura 1.6: Alça PER-TIM de retro-alimentação	9
Figura 1.7: Alça de retro-alimentação de <i>Clk</i>	11
Figura 1.8: Ciclos de claro/escuro de diferentes fotoperíodos.....	13
Figura 1.9: Ciclos de temperatura de diferentes períodos.....	14
Figura 1.10: Comparativo da atividade de <i>Drosophila</i> em ciclos de temperatura graduais e retangulares.....	17
Figura 1.11: Atividade de mutantes em ciclos de temperatura gradual e escuro constante.....	18
Figura 1.12: Atividade de <i>Drosophila</i> sob ciclos de claro/escuro e temperatura gradual.....	19
Figura 1.13: Atividade de <i>Drosophila</i> na natureza.....	20
Figura 1.14: Esquema representando a distribuição dos neurônios do relógio em <i>D. melanogaster</i>	21
Figura 1.15: Alguns possíveis ortólogos da proteína NOCTE de <i>D. melanogaster</i>	23
Figura 1.16: Atividade de <i>Ae. aegypti</i>	25

Figura 1.17: Atividade de <i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> em ciclos de claro/escuro e de temperatura.....	27
Figura 3.1: Sequencia obtida da região inicial do transcrito de <i>nocte</i>	37
Figura 4.1: Curvas de temperatura natural e simulada.....	39
Figura 4.2: Atividade de <i>Ae. aegypti</i> em escuro constante e diferentes ciclos de temperatura.....	41
Figura 4.3: Actogramas de <i>Ae. aegypti</i> em escuro constante e diferentes ciclos de temperatura.....	42
Figura 4.4: Atividade média em ciclos de claro/escuro e temperatura graduais.....	44
Figura 4.5: Actograma da atividade em ciclos de claro/escuro e temperatura graduais.....	45
Figura 4.6: Análise da expressão de genes do relógio circadiano, na cabeça de <i>Ae. aegypti</i>	47
Figura 4.7: Silenciamento de <i>nocte</i>	49
Figura 4.8: Atividade de mosquitos injetados com dsRNA.....	50
Figura 4.9: Análise do <i>onset</i> , <i>offset</i> e picos.....	51
Figura 5.1: Temperaturas em um mês de inverno e verão no Rio de Janeiro.....	56
Anexo 1: Esquema representando os picos de atividade, o <i>onset</i> e o <i>offset</i> do pico E.....	77

III – Lista de tabelas

Tabela 3.1: Composição das reações de síntese de cDNA.....	33
Tabela 3.2: Composição das reações de qPCR em tempo real por poço.....	34
Tabela 4.1: Análise dos picos em ciclos em fase ou fora de fase	52
Tabela 4.2: Análise do <i>onset</i> do pico E.....	52
Tabela 4.3: Análise do <i>offset</i> do pico E.....	52

IV – Lista de siglas e abreviaturas

a.C. = antes de Cristo

C-terminal = região carboxi-terminal

CK2 = proteína Caseína quinase 2

cDNA = *complementar Desoxiribonucleic Acid* (sequencia complementar de DNA)

Clk = gene *Clock*

CLK = proteína CLOCK

cry = gene *cryptochrome*

CRY = proteína CRYPTOCHROME

cry2 = gene *cryptochrome 2*

CRY2 = proteína CRYPTOCHROME2

cwo = gene *clockwork orange*

CWO = proteína clockwork orange

cyc = gene *cycle*

CYC = proteína CYCLE

C_T- threshold cycle

dbt = gene *double-time*

DBT = proteína DOUBLE-TIME

DN1 = neurônio dorsal 1

DN2 = neurônio dorsal 2

DN3 = neurônio dorsal 3

DNA = *Desoxyribonucleic Acid* (ácido desoxirribonucleico)

dsLacZ = RNA dupla-fita de *LacZ*

dsnocte = RNA dupla-fita de *nocte*

E-box = *Enhancer Box*

E75 = gene *Ecdysone-induced protein 75*

E75 = proteína *Ecdysone-induced protein 75*

H-B eyelet = orifício de *Hofbauer-Buchner's*

IBEx = Instituto de Biologia do Exército

I-LNv = neurônio lateral ventral grande

LNd = neurônio lateral dorsal

LO = lobo ótico

LPN = neurônio lateral posterior

Lux = 1 lumen / m²

mRNA = RNA mensageiro

N-terminal = região amino-terminal

nocte = gene *no circadian temperature entrainment*

Nocte = proteína *No circadian temperature entrainment*

norpA = gene *no receptor potential A*

p = probabilidade de um determinado valor estatístico ter ocorrido ao acaso.

PAS = domínio de dimerização PER-ARNT-SIM (em proteínas)

PCR = Polymerase Chain Reaction (Reação de Polimerase em Cadeia)

per-luc = promotor do gene *period* associado a uma luciferase repórter

Pdp1 = gene *PAR domain protein 1*

Pdp 1 ϵ/δ = isoformas ϵ e δ do gene *PAR domain protein 1*

PDP1 ϵ/δ = isoformas ϵ e δ da proteína *PAR domain protein 1*

per = gene *period*

PER = proteína PERIOD

qPCR = PCR em tempo real

RNA = Ribonucleic Acid (ácido ribonucleico)

RNAi = RNA de interferência

SGG = SHAGGY

s-LNv = neurônio lateral ventral pequeno

t = valor estatístico do *teste t de student*

tim = gene *timeless*

TIM = proteína TIMELESS

V/P-box = VRI/PDP-box

vri = gene *vrille*

VRI = proteína VRILLE

ZT = *Zeitgeber Time* (Tempo de acordo com o Doador de Tempo)

V - Resumo

Mosquitos apresentam ritmos de atividade locomotora e alimentação sanguínea, que são cruciais para a transmissão de diversos patógenos e estão sob o controle de um relógio circadiano endógeno. Estímulos externos exercem uma importante modulação neste relógio, possibilitando o ajuste das funções endógenas com o ambiente. Um dos principais indicadores ambientais capaz de sincronizar o relógio circadiano são os ciclos de temperatura. Em laboratório, pesquisas no modelo *Drosophila melanogaster* vêm mostrando que ciclos de temperatura retangulares (com mudanças abruptas de temperatura) produzem um perfil de atividade diferente de ciclos com variações de temperatura graduais mais próximas ao natural. Assim, procuramos estabelecer um regime seminatural que fosse o mais próximo possível das variações diárias de temperatura ao longo de um dia no Rio de Janeiro. Escolhemos como modelo o mosquito *Aedes aegypti*, o principal vetor da dengue no Brasil. Essa espécie é conhecida por apresentar hábitos diurnos com picos de atividade durante o amanhecer e o crepúsculo. Os ciclos de temperatura graduais que produzimos foram capazes de sincronizar a atividade de *Ae. aegypti*, porém com um perfil diferente do que era observado em ciclos de temperatura retangulares. Na presença dos ciclos de claro/escuro, os ciclos temperatura graduais foram determinantes para amplitude dos picos de atividade e fase do pico principal (pico vespertino). As alterações nos padrões de comportamento parecem refletir alterações moleculares na expressão de genes que compõem o relógio circadiano. Possivelmente os genes da primeira alça (*per*, *tim* e *cry2*) seriam importante para a amplitude, enquanto genes da segunda alça (*vri*, *Pdp1* e *cyc*) participariam do ajuste de fase do pico principal. Nossos resultados sugerem ainda que os ciclos de temperatura sincronizem o relógio através dos órgãos cordotonais. Mosquitos silenciados pela técnica de RNA de interferência para um gene importante no funcionamento dessas estruturas (*nocte*) apresentaram prejuízos na sincronização de sua atividade pelos ciclos de temperatura. Assim, concluímos que os ciclos de temperatura graduais que construímos são eficientes para a sincronização de *Ae. aegypti* e possivelmente poderão contribuir nos estudos de comportamento, permitindo em laboratório uma abordagem mais próxima ao natural. A utilização dos ciclos de temperatura graduais confirma a atuação desse indicador ambiental em sinergia com os ciclos de claro/escuro na promoção da completa sincronização dos ritmos de atividade e expressão circadiana dos organismos.

VI - Abstract

Mosquitoes present locomotor activity and blood feeding rhythms, which are crucial for the transmission of many pathogens and are under the control of an endogenous circadian clock. External stimuli play an important modulation in this clock, enabling adjustment of the endogenous functions with the environment. One of the main environmental indicators able to synchronize the circadian clock are temperature cycles. In laboratory, research in *Drosophila melanogaster* model has shown that rectangular temperature cycles (with abrupt temperature changes) produce a locomotor activity pattern different from cycles with gradual temperature variations, which are closer to those organism in nature. Thus we tried to establish a semi-natural system that was as close as possible to the daily temperature variations observed along one day in Rio de Janeiro. We choose as model the mosquito *Aedes aegypti*, the main dengue vector in Brazil. This species is known to have diurnal activity with peaks at dawn and dusk. The gradual temperature cycles we produced were able to synchronize the activity of *Ae. aegypti*, but with a different profile from the one observed for rectangular temperature cycles. In the presence of light / dark cycles, the gradual temperature cycles were determinat in the amplitude of the peaks of activity and in the phase of the main peak (evening peak). Changes in the behavior patterns seem to reflect molecular alterations in the expression of the circadian clock genes. Possibly, genes from the first regulatory loop (*per*, *tim* and *cry2*) would be important for the amplitude, while the genes from the second regulatory loop (*vri*, *Pdp1* and *cyc*) would participate in the phase adjustment of the main peak. Our results also suggest that temperature cycles synchronize the clock through chordotonal organs. Mosquitoes silenced by RNA interference assay for an important gene in the functioning of these structures (*nocte*) presented loss in the synchronization of their activity temperature cycles. Thus, we conclude that the gradual temperature cycles we produced are effective for synchronizing *Ae. aegypti* and may possibly contribute to studies of behavior, allowing a more natural approach in the laboratory. The use of gradual temperature cycles confirms the importance of this environmental indicator in synergy with the cycles of light / dark to promote full synchronization of the organisms circadian expression and activity rhythms.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Propriedades do relógio circadiano

A maioria dos organismos são submetidos diariamente a ciclos de luz e temperatura devido ao movimento de rotação que a Terra realiza em torno do seu próprio eixo. Ao longo da evolução, diferentes pressões seletivas conduziram os seres a evoluírem desenvolvendo estratégias que permitissem adaptarem suas fisiologias e comportamentos às variações ambientais. Diversas espécies passaram a apresentar oscilações diárias com um período próximo a 24 horas em condições constantes. Tais oscilações foram denominadas por Franz Halberg em 1959 de “ritmos circadianos” (do latim *circa* = cerca e *diem* = dia) (Moore-Ede *et al.*, 1982; Marques & Menna-Barreto, 1999).

Estudiosos como Hipócrates (460 a.C. - 377 a.C.), Aristóteles (384 a.C. - 322 a.C.) e Galeno (129 a.C. -217 a.C.) já sugeriam a importância destes ritmos desde a antiguidade. Thasos, historiador acompanhante de Alexandre, o Grande, em 325 a.C observou em detalhes o movimento periódico diário das folhas de *Tamarindus indicus* (tamarindo), fazendo uma das primeiras descrições com um caráter menos empírico. Neste contexto histórico, destacam-se também as contribuições do naturalista sueco Carolus Linnaeus. Em 1751, Linnaeus propôs um relógio de flores (**figura 1.1**) para marcar as horas do dia baseado no horário característico de diversas espécies de plantas abrirem e fecharem as pétalas de suas flores (Marques & Menna-Barreto, 1999; Moore-Ede *et al.*, 1982).

No entanto, embora não sejam recentes as observações sobre a existência dos ritmos biológicos, por muito tempo acreditou-se que esses eram dirigidos de forma majoritária pelos ciclos ambientais. O primeiro indício da existência de um controle endógeno veio com o trabalho do astrônomo francês Jean-Jacques d’Ortous de Mairan em 1729. Ele realizou experimentos sobre o ritmo de *Mimosa pudica* (“dormideira”) que abre suas folhas durante o dia e as retrai durante a noite. de Mairan expôs estas plantas a condições controladas de escuro constante e observou que, mesmo sem a indicação luminosa, persistia o ato de abrir e fechar de folhas de forma similar (**figura 1.2**) (Marques & Menna-Barreto, 1999).



Figura. 1.1: Relógio de flores desenhado por Carolus Linnaeus. Esquema representa o horário de diversas espécies abrirem e fecharem suas pétalas (retirado de Moore-Ede *et al.*, 1982)



Figura 1.2: Esquema representando o experimento conduzido por de Mairan. Espécimes de *Mimosa pudica* (dormideira) são expostas a luz natural ou ao escuro constante (dentro da caixa de isolamento). Em ambas as condições, estas plantas continuam abrindo suas folhas durante o dia e fechando durante a noite (Amoretty *et al.*, 2013).

Em 1832, outro importante estudo também foi realizado nesta espécie de planta, desta vez pelo botânico suíço Augustin de Candolle. Ele observou que o ritmo do movimento foliar de *Mimosa pudica* em escuro constante apresentava avanços diários, evidenciando uma periodicidade de 22 a 23 horas. Este período próximo, porém não exatamente igual a 24 horas, que é observado nos ritmos de espécimes livres de indicadores ambientais, viria a ser definido mais tarde como “período de livre-curso” e daria inspiração para o nome “circadiano” (cerca de um dia) (Marques & Menna-Barreto, 1999; Johnson *et al.*, 2003). Esta ritmicidade que persiste em livre-curso, mesmo na ausência de indicadores ambientais externos, é considerada uma das principais propriedades do relógio circadiano (**figura 1.3-A**) (revisado em Moore-Ede *et al.*, 1982).

Em livre curso, cada espécie tem seu período específico e ele não se altera mesmo em diferentes temperaturas constantes. Isso ocorre devido à capacidade do relógio conhecida como compensação térmica. Os primeiros estudos sobre essa propriedade vieram com o trabalho de Pittendrigh na década de 1950. Ele observou que a fase de eclosão de *Drosophila pseudoobscura*, que normalmente ocorre pela manhã, não se altera mesmo quando a temperatura é diminuída em 10°C em escuro constante (Pittendrigh, 1954). Sabemos que normalmente, variações de temperatura influenciam a cinética de reações químicas e de processos fisiológicos. Entretanto, graças a propriedade de termo-compensação, o período de livre-curso permanece uniforme em diferentes temperaturas; quando submetidos a condições constantes, dentro da faixa tolerável para a fisiologia de cada organismo (**figura 1.3-B**) (Moore-Ede *et al.*, 1982; Johnson *et al.*, 2003).

Embora os organismos possuam um relógio endógeno, capaz de ditar ritmos diários em condições constantes, os atrasos ou avanços de fase em cada ciclo (dependendo do período da espécie); levaria o relógio endógeno a sair de fase em relação ao dia solar. Neste sentido, os estudos de Colin Pittendrigh a partir da década de 1950 foram fundamentais, demonstrando que o período de livre-curso poderia ser “acertado” por fatores ambientais que indicariam a passagem de tempo (Pittendrigh, 1993; Foster & Kreitzman, 2005). Tal propriedade é denominada de “arrastamento” (**figura 1.3-C**) (Moore-Ede *et al.*, 1982; Marques & Menna-Barreto 1999; Johnson *et al.*, 2003). Os sinais ambientais capazes de sincronizar o relógio são os chamados *Zeitgebers*. A palavra tem origem germânica e significa “indicador (ou doador) de tempo”, sendo os ciclos de claro/escuro e os ciclos de temperatura

os melhores compreendidos em sua capacidade de sincronização do relógio de diversas espécies (Moore-Ede *et al.*, 1982; Marques & Menna-Barreto, 1999).

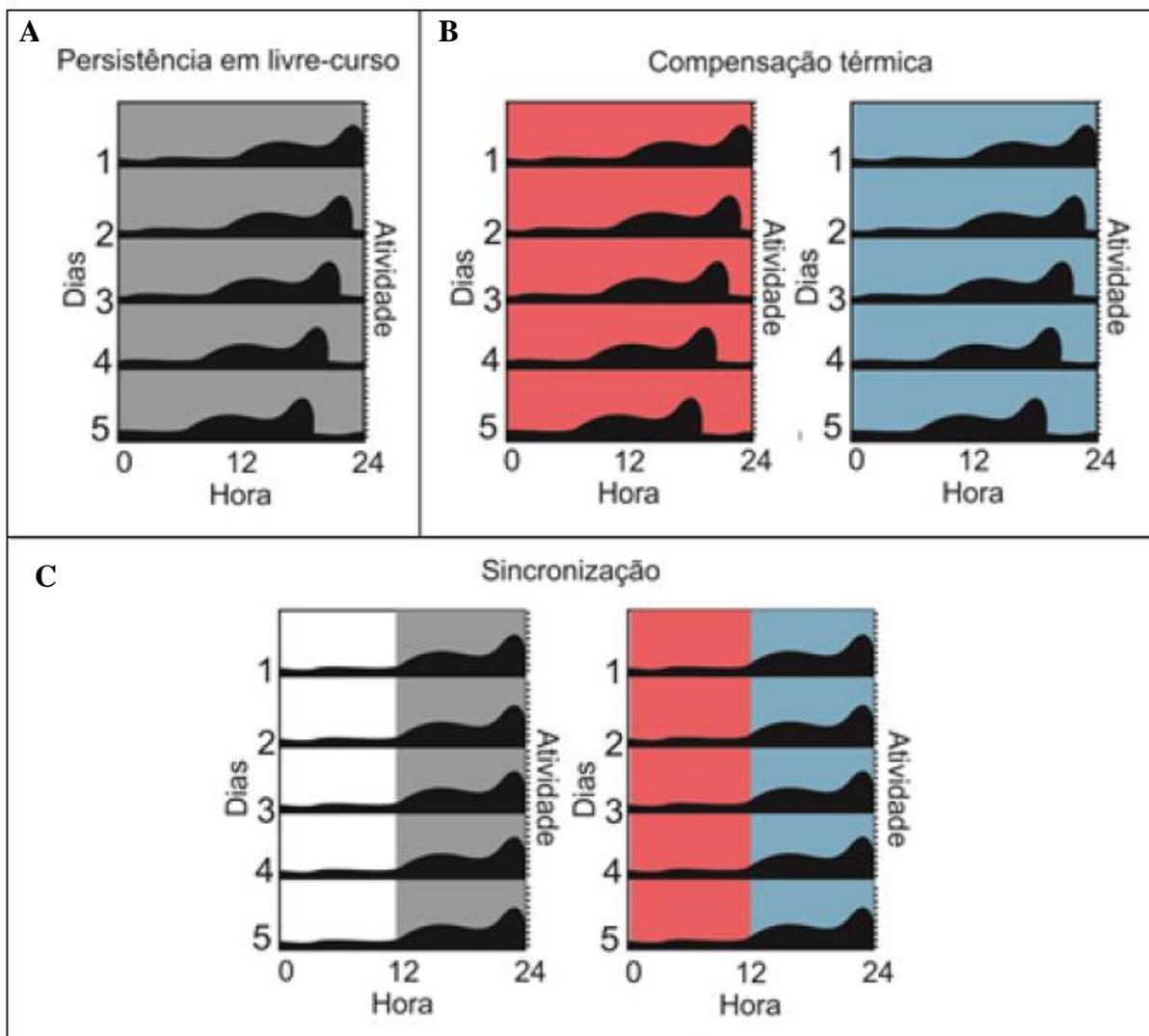


Figura 1.3: As três principais propriedades do relógio circadiano. Esquema representa um padrão comportamental, neste caso a atividade locomotora, de uma espécie hipotética, demonstrando as diferentes propriedades do relógio circadiano. Em cada imagem observa-se o gráfico da atividade (em preto), durante cinco dias (eixo vertical) e ao longo de 24 horas (eixo horizontal). As horas em escuro são demonstradas pela cor cinza e em claro pela cor branca. Horas com temperaturas mais quentes são representadas pela cor vermelha e temperatura mais fria pela cor azul. **A)** Mesmo na ausência de sinais ambientais (escuro e temperatura constantes) observa-se uma ritmicidade na atividade desta espécie. No entanto, como seu período é menor do que 24 horas, a cada dia esta atividade ocorre mais cedo. **B)** Na presença de sinais ambientais como os ciclos de claro/escuro e temperatura quente/frio, observa-se um “acerto” na atividade. **C)** Mesmo em diferentes temperaturas constantes não há alteração no período de livre-curso desta espécie.

É importante diferenciarmos ainda o arrastamento de um efeito conhecido como mascaramento. No arrastamento os ciclos ambientais atuam diretamente no relógio circadiano; gerando, por conseguinte, a sincronização de diversos processos rítmicos. No mascaramento um estímulo ambiental modula a expressão final de um ritmo sem interferir no relógio circadiano (Pittendrigh & Daan, 1976) (**figura 1.4**).

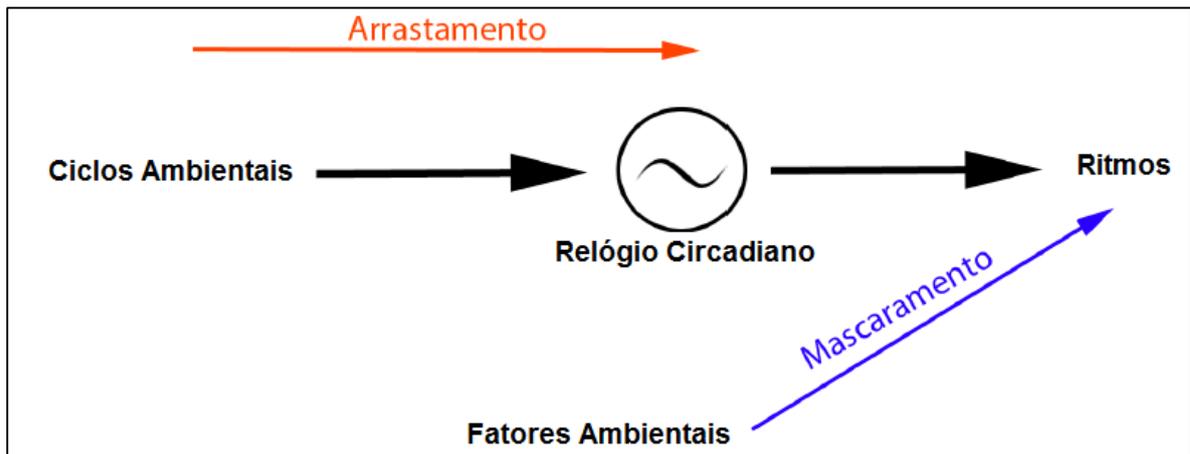


Figura 1.4: Esquema do sistema de temporização dos ritmos biológicos. Embora o mascaramento e o arrastamento produzam efeitos sobre os ritmos, esses mecanismos atuam por diferentes vias. No arrastamento o ciclo ambiental (*Zeitgeber*) ajusta o relógio circadiano, que passa a oscilar com o mesmo período do ciclo, assim como o ritmo gerado. No mascaramento o ciclo ambiental atua diretamente no ritmo observado, sem alterar o período do relógio (modificado de Tomotani & Oda, 2012).

Para saber se um fator ambiental está provocando um arrastamento ou mascaramento alguns testes podem ser feitos em condições totalmente controladas. Um protocolo clássico consiste em primeiramente deixar o organismo em condições constantes durante alguns dias para que o ritmo possa exercer o seu livre-curso (**figura 1.5**). Em seguida submete-se esse organismo ao ciclo ambiental que se deseja testar, enquanto as demais variáveis permanecem constantes. Se o ciclo ambiental conseguir promover um arrastamento ou mascaramento, o ritmo passará a se expressar com o mesmo período do ciclo. Para diferenciar esses dois efeitos, devemos novamente submeter o organismo a condições constantes. Caso o ritmo inicie o seu livre-curso a partir da fase em que estava na presença do ciclo ambiental, consideramos que o ciclo consegue promover o arrastamento. Por outro lado, se a fase for aquela que se esperaria caso o organismo nunca tivesse sido

exposto ao ciclo, é sinal que o efeito trata-se de um mascaramento (**figura 1.5**) (Aschoff, 1960).

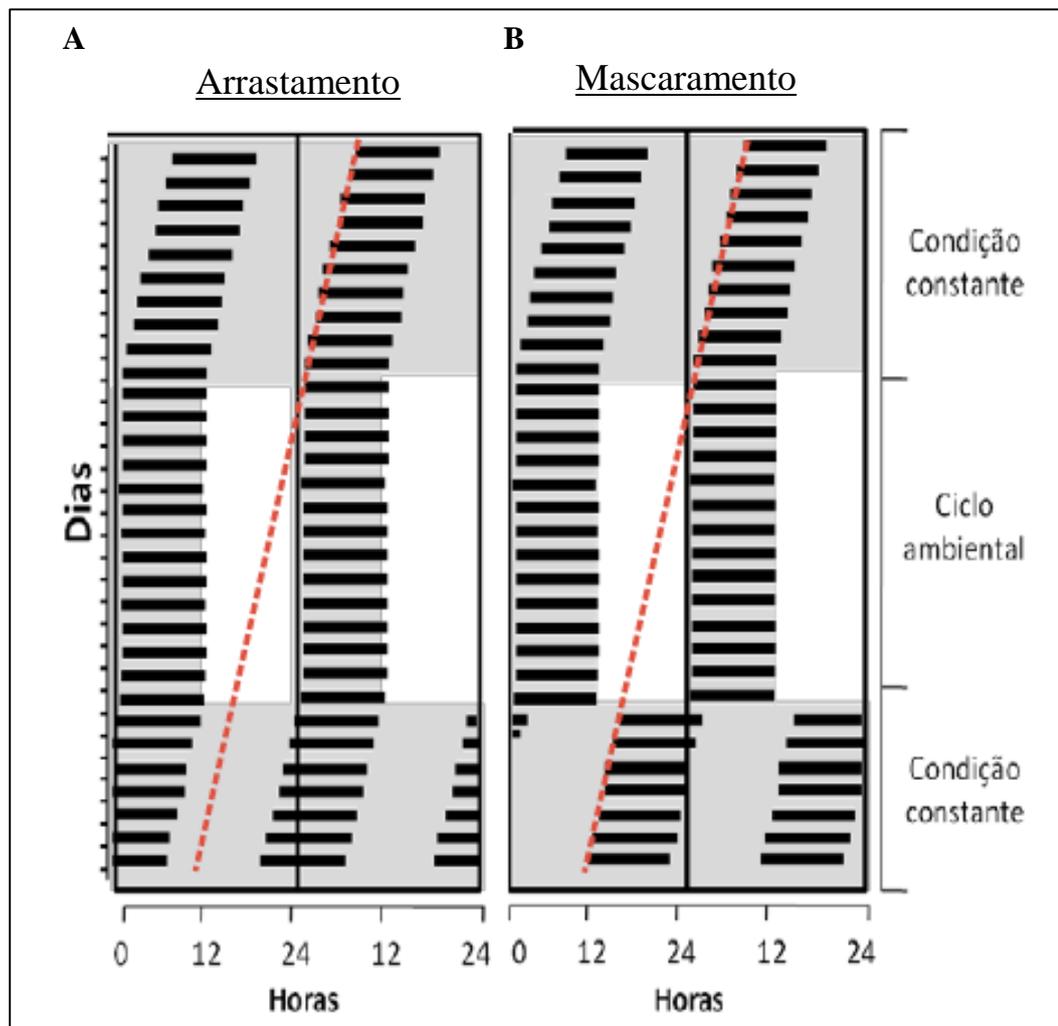


Figura 1.5: Protocolo de diferenciação entre arrastamento e mascaramento. Cada gráfico foi duplamente plotado em escala de 48 horas. Nesses gráficos hipotéticos, cada linha representa um dia e as barras pretas indicam os momentos de mais intensidade de um ritmo (Ex: atividade locomotora). Supondo que o fator ambiental testado seja os ciclos de claro/escuro, o fundo cinza indicaria a fase escura e o branco indicaria a fase clara. Primeiramente o animal é mantido em condição constante e em seguida são introduzidas variações cíclicas. Por último a condição constante é retomada. Em ambos, os gráficos o período da espécie hipotética é menor do que 24 horas em condições constantes. **A)** Observamos como se apresentaria o ritmo caso o ciclo ambiental provocasse um arrastamento. **B)** Observamos o ritmo caso o ciclo ambiental provocasse um mascaramento (modificado de Tachinardi, 2012).

1.2 – O controle genético do relógio circadiano em *Drosophila*

A partir da década de 1970, os estudos sobre ritmos circadianos tomam um rumo novo. No Instituto de Tecnologia da Califórnia, Ron Konopka e Seymour Benzer submetem drosófilas a mutagênicos químicos e isolaram três linhagens que apresentavam padrões anormais nos ritmos de emergência de pupas em adultos e também nos ritmos de atividade e repouso (Saunders, 2002). As linhagens selvagens de *Drosophila*, em livre curso, apresentavam um período próximo a 24 horas com um padrão de atividade e repouso rítmico (Konopka & Benzer, 1971). No entanto, as linhagens mutantes isoladas variavam o seu período e ritmicidade, tendo uma delas período em livre curso de 19 horas, outra de 29 horas e a terceira possuía indivíduos arrítmicos. Konopka e Benzer observaram que tais alterações no padrão comportamental eram provenientes de mutações no mesmo *locus*, o qual denominaram *period*, sendo assim identificado o primeiro gene relacionado ao controle de um comportamento em organismos vivos. Os mutantes receberam o nome de *per^{short}* (*per^s*) no caso da linhagem com menor período, *per^{long}* (*per^l*) para a linhagem com maior período ou *per⁰¹* para a linhagem arrítmica (Konopka & Benzer, 1971; Saunders, 2002).

Somente cerca de dez anos depois, a equipe de Jeffrey Hall, Michael Rosbash e Michael Young conseguiram clonar *per* e identificar as mutações das linhagens de Konopka & Benzer (Bargiello & Young 1984; Reddy *et al.*, 1984; Bargiello *et al.*, 1987; Yu *et al.*, 1987). O grupo de Michael Young em 1994 também reportou a descoberta de um mutante para outro *locus*, denominado *timeless* (*tim*), que não apenas apresentava arritmicidade em seu comportamento, como também parecia alterar a oscilação circadiana da expressão do RNA de *per*. A sequência gênica do alelo selvagem *tim*, de seu mutante e da estrutura de sua proteína foram caracterizados e identificado que TIM seria capaz de se ligar à proteína PER, através do domínio PAS (PER-ARNT-SIM) dessa, formando o heterodímero PER-TIM (Sehgal *et al.*, 1994, 1995; Gekakis *et al.*, 1995; Myers *et al.* 1995).

A partir de então multiplicaram-se os grupos trabalhando com genes de controle do comportamento circadiano e, por conseguinte, o número de investigações acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação do marcapasso endógeno. Diversos genes que compõem o relógio de *Drosophila* foram identificados. Os principais e mais bem caracterizados, além de *period* e *timeless*,

são *Clock (Clk)* (Allada *et al.*, 1998), *cycle (cyc)*, (Rutila *et al.*, 1998), *cryptochrome (cry)* (Stanewsky *et al.*, 1998), *doubletime (dbt)* (Kloss *et al.*, 1998; Price *et al.*, 1998), *shaggy (sgg)* (Martinek *et al.*, 2001), *casein kinase 2 (CK2)* (Lin *et al.*, 2002a, Akten *et al.*, 2003), *vri* (*vri*) (Glossop *et al.*, 2003), *PAR domain protein 1 ϵ e δ (Pdp1 ϵ/δ)* (Cyran *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2009), *clockwork orange (cwo)* (Kadener *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2007) e *Ecdysone-induced protein 75 (E75)* (Kumar *et al.*, 2014).

Atualmente, compreende-se que esse conjunto de genes formam alças auto-regulatórias que ciclam com um período próximo a 24 horas mesmo em condições ambientais constantes (revisado em Hardin, 2011). Neste marcapasso endógeno as proteínas CLOCK (CLK) e CYCLE (CYC), ao longo do dia e início da noite; formam um heterodímero que se liga ao sítio E-box (CACGTG) nas regiões promotoras de *per* e *tim*, induzindo a transcrição desses genes (**figura 1.6**). Tal ativação leva a um aumento de expressão que atinge seu nível máximo no início da noite (Darlington *et al.*, 1998). Em meados do horário noturno, observam-se os níveis mais elevados de TIM. O acúmulo de PER ocorre cerca de 2 horas depois e essa diferença se justifica pela estabilização deste exercida por TIM. A quinase DOUBLETIME (DBT) fosforila PER, marcando-a para degradação via proteossoma (Edery *et al.*, 1994; Kloss *et al.*, 1998; Price *et al.*, 1998; Kloss *et al.*, 2001). No entanto, uma vez que TIM aumenta suas concentrações, PER associa-se a essa proteína, formando o heterodímero PER-TIM. Isto estabiliza PER, protegendo-a da fosforilação e subsequente degradação exercida por DBT (Price *et al.*, 1995; Stanewsky, 2002, 2003; Taghert & Lin, 2005; Yu *et al.*, 2006).

DBT, por sua vez, associa-se ao heterodímero PER-TIM, formando o complexo PER-TIM-DBT (Kloss *et al.*, 2001). A fosforilação de PER pela CK2 e de TIM por SGG promove a migração deste complexo para dentro do núcleo, onde ocorre uma interação com CLK-CYC (Martinek *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2002a; Akten *et al.*, 2003; Chang & Reppert, 2003). O complexo, então, promove a fosforilação de CLK por meio de DBT, o que reprime a ligação do fator transcricional CLK-CYC às regiões promotoras dos genes controlados por ele, como *period* e *timeless* (**figura 1.6**) (Yu *et al.*, 2006; revisado em Hardin, 2011).

Com a interrupção da transcrição de *per* e *tim*, os níveis de suas proteínas começam a cair no meio da noite. No início do dia, a exposição à luz provoca um

"acerto" no relógio através de uma flavoproteína denominada CRYPTOCHROME (CRY). CRY sofre uma mudança conformacional na presença de luz que permite sua ligação a TIM. Isso desencadeia uma série de eventos envolvendo fosforilação e ubiquitinação de TIM que culmina com a degradação desta proteína via proteossoma (Stanewsky *et al.*, 1998; Suri *et al.*, 1998; Naidoo *et al.*, 1999; Emery *et al.*, 2000a; Lin *et al.*, 2001; Rieger *et al.*, 2003; Busza *et al.*, 2004). Nas primeiras horas da manhã, TIM já alcança seu nível mais baixo, resultando também na diminuição de PER até meados do dia. Com a ausência da repressão exercida por PER-TIM-DBT, CLK-CYC consegue se ligar e ativar novamente a transcrição de *per* e *tim*, recomeçando o ciclo da primeira alça de retroalimentação (Stanewsky, 2003; Taghert & Lin, 2005) (**figura 1.6**).

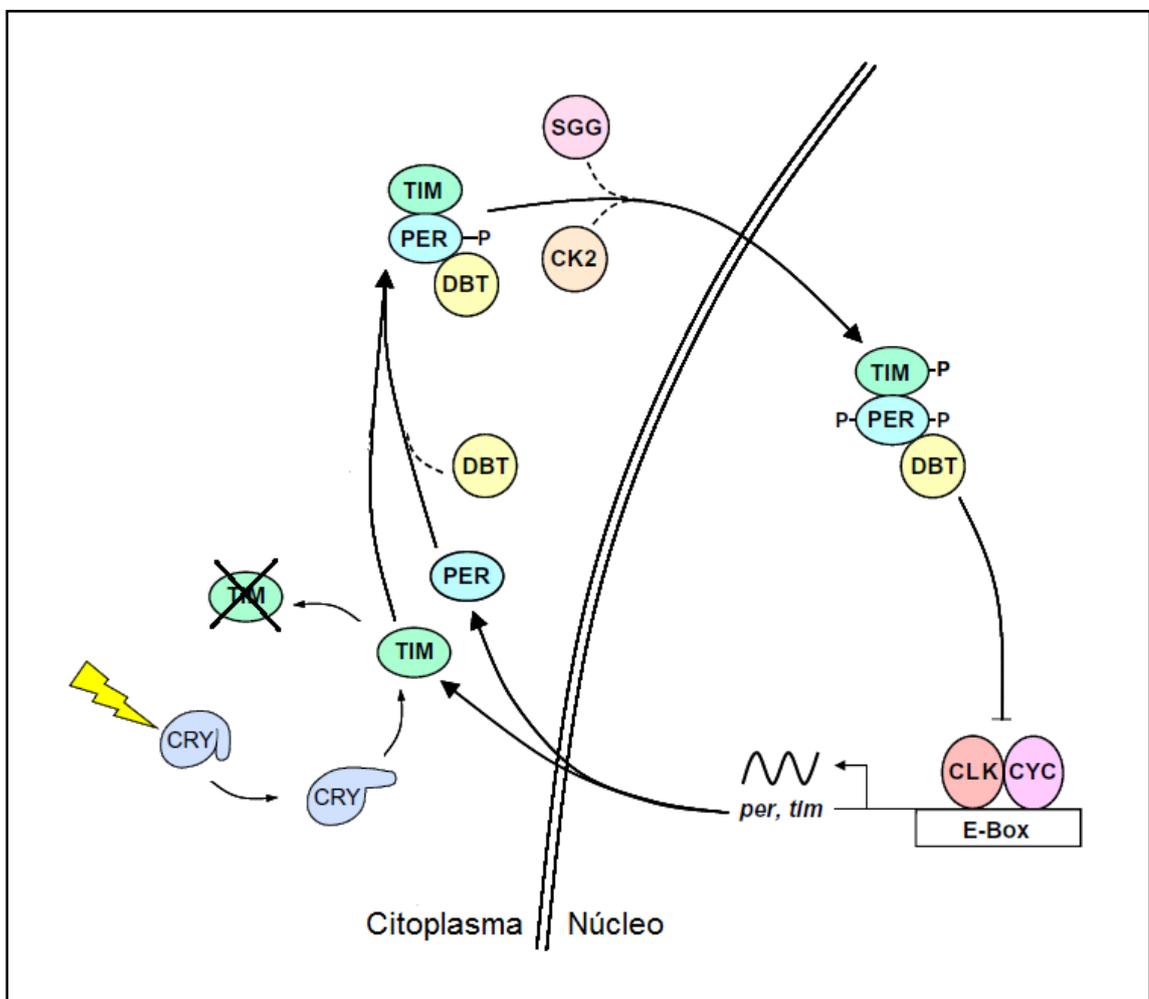


Figura 1.6: Alça PER-TIM de retro-alimentação. Todos os genes e proteínas estão como descritos no texto. A linha dupla representa o envelope nuclear; a linha sinusoidal, a expressão rítmica do RNA mensageiro; a linha pontilhada, a montagem e localização de etapas; setas, o fluxo de etapas; setas bloqueadas, a repressão transcricional; P, o sítio de fosforilação, proteína marcada com X, degradação (modificado de Hardin, 2011).

CWO, uma proteína mais recentemente descoberta, também teria a capacidade de inibir CLK-CYC. O gene *clockwork orange* (*cwo*) possui em sua região promotora um sítio E-box, sendo ativado por CLK-CYC. A proteína CWO se ligaria a sítios E-boxes na região promotora tanto do seu, quanto de outros genes, o que inibiria por competição a atuação de CLK-CYC (**figura 1.7**). Além disso, CWO é responsável pela manutenção da amplitude de ciclagem de *per*. (Kadener *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2007).

Com relação aos ritmos de *Clk* e *cyc*, observa-se que *cyc* apresenta níveis constitutivos tanto em sua proteína quanto em seu transcrito (Rutila *et al.*, 1998). O mRNA de *Clk*, no entanto, exibe variações rítmicas, ciclando em fase oposta a *per* e *tim*, com abundância máxima nas primeiras horas do dia. O controle transcricional de *Clk* é exercido por VRI, PDP1 ϵ/δ e E75. Nesta segunda alça regulatória, o heterodímero CLK-CYC reconhece o sítio E-box na região promotora e ativa a transcrição dos genes de *vri* e *pdp1* ϵ/δ . (**figura 1.7**) (Zheng *et al.*, 2009). O acúmulo do RNA mensageiro e da proteína de *vri* e *pdp1* ϵ/δ , no entanto, ocorrem com cinéticas distintas (Cyran *et al.*, 2003).

No caso de *vri*, sua proteína e transcrito apresentam fases parecidas, com níveis mais elevados no início da noite. Neste momento, VRI liga-se ao sítio V/P box (VRI/PDP-box) na região promotora de *Clk*, promovendo sua inibição. O RNA mensageiro de *Pdp1* ϵ/δ só atinge sua concentração máxima cerca de 3 a 6 horas depois do de *vri*, provavelmente devido a diferenças na meia-vida de seus transcritos ou na região promotora destes genes. Estas diferenças se estendem ao nível proteico. Observa-se um atraso médio de 4 horas entre o pico de VRI e o momento em que PDP1 ϵ/δ atinge seu nível máximo. Com os aumentos de PDP1 ϵ/δ , ocorre a ligação destas proteínas ao sítio V/P box, o que ativa a transcrição de *Clk* (**figura 1.7**) (Cyran *et al.*, 2003, Zheng *et al.*, 2009, revisado em Hardin, 2011).

Como já citado, estudos recentes apontam para o papel de um terceiro fator na modulação da expressão de *Clk*, denominado *Ecdysone-induced protein 75* (E75). E75 é um receptor nuclear hormonal induzido por ecdisona, que inibiria a transcrição de *Clk* sozinho ou em combinação com VRI e possivelmente funcionaria como um elo entre o relógio e sinais extracelulares (**figura 1.7**) (Kumar *et al.*, 2014). A indução de E75 por hormônios esteróides como a ecdisona provavelmente permite

ao relógio responder ao sistema endócrino e é possível que o relógio também regule *E75*, uma vez que experimentos prévios já mostraram a ligação de CLK ao promotor desse gene (Abruzzi *et al.*, 2011). PER teria a capacidade de inibir a atividade de *E75* no promotor de *Clk*, talvez por afetar diretamente a ligação de *E75* ao DNA ou até mesmo desestabilizando essa proteína. Assim, esses estudos recentes acrescentam um novo papel a PER, envolvendo-a no controle transcricional de *Clk* (Kumar *et al.*, 2014).

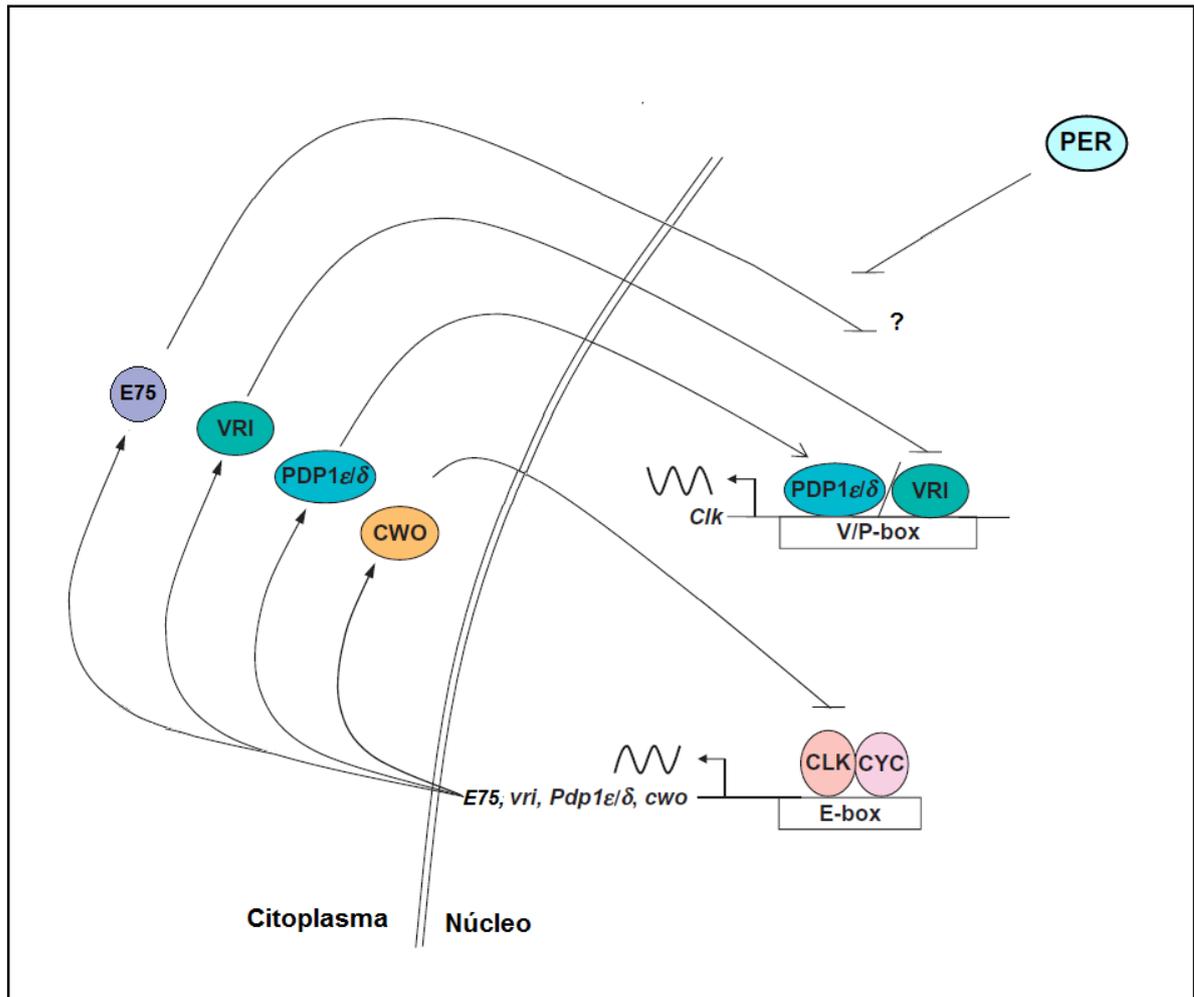


Figura 1.7: Alça de retro-alimentação de *Clk*. Todos os genes e proteínas estão como descritos no texto. A linha dupla representa o envelope nuclear; a linha sinusoidal, a expressão rítmica do RNA mensageiro; setas fechadas, tradução; setas abertas, ativação; setas bloqueadas, a repressão; ponto de interrogação, indica o desconhecimento sobre como *E75* exerce seu mecanismo de repressão (modificado de Hardin, 2011).

VRI, E75, PDP1 ϵ/δ e PER apresentam funções antagônicas para a regulação transcricional de *Clk*. A diferença no acúmulo dessas proteínas propicia uma modulação rítmica diária no mRNA de desse gene. No entanto, curiosamente, a proteína CLK não cicla (Cyran *et al.*, 2003; Houl *et al.*, 2006, Yu *et al.*, 2006, Zheng *et al.*, 2009). O que se observa é uma variação rítmica em seu estado de fosforilação. Ao longo do dia, o padrão hiperfosforilado e menos estável desta proteína diminui; enquanto o padrão hipofosforilado e mais estável tende a aumentar, coincidindo com o momento de maior transcrição dos genes controlados por CLK-CYC (Kim & Edery, 2006; Yu *et al.*, 2006).

1.3 – Efeitos da luz no relógio circadiano

Drosophila melanogaster é conhecida por apresentar um comportamento bimodal, com um pico de atividade no começo da manhã (pico M, do inglês; *morning peak*) e outro no final da tarde (pico E, do inglês; *evening peak*). Desde a década de 70, Pittendrigh e Daan, observando a influência dos ciclos de claro/escuro, propunham que o pico M e o pico E seriam o efeito de dois osciladores distintos, influenciados pelo amanhecer e crepúsculo, respectivamente (Pittendrigh e Daan, 1976). De fato, dentre os fatores ambientais, o ciclo de claro/escuro se destaca como um dos mais importantes. A sensibilidade a esse indicador ambiental é tão grande que mesmo ciclos de claro/escuro de baixíssima amplitude (0,03 lux na fase clara) ou de diferentes fotoperíodos (**figura 1.8**) são capazes de sincronizar o relógio de *D. melanogaster* (Helfrich-Förster, 2001; Bachleitner *et al.*, 2007).

Os ritmos de bioluminescência produzidos por *per-luc* (promotor do gene *period* associado a uma luciferase repórter) mostram que mesmo células isoladas são capazes de se sincronizar aos ciclos de claro/escuro. CRY parece ser o fotorreceptor intracelular responsável por essa sincronização autônoma em diversas células, incluindo tecidos periféricos (pernas, asas etc) e nos neuronais que controlam o comportamento locomotor (Emery *et al.*, 1998; Stanewsky *et al.*, 1998; Egan *et al.*, 1999; Ishikawa *et al.*, 1999; Selby *et al.* 1999; Emery *et al.*, 2000; Levine *et al.*, 2002). Moscas *cry^b*, com uma mutação pontual e ausência da função fotorreceptora ou mutantes nulos *cry⁰* permanecem rítmicos quando expostos a luz constantemente, condição em que o tipo selvagem torna-se rapidamente arritmico,

presumivelmente devido à contínua ativação de CRY e degradação de TIM (Emery *et al.* 2000; Dolezelova *et al.*, 2007).

No entanto, embora CRY seja o principal componente capaz de receber a informação luminosa, a ausência dessa flavoproteína não torna *Drosophila* arritmica em ciclos de claro/escuro. Isso porque os ciclos de claro/escuro podem exercer sua sincronização por outras vias como os fotorreceptores externos (olhos compostos e ocelos) e o orifício de Hofbauer-Buchner's (*H-B eye/let*) (Helfrich-Forster *et al.*, 2001; Rieger *et al.*, 2003; Veleri *et al.*, 2003). Por isso, apenas a perda conjugada de *cry*, dos fotorreceptores externos e de *H-B eye/let* gera drosófilas com um comportamento arritmico em ciclos de claro/escuro (Helfrich-Forster *et al.*, 2001).

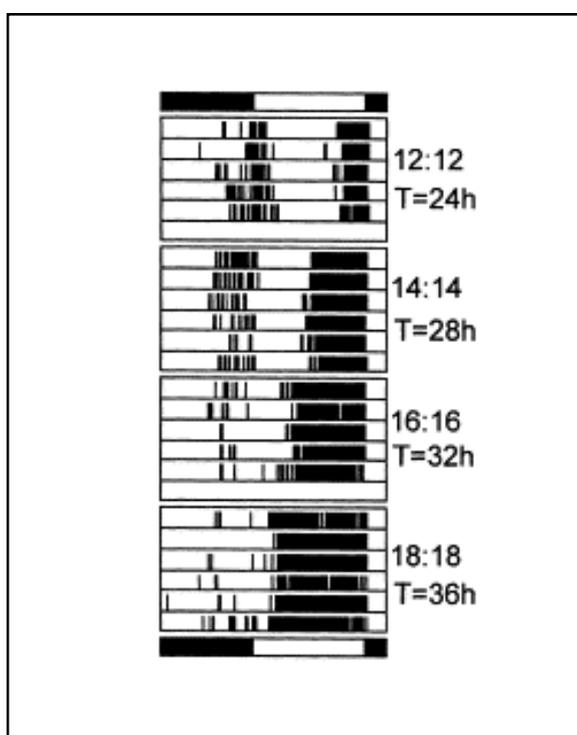


Figura 1.8: Ciclos de claro/escuro de diferentes fotoperíodos. Drosófilas foram submetidas a fotoperíodos de 24 horas (T=24), 28 horas (T=28), 32 horas (T=32) ou 36 horas (T=36). Em ambos os ciclos a duração da fase clara é a mesma da fase escura, ou seja, 12:12, 14:14, 16:16 e 18:18 e a temperatura é constante. A sincronização ocorre em todos os ciclos observados (modificado de Helfrich-Förster, 2001).

1.4 – Efeitos da temperatura no relógio circadiano

Assim como os ciclos de claro/escuro, os ciclos de temperatura também são um importante fator ambiental para o ajuste do relógio circadiano. No entanto, pelo menos em *Drosophila*, a força desse *Zeitgeber* parece ser menor do que os ciclos de

claro/escuro. Isso porque apenas ciclos de temperatura com duração de 24 horas conseguem sincronizar os ritmos de atividade. Em ciclos maiores ou menores essas moscas assumem um comportamento de livre-curso (**figura 1.9**) (Yoshii *et al.*, 2002). Talvez por isso, até pouco tempo a maioria dos trabalhos se preocupavam em entender apenas a atuação dos ciclos de claro/escuro e negligenciavam a influência dos ciclos de temperatura. Assim, nessa revisão introdutória focaremos em apresentar a importância dos ciclos de temperatura para a sincronização dos ritmos circadianos.

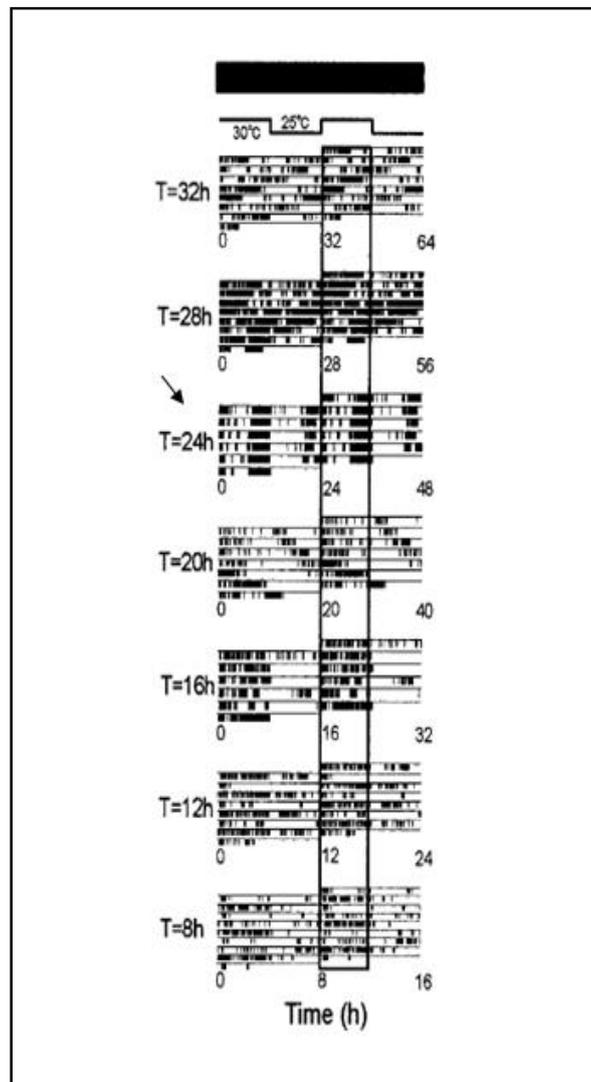


Figura 1.9: Ciclos de temperatura de diferentes períodos. Drosófilas foram submetidas a ciclos de temperatura com o período de 8, 12, 16, 20, 24, 28 ou 32 horas. Em ambos os ciclos a duração da fase quente é a mesma da fase clara e elas estão em escuro constante. A sincronização só ocorre em ciclos de 24 horas (seta) (modificado de Yoshii *et al.*, 2002).

A sincronização por esse indicador ambiental recrutar o relógio circadiano. Mutantes *dClk^{Jrk}*, *cyc⁰¹*, *per⁰¹* e *tim⁰¹*, que apresentam ausência de transcritos dos genes do relógio, apresentam padrões rítmicos anormais. No entanto, a contribuição desses genes pode ser diferente. Mutações em componentes da segunda alça como em *dClk^{Jrk}* e *cyc⁰¹* provocaram prejuízos maiores à sincronização do que as mutações em *per⁰¹* e *tim⁰¹* (Yoshii *et al.*, 2002).

De fato, a temperatura exerce uma importante influência no relógio endógeno. PER e TIM, por exemplo, oscilam em ciclos de temperatura mesmo em claro constante, condição que normalmente provocaria uma arritmidade nessas proteínas (Yoshii *et al.*, 2005; Myers *et al.*, 1996). Além da variação da abundância proteica, estudos indicam que este agente sincronizador é capaz de modular a expressão rítmica de diversos genes, constituintes ou não da maquinaria circadiana (Yoshii *et al.*, 2007; Boothroyd *et al.*, 2007).

Os ciclos de temperatura também podem ter um papel na adaptação a mudanças sazonais. Em dias frios e com uma fotofase curta, característicos do final do outono, inverno e começo da primavera, drosófilas são mais ativas durante a manhã. Já em dias quentes com uma fotofase longa, típicos do verão, observa-se um atraso nessa atividade. Isso pode ser relacionado com a ocorrência de um *splicing* alternativo que remove um intron na região 3'UTR de *period*. Esse mecanismo acontece com maior frequência em temperaturas mais baixas, o que aumenta a estabilidade do transcrito e promove um acúmulo prematuro dos níveis da proteína PER nestas condições. PER ao entrar no núcleo, promove a inibição de CLK-CYC mais cedo que o normal, fazendo com que a atividade de drosófila se inicie antecipadamente em dias mais frios (Majercak *et al.*, 1999; revisado em Glaser & Stanewsky, 2007).

A proteína fosfolipase C, codificada pelo gene *norpA*, parece estar envolvida na regulação deste *splicing* alternativo. Mutantes deficientes em *norpA* apresentam transcritos com a remoção intrônica mesmo em temperaturas quentes (Collins *et al.*, 2004; Majercak *et al.*, 2004). Além da participação na adaptação sazonal, a mutação em *norpA* afeta o padrão rítmico de *per* e a sincronização da atividade locomotora de drosófilas submetidas a ciclos de temperatura (Glaser & Stanewsky, 2005).

1.4.1– Ciclos graduais de temperatura

Embora a maioria dos estudos sejam baseados em ciclos de temperatura artificiais retangulares (12h fase quente / 12h fase fria, por exemplo), na natureza os ciclos de temperatura ocorrem de forma gradual, com mínimas ao amanhecer e máximas 2h após o meio-dia (Yoshii *et al.*, 2009; Vanin *et al.*, 2012). Assim, recentemente alguns trabalhos vêm se preocupando em entender o real papel dos ciclos de temperatura graduais para a sincronização de *D. melanogaster*. Em 2009, Yoshii e colaboradores demonstraram pela primeira vez que os ciclos de temperatura graduais, assim como os ciclos retangulares, podem sincronizar e arrastar a atividade dessas moscas quando provocado um atraso de 6 horas na fase do ciclo (**figura 1.10 A-C**). No entanto, essa atividade assume um perfil distinto do que era observado em ciclos retangulares.

Quando submetidas a ciclos graduais e escuro constante, o pico M ocorre logo após o amanhecer, sendo constituído aparentemente por vários subpicos, enquanto o pico E parece acontecer por volta do ZT8 (ZT= *Zeitgeber Time*), ou seja, oito horas após o início do ciclo (**figura 1.10 D**). Por outro lado, sob ciclos retangulares e escuro constante o pico E ocorre no ZT4, não há evidências de um pico M e sim do que chamamos na cronobiologia de *startle response*, um pico que ocorre na transição entre a fase fria e a fase quente e que se deve muito mais a um artefato experimental do que a um efeito do relógio circadiano (**figura 1.10 E**) (Yoshii *et al.*, 2009). O pico M e o pico E observados em ciclos graduais de temperatura parecem ser sincronizados pelo amanhecer e crepúsculo, respectivamente. Bywalez e colaboradores (2012) sugerem que o pico M responda ao aumento de temperatura matinal, enquanto o pico E seja influenciado pelo decréscimo de temperatura vespertino. Já para Currie e colaboradores (2009) o pico E seja o reflexo do aumento e decréscimo de temperatura, que simultaneamente sincronizam este pico para coincidir com o horário de maior temperatura.

Em todo caso, o relógio circadiano parece ser fundamental para a sincronização dessa atividade, visto que linhagens mutantes nulas como *Clk^{Jrk}* perdem completamente o padrão bimodal de atividade sob ciclos de temperatura graduais. Esses mutantes apresentam sua menor e maior atividade concomitantemente com a máxima e mínima temperatura, além de se tornarem imediatamente arrítmicos em temperatura constante. Isso nos sugere que estejam

apenas seguindo as flutuações térmicas, sem qualquer influência circadiana (**figura 1.11 A**) (Bywalez *et al.*, 2012).

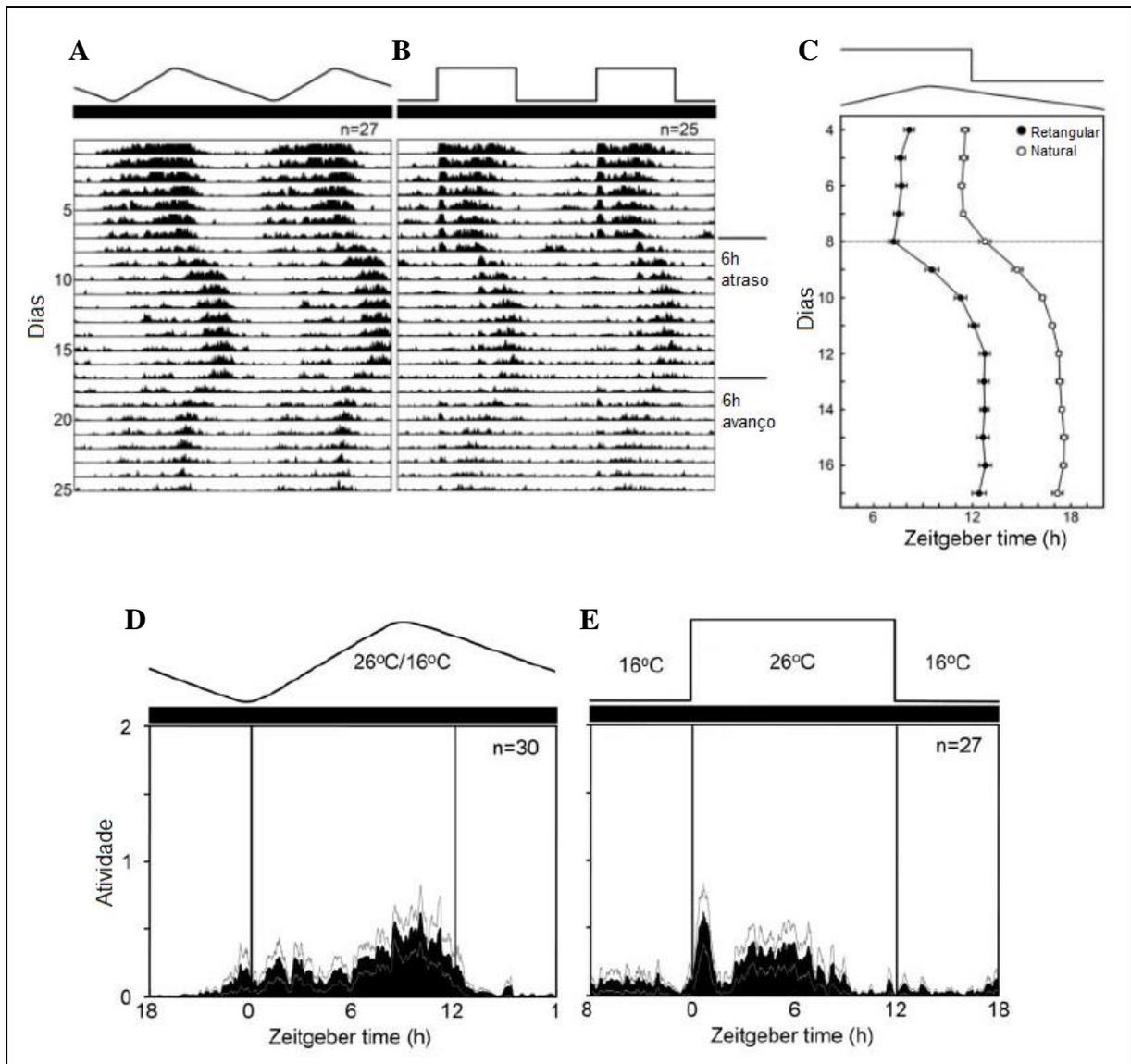


Figura 1.10: Comparativo da atividade de *Drosophila* em ciclos de temperatura graduais e retangulares. (A) Arrastamento por ciclos de temperatura graduais e **(B)** retangulares. **(A-B)** As moscas foram sincronizadas durante 7 dias, em seguida os ciclos de temperatura foram atrasados em 6h e mantidos por mais 10 dias, subsequentemente os ciclos foram adiantados em 6h e mantidos por 8 dias, **(C)** A trajetória da fase do pico principal de atividade antes e depois do arrastamento em ciclos graduais (símbolo branco) e retangular (símbolo preto). **(D)** Perfil médio de atividade durante dias em ciclos de temperatura graduais e **(E)** retangulares. n = número de indivíduos utilizados em cada experimento (modificado de Yoshii *et al.*, 2009).

No entanto, embora o relógio seja fundamental, a deficiência na sincronização pelos ciclos de temperatura pode ser atenuada de acordo com o gene mutante afetado. Indivíduos da linhagem mutante *per⁰¹* conseguem apresentar um padrão bimodal sob ciclos graduais (6:18, 26°C:16°C) que persiste pelo menos por um dia quando transferidos para temperaturas constantes (**figura 1.11 B**) (Bywalez *et al.*, 2012). A diferença de comportamento encontrado entre as linhagens *Clk^{Jrk}* e *per⁰¹* poderia ser explicada pelos efeitos em *Clk^{Jrk}* serem mais drásticos ao relógio do que *per⁰¹* ou porque a segunda alça regulatória (*Clk*, *Vri*, *Pdp1ε/δ*, *E75*) seja suficiente para sincronizar a atividade pelos ciclos de temperatura graduais em *per⁰¹*.

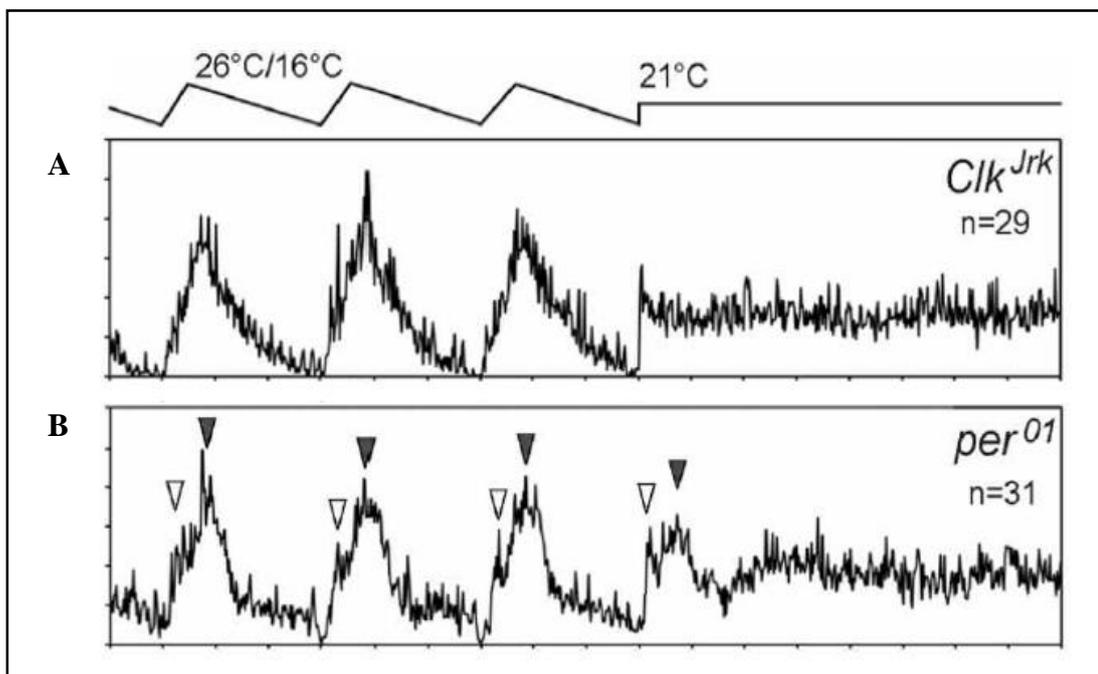


Figura 1.11: Atividade de mutantes em ciclos de temperatura gradual e escuro constante. (A) Atividade média de mutantes *Clk^{Jrk}* e **(B)** *per⁰¹* que foram sincronizados por ciclos de temperatura graduais (6:18, 26°C/16°C) e, em seguida, transferidos para uma temperatura constante. **(B)** O pico M e o pico E são representados com setas abertas e fechadas, respectivamente. n = número de indivíduos utilizados em cada experimento.

Os estudos dos ciclos de temperatura graduais em escuro constante são fundamentais para entendermos isoladamente o papel deste importante indicador ambiental. Contudo, na natureza, os ciclos de temperatura são acompanhados dos ciclos de claro/escuro. Uma vez que ambientalmente o aumento de temperatura acontece durante o dia e a queda durante a noite, é esperado que as sincronizações exercidas pelos ciclos de claro/escuro e de temperatura estejam em fase se o

acender e o apagar das luzes coincidirem respectivamente com os horários de menor e maior temperatura.

A exposição de *D. melanogaster* aos ciclos de claro/escuro e de temperatura concomitantemente em fase resultou em um comportamento diurno com um perfil muito parecido ao observado em ciclos de claro/escuro e temperatura constante, excetuando apenas uma redução na amplitude do pico M (**figura 1.12 A**). Já a submissão a ciclos de claro/escuro e de temperatura em fases opostas resulta em um robusto avanço (5h a 6h) no início do pico E (**figura 1.12 B**) (Currie *et al.*, 2009). Esse efeito aparentemente requer uma interação entre os ciclos de claro/escuro e de temperatura uma vez que o aumento da atividade ocorre em um horário do dia em que nenhum dos ciclos produz tal efeito isoladamente. Em resumo, tais resultados indicam que na natureza os ciclos de claro/escuro e de temperatura atuam em sinergia para promover uma completa sincronização dos ritmos circadianos.

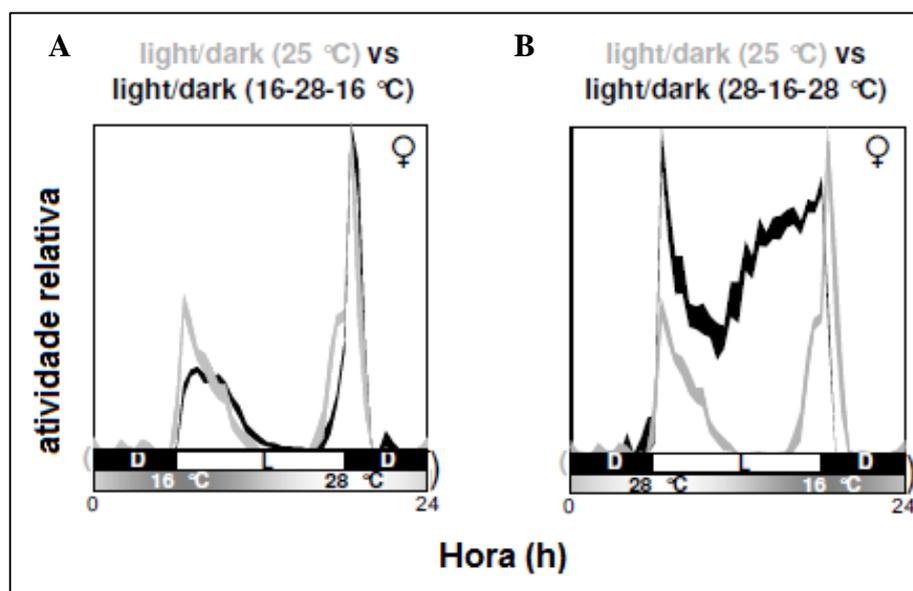


Figura 1.12: Atividade de *Drosophila* sob ciclos de claro/escuro e temperatura gradual. (A) Atividade sob ciclos de claro/escuro e temperatura constante (cinza) ou ciclos de claro/escuro e temperatura gradual em fase (preto). **(B)** Atividade sob a ciclos de claro/escuro e temperatura constante (cinza) ou ciclos de claro/escuro e temperatura gradual fora de fase (preto) (modificado de Currie *et al.*, 2009).

Para entender melhor a influência destes ciclos na natureza, Vanin e colaboradores (2012) monitoraram a atividade de milhares de drosófilas fora do laboratório durante a primavera, verão e outono em duas regiões, Leicester (Reino

Unido) e Treviso (Itália). A principal diferença dos dados obtidos em campo para o que era conhecido em laboratório foi o surgimento de um terceiro pico de atividade no meio da tarde, denominado pico A (*afternoon peak*) (**figura 1.13 A**). Vanin e colaboradores asseguram que este pico seja modulado pelo relógio, uma vez que observou sua antecipação em linhagens mutantes como *per^S* e *per⁰¹*. De e colaboradores (2013), no entanto, contestam esses resultados e afirmam não terem encontrado diferença de fase no pico A entre moscas controle e mutantes *per^S*, *per^l* e *per⁰*. Embora o assunto ainda seja bastante controverso, ambos os grupos concordam em um aspecto: a influência da temperatura sob o pico A. Para o grupo de Vanin, a proporção de drosófilas que o apresentam está diretamente relacionada com o aumento da média térmica diária (**figura 1.13 B**). Já para o grupo de De o pico A ocorre em resposta ao estresse das altas temperaturas à tarde.

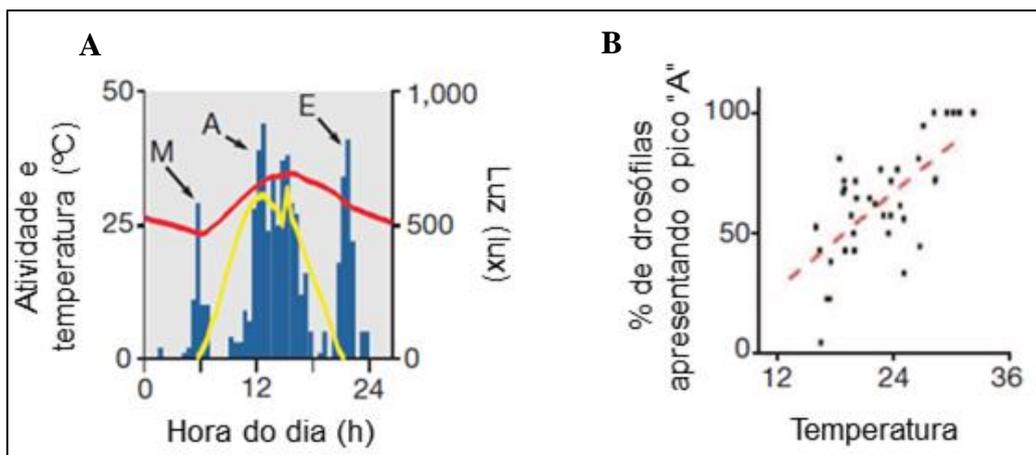


Figura 1.13: Atividade de *Drosophila* na natureza (A) Atividade locomotora individual de um macho de *D. melanogaster* em um dia de verão, média diária de temperatura de 28,7 °C, máxima de 34,4°C e mínima de 23,4°C. “M”, “A” e “E” representam os picos M, A e E; respectivamente. Em azul observa-se a atividade locomotora, em amarelo a intensidade de luz e em vermelho de temperatura. **(B)** Pico da tarde é associado com a temperatura ($R^2 = 0,34$; $F_{1,32} = 17,7$; $P < 0,0002$) (modificado de Vanin *et al.*, 2012).

1.4.2– Sincronização neuronal pelos ciclos de temperatura

Em *D. melanogaster*, o circuito neuronal circadiano é constituído de aproximadamente 150 neurônios subdivididos de acordo com sua localidade, tamanho, padrão de projeção ou neuropeptídeo constituinte (Nitabach & Taghert, 2008). Esses grupos são os neurônios laterais ventrais grandes (l-LNV) e pequenos (s-LNV), os neurônios laterais dorsais (LNd), os neurônios laterais posteriores (LPN) e três tipos de neurônios dorsais (DN1–DN3) (**figura 1.14**). Alguns trabalhos sugerem que os grupos neuronais LPN e DN2, sejam mais sensíveis à temperatura, uma vez que são preferencialmente arrastados por esse *Zeitgeber* em condições conflitantes, quando os ciclos de luz e temperatura estão em fases opostas (Miyasako *et al.*, 2007; Yoshii *et al.*, 2010).

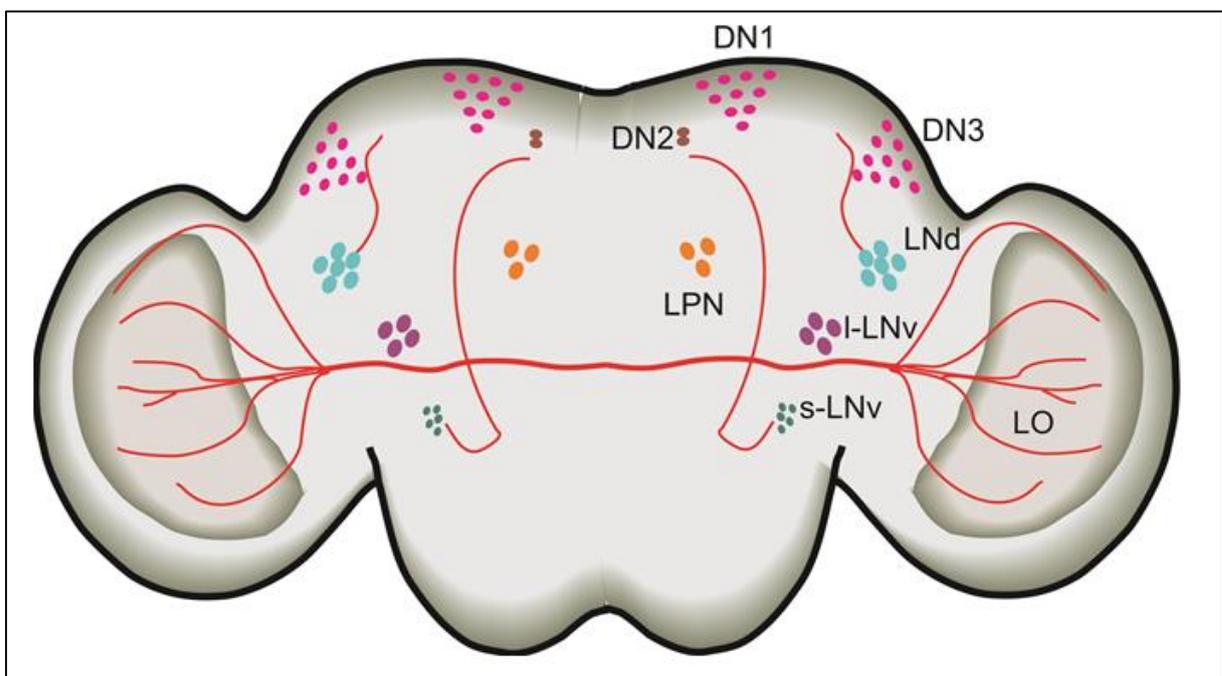


Figura 1.14: Esquema representando a distribuição dos neurônios do relógio em *D. melanogaster*. Círculos laranja mostram a localização dos neurônios laterais posteriores (LPN), os azuis apontam os neurônios laterais dorsais (LNd), os lilases indicam os neurônios laterais ventrais grandes (l-LNV), os verdes exibem a localização nos neurônios laterais ventrais pequenos (s-LNV), os rosas apontam os neurônios dorsais 1 e 3 (DN1 e DN3), em marrom são mostrados os neurônios dorsais 2 (DN2) e visualizamos ainda a região do lobo ótico (LO). Imagem meramente ilustrativa, não há relação com o quantitativo de neurônios em cada região (modificado de Amoretty *et al.*, 2013).

Curiosamente, LPN e DN2 não expressam CRY, o que levou à hipótese de que os neurônios CRY-negativos seriam os responsáveis por mediar a sincronização pelos ciclos de temperatura (Yoshii *et al.*, 2010). No entanto, drosófilas que possuem um relógio funcional apenas nos neurônios CRY-positivos conseguem sincronizar-se com os ciclos de temperatura (Busza *et al.*, 2007).

Um estudo recente pode ajudar a elucidar tal questão. Gentile e colaboradores (2013a) sugerem que os neurônios CRY-positivos são de fato importantes para a sincronização por temperatura, mas que CRY atuaria de algum modo inibindo este mecanismo. Na presença dessa flavoproteína, esses neurônios são mais influenciados pelos ciclos de claro/escuro. No entanto, eles conseguem ser sincronizados pelos ciclos de temperatura em situações que o nível de CRY diminui, como em claro constante que leva à degradação ininterrupta desta proteína (Gentile *et al.*, 2013a).

Este mesmo trabalho aponta que distintos grupos neuronais podem atuar em diferentes faixas térmicas. Os neurônios ventrais seriam mais importantes em ciclos de baixas temperaturas, enquanto que os dorsais dominariam em ciclos de altas temperaturas. CRY interferiria com a sincronização térmica nos neurônios dorsais, tanto ao nível molecular, quanto comportamental (Gentile *et al.*, 2013a).

1.4.3– O gene *nocte* e os órgãos cordotonais

Embora diferentes neurônios do oscilador circadiano consigam sincronizar-se aos ciclos de temperatura, em cérebros isolados essa resposta não ocorre, pois a informação é passada através dos órgãos periféricos (Sehadova *et al.*, 2009). A principal estrutura capaz de perceber as variações térmicas e transmiti-la aos demais osciladores periféricos são os órgãos cordotonais (Sehadova *et al.*, 2009). Estes componentes atuam como mecanotransdutores, tendo muitos deles sido implicados na propriocepção, na detecção da vibração ou na percepção da gravidade (Kernan, 2007; Simoni *et al.*, 2014). A mutação em um gene denominado *nocte* (*no circadian temperature entrainment*) acarreta alterações estruturais e funcionais nos órgãos cordotonais, causando prejuízos à sincronização da expressão gênica e a sincronização da atividade pelos ciclos de temperatura (Glaser & Stanewsky, 2005; Sehadova *et al.*, 2009).

Sehadova e colaboradores (2009) descrevem NOCTE como uma proteína rica em cadeias de poli-glutamina e poli-alanina, com uma discreta similaridade na sua região N-terminal a um domínio presente em BAT2 de mamíferos, mas sem qualquer homologia com uma família proteica. A proteína BAT2 é codificada por um dos genes presentes no complexo MHC de classe III, e estaria associada; entre outras coisas, à idade de desenvolvimento do diabetes tipo I, a processos inflamatórios no pâncreas e ao desenvolvimento de artrite reumatoide em humanos (Banerji *et al.*, 1990; Hashimoto *et al.*, 1999; Singal *et al.* 2000).

O domínio encontrado em NOCTE e BAT2, embora apresente uma semelhança global para os cerca de 70 aminoácidos fraca, inclui 11 aminoácidos idênticos. No entanto, a função desse domínio permanece desconhecida. Assim, se por um lado qualquer extrapolação sobre a atuação de NOCTE possa ser difícil baseada unicamente no domínio BAT2, por outro Sehadova e colaboradores (2009) ao observarem a sequência de aminoácidos dessa proteína, ressaltam a baixa concentração de cisteínas e sugerem uma atuação intracelular. Ainda segundo eles, a presença de regiões poli-Q e poli-A, juntamente com a ausência de domínios de ligação ao DNA suportariam a hipótese de NOCTE funcionar como um cofator transcricional. Por fim, o estudo realizado por Sehadova e colaboradores (2009) se estendeu para uma análise comparativa com outras espécies, descrevendo ortólogos deste gene em diferentes insetos, incluindo vetores como o *Aedes aegypti* (figura 1.15) (Sehadova *et al.*, 2009).

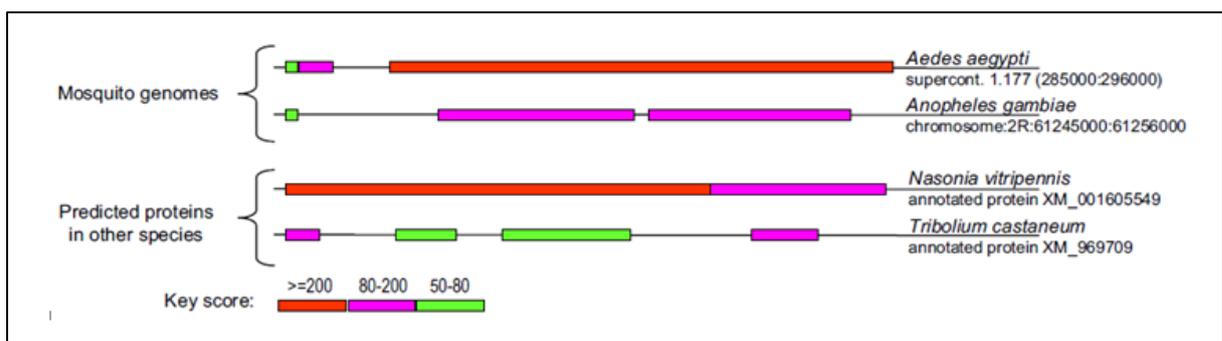


Figura 1.15: Alguns possíveis ortólogos da proteína NOCTE de *D. melanogaster*. Observados em *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae* (Diptera), na vespa *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera), e no besouro *Tribolium castaneum* (Coleoptera). O Key score mostra o grau de similaridade (modificado de Sehadova *et al.*, 2009).

1.5 – O relógio circadiano em *Aedes aegypti*

Apesar de *Drosophila melanogaster* ser um bom modelo e concentrar grande parte da genética molecular do relógio circadiano, evidências apontam que os relógios de insetos podem ser bastante distintos entre si (Tomioka & Matsumoto 2010), demonstrando que o que é compreendido em *Drosophila* não pode ser totalmente extrapolado para as demais espécies.

Em mosquitos hematófagos, os ritmos de atividade e alimentação sanguínea, que são cruciais para a transmissão de doenças, também estão sob o controle de um relógio circadiano endógeno (revisado em Clements, 1999; Saunders, 2002). O mesmo pode ser dito para diferentes aspectos da fisiologia, que desempenham um papel importante na competência vetorial e também para a resposta imune e metabolismo (Das & Dimopoulos, 2008).

Um mosquito de grande importância epidemiológica é o *Aedes aegypti*, vetor comumente conhecido pela transmissão da dengue e da febre amarela. Esses mosquitos de hábitos diurnos, quando expostos a ciclos de claro/escuro, apresentam picos matinais (M) e vespertinos (E) em suas atividades de locomoção. No entanto, diferentemente de *D. melanogaster*, não há indícios de uma regulação circadiana para o pico M, visto que apenas o pico E permanece em escuro constante com um período de aproximadamente 22,5h (**figura 1.16**) (Taylor & Jones, 1969; Jones, 1981; Gentile *et. al*, 2009). O pico M poderia ser entendido como o que chamamos em cronobiologia de mascaramento; ou seja, um efeito provocado por uma determinada condição que gera uma resposta imediatista, mas sem o recrutamento do relógio circadiano.

Embora o controle circadiano se restrinja a um dos picos de atividade, o relógio não se faz menos importante nesta espécie. Muito pelo contrário, estudos de microarranjo demonstram que diversos genes envolvidos no crescimento, desenvolvimento, imunidade e resposta a inseticidas apresentaram um padrão de expressão rítmico e poderiam estar sendo modulados pelo relógio (Ptitsyn *et al.*, 2011; Leming *et al*, 2014). Além disso, esse marcapasso endógeno parece ter também um papel na dinâmica de transmissão de doenças, visto que fêmeas de *Aedes aegypti* infectadas com vírus da Dengue 2 apresentaram uma atividade aumentada em seu pico vespertino (Lima-Camara & Bruno *et al.*, 2011).

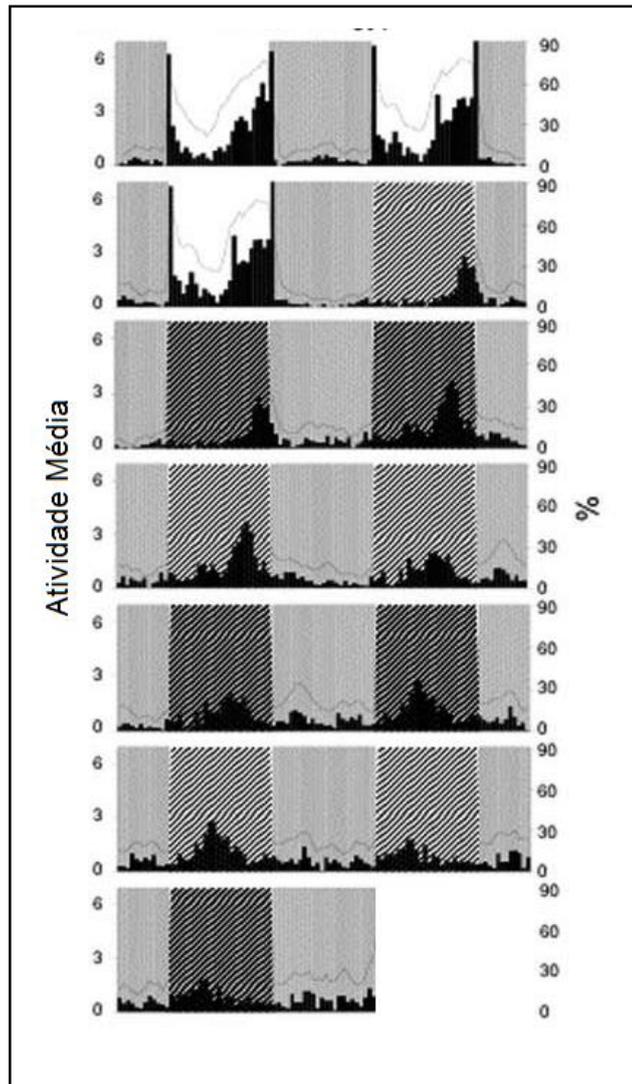


Figura 1.16: Atividade de *Ae. aegypti*. Actograma duplamente plotado mostrando os padrões de atividade locomotora de *Ae. aegypti* sob dois dias em claro/escuro e cinco dias em escuro constante. Os fundos branco e cinza representam a fase clara e a fase escura, enquanto o fundo hachurado indica a fase clara subjetiva em escuro constante. As linhas representam a porcentagem de atividade dos indivíduos (modificado de Gentile *et al.*, 2009).

Em um dos primeiros estudos a investigar as bases moleculares do relógio circadiano em *Ae. aegypti*, o nosso grupo realizou a análise comparativa da expressão de genes do relógio circadiano entre *Ae. aegypti* e o mosquito noturno *Culex quinquefasciatus* (Gentile *et al.*, 2009). Ambas as espécies parecem ter um padrão de expressão bastante conservado para os principais genes do relógio

circadiano (*Clk, cyc, per, tim, vri, Pdp1* e *cry1*), com exceção de *cry2* que apresenta um único pico de expressão em *Culex* e um padrão bimodal em *Aedes* (Gentile *et al.*, 2009). A proteína CRY2 está ausente em *Drosophila*, mas é encontrada em diversos insetos, como borboletas, besouro e abelhas; por exemplo, onde atua como um repressor do fator transcricional CLK-CYC (Shearman *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2007). Especula-se que as diferenças observadas na expressão de *cry2* poderiam contribuir para os distintos padrões de atividade encontrados em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* (Gentile *et al.*, 2009).

Nosso grupo também estendeu a análise comparativa entre as duas espécies para melhor compreender o papel de indicadores ambientais na sincronização da atividade desses mosquitos. Submeteu-se *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* a ciclos de claro/escuro e de temperatura retangulares em fase ou fora de fase. Sob os ciclos em fase, *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* mantêm os padrões característicos de uma espécie diurna e noturna, concentrando suas atividades durante a fase clara-quente e a fase escura-fria, respectivamente. No entanto, quando os ciclos são colocados em fases opostas, as duas espécies ficam mais ativas durante à noite (fase escura-quente) (**figura 1.17 A-D**), sugerindo que os ciclos de temperatura possam exercer uma influência maior nos padrões de atividade locomotora em *Ae. aegypti* do que em *Cx. quinquefasciatus* (Rivas, 2010).

Com relação ao perfil de atividade, nota-se diferenças nos picos de atividade em mosquitos *Ae. aegypti* expostos a ciclos em fase comparado aos ciclos fora de fase. O autor propõe que essa diferença ocorra devido ao tipo de equipamento do experimento, uma vez que a incubadora utilizada promoveu ciclos de claro/escuro com transições abruptas, enquanto a temperatura demorava cerca de 1h para descer ou subir completamente durante as transições. Sendo assim, quando submetidos a ciclos em fase, o pico M apresenta valores mais baixos e está submetido a temperaturas baixas, enquanto o pico E apresenta níveis mais elevados e está sujeito a temperaturas altas. O efeito oposto é observado em ciclos de claro/escuro e de temperatura fora de fase. Portanto, em ambos os casos, o ciclo de temperatura parece modular a resposta às transições de luz em *Ae. aegypti*, tendo temperaturas baixas um efeito inibitório sobre os picos de atividade, enquanto temperaturas altas produzem o efeito oposto (Rivas, 2010).

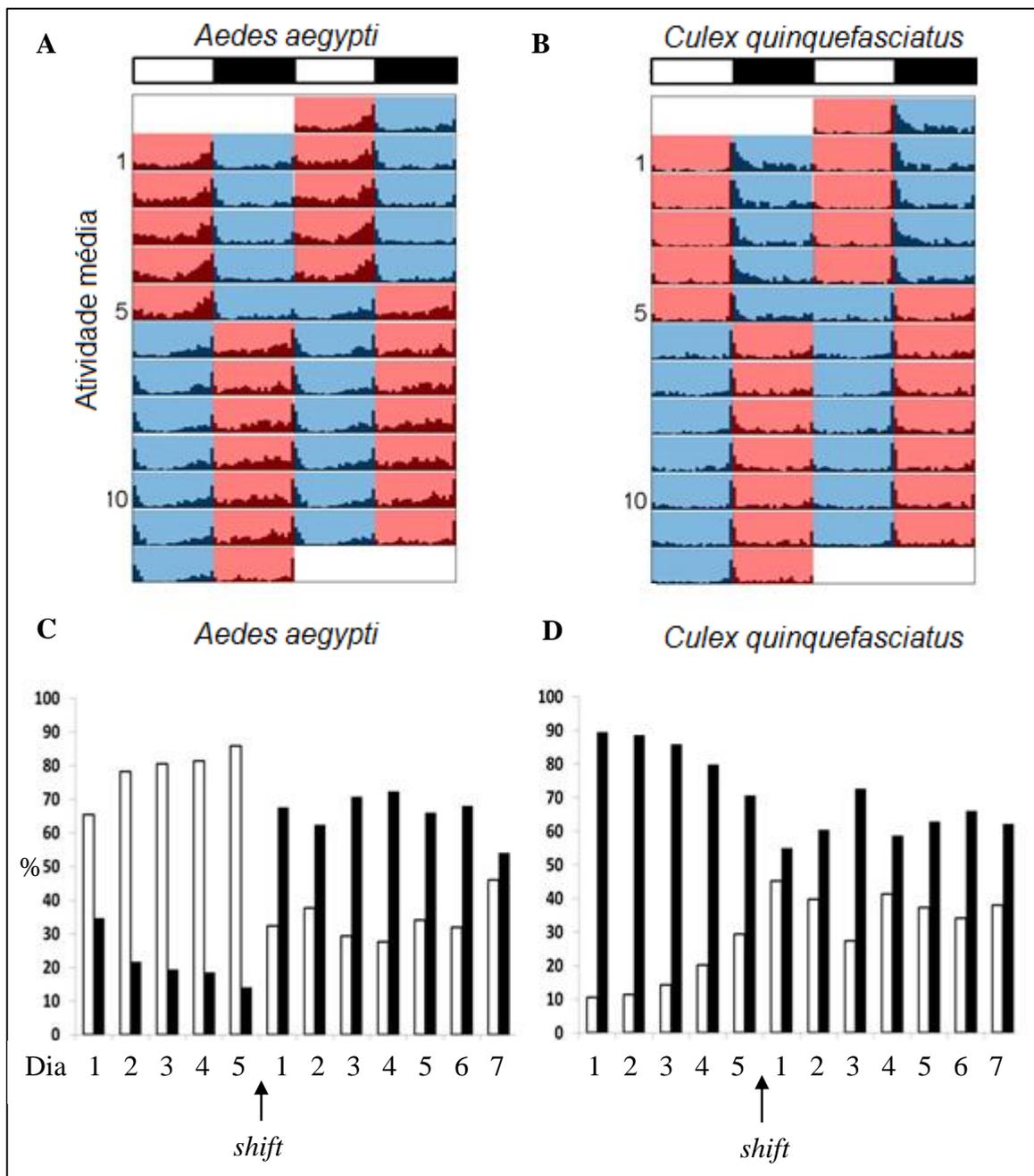


Figura 1.17: Atividade de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em ciclos de claro/escuro e de temperatura. Actogramas duplamente plotado, mostrando a atividade locomotora de *Ae. aegypti* e **(B)** *Cx. quinquefasciatus* em cinco dias de ciclos retangulares de claro/escuro e temperatura em fase, seguidos de sete dias em ciclos retangulares fora de fase. Horas na fase quente (30°C) são representadas pela cor vermelha e na fase fria (20°C) pela cor azul. As barras horizontais brancas e pretas representam a fase clara e a fase escura, respectivamente. **(C)** Proporções de atividade locomotora de *Ae. aegypti* e de **(D)** *Cx. quinquefasciatus* para cada dia de experimento. As barras verticais brancas representam o dia (fase clara-quente em LDTC ou a fase clara-fria em LDCT) e as barras verticais pretas representam a noite (fase escura-fria em LDTC ou a fase escura-quente em LDCT) (Rivas *et al.*, em preparo).

Interessantemente, se essa observação estiver correta, é provável que similar efeito sob os picos de atividade desses mosquitos possam ocorrer na natureza uma vez que, como citado anteriormente, os ciclos de temperatura naturais acontecem de forma gradual com mínimas ao amanhecer e máximas ao final da tarde. Assim, procuramos compreender melhor nesse trabalho a importância da temperatura para a amplitude de atividade do vetor *Ae. aegypti*. Avaliamos os efeitos dos ciclos graduais de claro/escuro e temperatura sob os ritmos de atividade e expressão circadiana, observamos as implicações do silenciamento de *nocte* por RNA de interferência e comparamos a sincronização exercida por ciclos de temperatura graduais versus retangulares.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Analisar a influência dos ciclos de temperatura seminaturais sobre a sincronização do relógio circadiano e amplitude de atividade do mosquito *Ae. aegypti*.

2.2 – Objetivos específicos

- Estabelecer o perfil de oscilação de luz e temperatura observados na natureza ao longo de 24 horas.
- Comparar a sincronização da atividade de *Ae. aegypti* por ciclos de temperatura graduais e retangulares.
- Analisar a atividade e expressão dos genes do relógio de *Ae. aegypti* sob ciclos de claro/escuro e temperatura graduais.
- Observar os efeitos do *knockdown* de *nocte* para a sincronização e amplitude da atividade de *Ae. aegypti*.

3 – METODOLOGIA

3.1 – Criação de mosquitos

Ovos de *Ae. aegypti* da linhagem Rockefeller foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (Instituto Oswaldo Cruz) que mantém colônias no IBEx (Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro, Brasil). Os ovos foram estimulados a eclodir em água destilada miliQ durante 1 a 2 dias. Após a eclosão, 500 larvas foram separadas por bacia contendo 1,5 litros de água miliRO e alimentadas, a cada 3 dias, com 1g de ração para gatos Friskies® (Purina). As pupas foram recolhidas diariamente em pequenos copos plásticos e transferidas para gaiolas de papelão cilíndricas de 17,5 cm de altura e 16,5 cm de diâmetro. Na fase adulta, para manter as fêmeas virgens, separamo-las dos machos com intervalos máximo de 12 horas após a emergência. Elas permaneceram em gaiolas e foram alimentadas com solução de sacarose a 10% até o dia de cada experimento. Durante a criação, desde ovos até adultos, os mosquitos foram mantidos em regime de claro/escuro (12 horas a 1500 lux, 12 horas a 0 lux) e temperatura constante de 25°C em incubadora (Precision Scientific, modelo 818). Em cada experimento utilizamos fêmeas virgens com idade entre 1 a 3 dias.

3.2 – Simulação de regimes graduais em laboratório

Para simular os ciclos de claro/escuro com subidas graduais de luminosidade durante o amanhecer e o crepúsculo, utilizamos um sistema de iluminação com LED controlado por computador (HLT Powerbus USB station, Hoenig Lichttechnik Ltd.). Já a simulação tanto dos ciclos de temperatura graduais quanto retangulares foi possível graças ao sistema de rampas de temperaturas acoplado à incubadora Solab – SL225/ 334, baseado em protocolo descrito por Yoshii e colaboradores (2009).

3.3 – Atividade locomotora

Em todos os ensaios de atividade, fêmeas virgens de *Ae. aegypti* tiveram seus ritmos observados ao longo do experimento através de uma versão maior do

Monitor de Atividade de *Drosophila* (TriKinetics, Waltham, Massachusetts, USA). Neste equipamento, os mosquitos são individualmente acomodados em pequenos tubos de vidro de 7 cm de comprimento, 1 cm de diâmetro externo, e diâmetro interno entre 0,7 e 0,8 cm. Colocamos algodão umedecido em solução de sacarose 10% em uma das extremidades do tubo e selamos ambas as extremidades com *parafilm*. Os tubos são posicionados em monitores especiais contendo sensores de movimento que compreendem um ponto de emissão e um de detecção de raio infravermelho. Quando o inseto está ativo, ele caminha pelo tubo e interrompe o feixe de luz infravermelha. Essa informação é passada, através de um cabo, para um computador que registra o evento através do programa *DAMSystem data collection software* versão 2.0.6 (Trikinetics Waltham, MA, USA). A análise dos dados seguiu a metodologia descrita em Rivas (2010). Os actogramas foram feitos com o auxílio do programa ActogramJ (Schmid *et al.*, 2011). Tanto o perfil geral de todos os indivíduos, quanto o perfil individual utilizado para a análise do *onset*, *offset* e picos, foi produzido no programa Excel com a média dos dias em que a atividade se encontrava sincronizada em cada regime. Escolhemos o 4^o, 5^o e 6^o dia em ciclos de temperatura graduais ou retangulares e escuro constante. E o 3^o, 4^o e 5^o dia em ciclos de claro/escuro e temperatura graduais em fase ou fora de fase.

3.3.1 – Determinação do *onset*, *offset* e picos individuais

A análise da fase dos picos de atividade, assim como do início do pico E (*onset*) e término (*offset*) foi baseada nas metodologias empregadas por Rivas (2014), Yoshii (2009) e colaboradores. Determinamos esses parâmetros para cada mosquito, observando o perfil individual médio (assim como descrito no item 3.3). O *onset* do pico E foi definido como a fase onde encontramos um valor próximo ou igual a zero antes de um aumento gradual cujo valor máximo determinamos ser a fase do pico E. Por outro lado, o *offset* foi estabelecido como o momento em que se observava o primeiro valor igual ou próximo a zero após o pico E. Para exemplificar essa metodologia, no **anexo 1** separamos o perfil de indivíduos submetidos a cada regime e destacamos o *onset*, *offset* e pico E. A mesma análise individual foi empregada para avaliarmos o deslocamento dos picos durante os dias em que os mosquitos foram expostos ao regime com ciclos de temperatura graduais ou

retangulares. Assim como o deslocamento do *onset* a cada dia no regime com ciclos de claro/escuro e temperatura graduais.

3.4 – Análise molecular

3.4.1 – Análise da expressão de genes do relógio circadiano

3.4.1.1 – Extração e purificação de RNA

Os mosquitos foram mantidos durante três dias em ciclos de claro/escuro e temperatura em fase ou sob ciclos de claro/escuro e temperatura fora de fase, em incubadora Solab – SL225/ 334. No terceiro dia, grupos de 10 indivíduos foram coletados a cada quatro horas ao longo de 24 horas (ZT1, ZT5, ZT9, ZT13, ZT17 e ZT21). A cada coleta, os mosquitos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e preservados em freezer -80°C. Posteriormente, extraímos o RNA total da cabeça com Trizol (Life Technologies) e purificamos através da precipitação com cloreto de lítio 2,5M, conforme previamente estabelecido (Gentile, 2007).

3.4.1.2 – Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com os reagentes *TaqMan Reverse Transcription Reagents* (Life Technologies) nas concentrações da **tabela 3.1**. A transcrição reversa ocorreu nas seguintes condições: 25°C por 10 minutos, 48°C por 1 hora e 95°C por 5 minutos. Aos 10 µl de cDNA sintetizados, adicionamos 90 µl de água milli-Q, resultando em 100 µl de cDNA 10 vezes diluído. Tal diluição possibilitou gerar cDNA suficiente para diversas reações de PCR em Tempo-Real, sem perder uma boa eficiência de amplificação.

3.4.1.3 – PCR em tempo-real

Realizamos ensaios de PCR em tempo real com o cDNA sintetizado para analisar a expressão dos genes *per*, *tim*, *cry2*, *cyc*, *vri*, *Pdp1*, *nocte* e *rp49*; utilizando o kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies), no equipamento

StepOne Plus (Life Technologies). Os *primers* utilizados são os mesmos descritos por Gentile e colaboradores (2009), com exceção do gene *nocte*. Para *nocte* desenhamos os *primers* senso (5'-AATTCACCGTTAGCGTTGGCG-3') e antisenso (5'-GCTGCCGACCATTGGGATC-3') a partir da sequência supercont 1.177 (285000-296000) contida no site VectorBase.org.

Tabela 3.1: Composição das reações de síntese de cDNA para cada amostra

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

A **tabela 3.2** mostra a composição da reação. Para cada cDNA e gene utilizamos três réplicas e submetemos as amostras às seguintes condições de termociclagem: 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos e uma curva de dissociação para observarmos a formação de dímeros ou a presença de contaminantes. Esta curva de dissociação (*melting curve*) segue os seguintes parâmetros: 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos, mais etapas crescentes de temperatura onde são feitas as leituras de fluorescência (leituras a cada 0,3°C) de 60°C até 95°C.

Os valores de C_T das três réplicas de cada cDNA e gene foram transformados em valores médios. As réplicas que apresentaram valores muito discrepantes (*outliers*) dos valores críticos de *Grubbs* foram excluídas da análise (Sokal & Rohlf, 1995). O método utilizado para a quantificação foi o “Método do C_T Comparativo” (Comparative C_T Method; Método 2^{- $\Delta\Delta$ CT}) (Livak & Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001), utilizando como base os Manuais da Applied Biosystems (1997, 2004). A expressão

do gene *rp49* nos serviu como normalizador endógeno e o ZT de menor expressão em cada gene alvo como amostra de referência.

Tabela 3.2: Composição das reações de qPCR em tempo real por poço.

Reagentes	Volume
Power SYBR® Green PCR Master Mix	7,5 µL
oligo 5' (10 µM)	0,18 µL
oligo 3' (10 µM)	0,18 µL
Água	1,125 µL
cDNA	6 µL
Total	15 µL

3.4.1.4 – Análise do silenciamento de *nocte* em mosquitos injetados com dsRNA

Os mosquitos injetados com o RNA dupla-fita de *nocte* ou de *LacZ* foram mantidos durante os quatro dias seguintes à injeção em ciclos de claro/escuro e temperatura em fase. No segundo e quarto dias após a injeção coletamos grupos de 10 indivíduos no mesmo horário (ZT 5). Congelamos imediatamente em nitrogênio líquido e guardamos em freezer -80°C. Em seguida, extraímos o RNA total da cabeça e do corpo, purificamos esse material e sintetizamos cDNA, assim como descrito nos itens 3.4.1.1 e 3.4.1.2. Posteriormente, utilizamos esse cDNA para fazer um PCR em tempo-real a fim de analisar a expressão de *nocte* e *rp49*, assim como descrito no item 3.4.1.3. A expressão do gene *rp49* foi mais uma vez o nosso normalizador endógeno e como amostra de referência, utilizamos a expressão de *nocte* no grupo controle a cada dia.

3.5 – Síntese *in vitro* de RNA dupla-fita

3.5.1 – Clonagem de um fragmento do *nocte* de *Ae. aegypti*

Para sintetizarmos *in vitro* o RNA dupla-fita que será utilizado como RNA de interferência, inicialmente amplificamos por PCR um fragmento do gene que desejávamos silenciar. De acordo com a experiência do nosso laboratório, este fragmento deverá conter a região escolhida como alvo da ação das endonucleases do sistema de RNAi e é adequado que seu tamanho seja entre 600 a 800 pares de bases. É interessante, ainda, que se escolha como alvo uma região inicial do RNA mensageiro. Do contrário, há a possibilidade do mesmo não ser completamente degradado pelo sistema a partir do ponto de clivagem antes de começar sua tradução em proteína. Neste caso, seriam gerados peptídeos que poderiam exercer algum efeito na célula relacionado à função da proteína, interferindo no fenótipo (Gentile *et al.*, 2013b; Gentile, 2007).

Para escolhermos a região e *primers* adequados, nosso primeiro passo foi através da sequência do *nocte* de *Drosophila* (flybase ID: FBtr0332953), buscamos o homólogo em *Ae. aegypti*. As sequências de *nocte* de *Aedes aegypti* foram obtidas *in silico*, através de busca no genoma desta espécie, disponível on-line no site do *Vector Base* (<http://www.vectorbase.org/>). Embora o genoma completo deste vetor já tenha sido sequenciado (Nene *et al.*, 2007), observamos que a sequência do transcrito de *nocte* não estava inteiramente anotada, faltando a região inicial. Assim, para que pudéssemos analisar essa região desenhamos um *primer* senso (5'-ATGAAGATTCTCTGGCAGCATG-3') flanqueando a predita metionina inicial e um *primer* antisenso (5'-TACATGAACGGTGGCATCAGTG-3') no exon mais próximo anotado no banco de dados, o que englobaria uma região, em nível genômico, de 3679 pares de bases.

Paralelamente, extraímos o RNA total da cabeça de *Ae. aegypti* e sintetizamos cDNA, assim como descrito nos itens 3.4.1.1 e 3.4.1.2. Com o cDNA e os *primers* citados realizamos uma PCR, utilizando a enzima *Tth* DNA polimerase (Biotools) de acordo com as instruções do fabricante. As condições de termociclagem da reação foram: 95°C por 5 minutos; 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Submetemos 10 µl do volume da

reação à eletroforese em gel de agarose 2%. Como corante para visualização, utilizamos GelRed diluído 10000x diretamente em agarose, segundo as especificações do fabricante (Biotium). O restante da reação foi purificado com o kit GFX PCR DNA & Gel Band Purification (GE Healthcare).

O material amplificado foi ligado a um vetor plasmidial (pGEM-T EASY - Promega) de acordo com as especificações do fabricante. Uma alíquota deste vetor foi utilizada para transformar células competentes *E. coli DH5*, que foram, então plaqueadas em meio LB agar contendo X-Gal e IPTG, e mantidas em estufa a 37°C por cerca de 16 horas. Dentre as colônias que cresceram em placa, algumas foram selecionadas e inoculadas independentemente em tubos Falcon de 15 ml, contendo 3 ml de meio LB com ampicilina. Por meio de uma *mini preparação* (kit Sephaglas™ FlexiPrep Amersham Biosciences), extraímos o material plasmidial dessas colônias que foi digerido com enzima *EcoRI* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras que apresentaram insertos foram analisadas no sequenciador ABI 377 DNA usando o reagente *Big Dye* (Applied Biosystems), da Plataforma de Sequenciamento do PDTIS/FIOCRUZ. Obtivemos uma sequência de 762 pares de bases que foi confrontada com o banco de dados de *D. melanogaster* (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), confirmando que se tratava de um homólogo de *nocte* em *Ae. aegypti*. Ao compararmos a sequência codificante obtida com o genoma desta espécie, dois íntrons foram identificados. A **figura 3.1** mostra essa sequência consenso com o predito ATG inicial e a junção entre éxons.

3.6 – Síntese *in vitro* de RNA dupla-fita

Primeiramente realizamos uma PCR com o material clonado e *primers* específicos que foram desenhados mais internamente no consenso e continham nas suas extremidades 5' uma sequência T7, fundamental à síntese do RNA dupla-fita. Na **figura 3.1** apresentamos esses *primers*, assim como a região em que eles foram desenhados. Realizamos a PCR com enzima *Tth* DNA polimerase (Biotools) de acordo com as especificações do fabricante. As condições de termociclagem consistiram de: 95°C por 5 minutos; 45 ciclos de 95°C por 30 segundos, 65°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. O produto gerado foi submetido à eletroforese em agarose com GelRed (Biotium), segundo as instruções do fabricante. Observamos que o material amplificado corresponderia a sequência de DNA com 500 pares de

bases esperada mais a adição da cauda T7 nas extremidades 5' de ambas as fitas. Purificamos o produto da reação com o kit GFX PCR DNA & Gel Band Purification (GE Healthcare).

```
ATGAAGATTCTCTGGCAGCATGAATGCATTGGGGGGAAGTGGGGGAGCGAAATGCAAAGCCAAA
TTCGCAGCGTTAGATATCAACAAACTCTACAGCACAAGTCGGGGAGAATCTTTGAACCATCAACTCA
GAAAAGTGCAGCTCCTCGTAAACATGGAATGCAAAGTTTGGGAAAGGTTCCCTCGGCTCGTCGACCGC
CAGCAAACCTTCCGTCTCTGAAAGCCGAAATCTCCATTCCATCGGATCAGCAAGGCACCTGGGGTAGCG
AAGCAGGAGACAACCAAAACAACAACCTCTAGTATTACTTCAACATCAGCAGCACCATCAGCAGCCGCC
GGTAGCAGCACAATAACAACGCCACGGTTGGTGCCGGAGGTGTGCACAGCACTTACACGCCAGCA
GTTACAGATTCCCCTCGGGCGCATCATCTCTTACAATGGAGTTCGAACGAGTTCCCCTcGcTGGA
TGCCACTGGTCAGTATGGTCCGAGCGGCAAACAGCaGCATCATCTCCACGATGGCACAGACGGCA
GAGCGATGGGTGAGTACATGGATGGTCCACAAGTCAGTCTGCGGCCTCAAACGGATGCTGCGAGTTG
GATGCAGCAACAACAGCAGAGCAGTGGGGGCGGAAACAACGCCGGAGGTATGAACGGGGCCAAACAG
CAACCAACAGGGCCAGGGCCCCAACAGCAACCAGCTGCACCCCTACCGCCTCAGTTCCGGGCACTGA
TGCCACCGTTCATGTA
```

Primer Senso
5' TAATACGACTCACTATAGGGCAAACTCTACAGCACAAGTCGG 3'

Primer Antisenso
5' TAATACGACTCACTATAGGGCAGACTGACTTGTGGACC 3'

Figura 3.1: Sequencia obtida da região inicial do transcrito de *nocte*. A região contém 762 pares de bases. Em cinza, visualiza-se o pressuposto ATG inicial. Destacado em amarelo e verde, o final e o início de um exon respectivamente. Em vermelho, observam-se os segmentos escolhidos para a formação de *primers* com a cauda T7. Os oligonucleotídeos senso e antisenso encontram-se na região inferior da figura, sublinhado vemos a sequência T7.

Com o kit MEGAscript (Ambion) conduzimos a síntese de RNA dupla-fita a partir dos produtos de PCR purificados. Uma vez que o material amplificado continha a sequência do promotor T7 em ambas as extremidades, a síntese de RNA foi realizada sobre as duas fitas de DNA, gerando um RNA dupla-fita correspondente a toda a extensão do fragmento. O RNA dupla-fita sintetizado foi purificado com cloreto de lítio seguindo o protocolo do kit MEGAscript. Quantificamos o material em aparelho NanoDrop 3300 (Thermo Scientific), buscando a faixa de concentração entre 2,5 e 3,5 µg/µl. Por fim, uma alíquota de cada RNA dupla-fita sintetizado foi

submetida a eletroforese em agarose corada com GelRed para verificarmos a integridade do material.

Paralelamente, utilizamos a mesma estratégia para *LacZ*, um gene de *Escherichia coli* que não está presente em mosquitos, empregando-o como um controle do silenciamento. Um clone contendo o inserto deste gene com aproximadamente 600 pares de bases foi gentilmente cedido pela Dr^a. Carla Gentile. A síntese do RNA dupla-fita de *LacZ* foi realizada com este clone e oligonucleotídeos internos ao fragmento contendo a sequência T7 nas extremidades 5' (senso: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGCAAACTCTACAGCACAAGTCGG-3' e antisenso: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGGCAGACTGACTTGTGGACC-3'), assim como estabelecido previamente (Gentile *et al.*, 2013b).

3.7 – Injeção em mosquitos

Os mosquitos foram adormecidos por resfriamento. Com o auxílio de um micro-injetor manual Nanoject II, da Drummond Scientific injetamos o RNA dupla-fita na altura do espiráculo mesotorácico ou na área pós-espiracular (Consoli e Lourenço-de-Oliveria, 1994). Regulamos este micro-injetor para liberar 69 nanolitros do material quando sinalizado. Em cada mosquito, três injeções de 69 nanolitros eram realizadas, totalizando 207 nanolitros de material injetado. Após a injeção os mosquitos foram utilizados nos experimentos de atividade locomotora ou de análise da expressão gênica.

3.8 – Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 5 (Prism, La Jolla, CA). Primeiramente investigamos cada parâmetro (picos, *onset* e *offset*) com o teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($p < 0.05$). Nenhum dos dados seguiram uma distribuição Gaussiana. Assim, comparamos o pico E dos ciclos de temperatura graduais e retangulares com o Teste de Mann-Whitney. As análises do pico E, *onset* e *offset* de mosquitos íntegros ou injetados com RNA dupla-fita (*dsnocte* ou *dsLacZ*) foram feitas com o teste não paramétrico Kruskal-Wallis.

4 – RESULTADOS

4.1 – Condições Seminaturais

Estudos recentes vêm demonstrando que ciclos de temperatura graduais podem sincronizar a atividade de *D. melanogaster* com um perfil diferente do que era observado em ciclos de temperatura retangulares (Yoshii *et al.*, 2009). Assim, resolvemos inicialmente analisar a capacidade dos ciclos de temperatura graduais em sincronizar a atividade do mosquito *Aedes aegypti*.

Para isso, primeiramente precisávamos estabelecer uma referência com relação os ciclos de temperatura encontrados diariamente na natureza. Contamos com o auxílio do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), que gentilmente nos cedeu as aferições realizadas no Rio de Janeiro (estação A621, Vila Militar). A fim de diminuir variáveis anuais e sazonais, a curva foi formada como uma média das aferições do equinócio de março e do equinócio de setembro, durante seis anos (2008-2013) (**figura 4.1 A**).

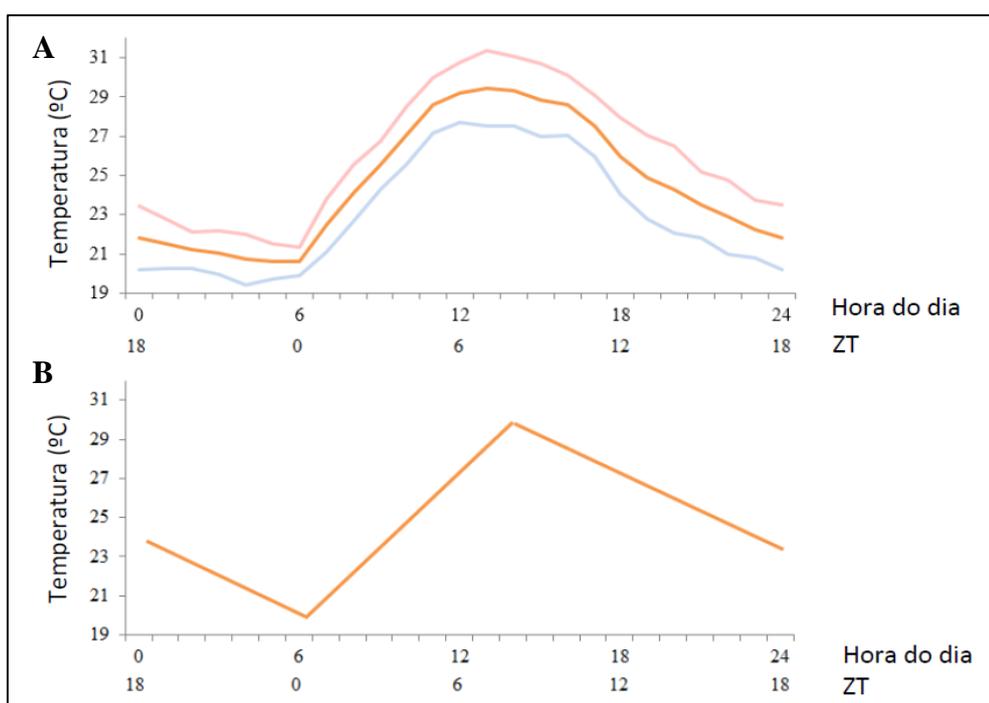


Figura 4.1: Curvas de temperatura natural e simulada. (A) Curva de temperatura natural no equinócio de março (rosa), no equinócio de setembro (azul) e na média dos equinócios (laranja) no Rio de Janeiro. **(B)** Curva gradiente simulada. Observa-se no eixo das coordenadas a temperatura média ou simulada e no eixo das abscissas o horário do dia / ZT em que elas ocorrem.

Observamos temperatura mínima média de $20,6^{\circ}\text{C} \pm 1,24$ ocorrendo às 6 horas da manhã (ZT0) e temperatura máxima média de $29,3 \pm 4,92^{\circ}\text{C}$ às 14 horas (ZT8). Assim, com base na curva de temperatura média diária, simulamos os ciclos de temperatura graduais em laboratório, com um aumento e decréscimo gradual de temperatura, mínima de 20°C no ZT0 e máxima de 30°C no ZT8 (**figura 4.1 B**).

4.2 – Sincronização por diferentes ciclos de temperatura

Após estabelecermos um perfil para o ciclo de temperatura gradual de uma forma mais próxima possível ao observado na natureza, pudemos compará-lo ao ciclo de temperatura retangular. Mantivemos os mosquitos durante 6 dias em escuro constante com ciclos de temperatura graduais ou retangulares. Em seguida, deslocamos a fase desses ciclos através de um “*shift*” de 6 horas a 20°C e observamos a atividade por mais 7 dias. Com isso, pudemos comparar o perfil de sincronização e a capacidade de cada ciclo deslocar a atividade (arrastamento).

Observamos que assim como os ciclos de temperatura retangulares, já descritos anteriormente (Rivas, 2010), os ciclos de temperatura graduais também são capazes de sincronizar a atividade de *Ae. aegypti*. No entanto, o perfil dessa atividade parece ser diferente. Sob ciclos de temperatura graduais, observamos apenas o pico principal (pico E), que se estabiliza por volta do ZT8 (**figura 4.2 A e C**). Em ciclos de temperatura retangulares o pico E sofre uma antecipação maior, se fixando próximo ao ZT6 (**figura 4.2 B e C**). Visualizamos ainda nessa última condição dois outros picos, um menor entre a transição do frio para o quente e um maior após a mudança do quente para o frio (**figura 4.2 B**). Acreditamos que esses picos ocorridos após as transições sejam um “*startle response*” ocasionados pela mudança abrupta de fase que não são controlados pelo relógio circadiano.

Após o deslocamento de 6 horas, ambos os ciclos foram capazes de arrastar a fase do pico principal de atividade, levando cerca de 4 dias para uma completa sincronização (**figura 4.3 A e B**). Já os demais picos encontrados nos ciclos retangulares, após o deslocamento, imediatamente seguem as transições de temperatura (**figura 4.3 A e B**), reforçando a nossa hipótese de que esses picos aconteçam devido a um mecanismo de mascaramento independente do relógio.

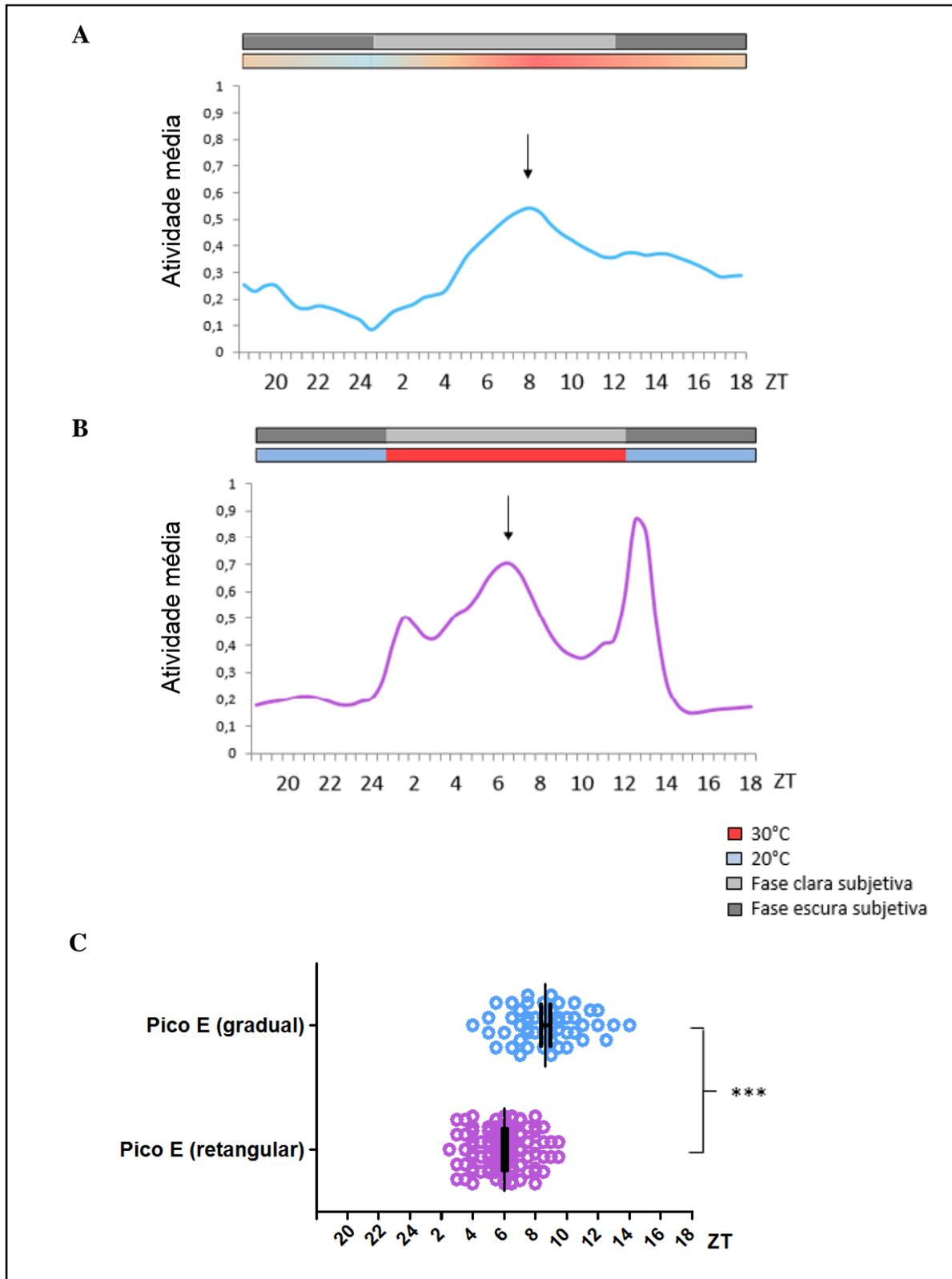


Figura 4.2: Atividade de *Ae. aegypti* em escuro constante e diferentes ciclos de temperatura. (A) Atividade média em ciclos de temperatura graduais (n=51, linha azul) ou **(B)** retangulares (n=115, linha lilás) e escuro constante. **(A e B)** As setas destacam o pico E nos respectivos ciclos. **(C)** Análise da fase do pico E encontrada em cada indivíduo exposto aos ciclos de temperatura graduais (média = $6,03 \pm 1,54$; círculos azuis) ou retangulares (média = $8,65 \pm 2,16$; círculos lilás). *** = $P < 0.001$ segundo o Teste de Mann-Whitney. **(A, B e C)** Tanto o perfil médio plotado nos gráficos como o perfil individual utilizado para a análise do pico E foram formados pela atividade média do 4º, 5º e 6º dia em cada ciclo.

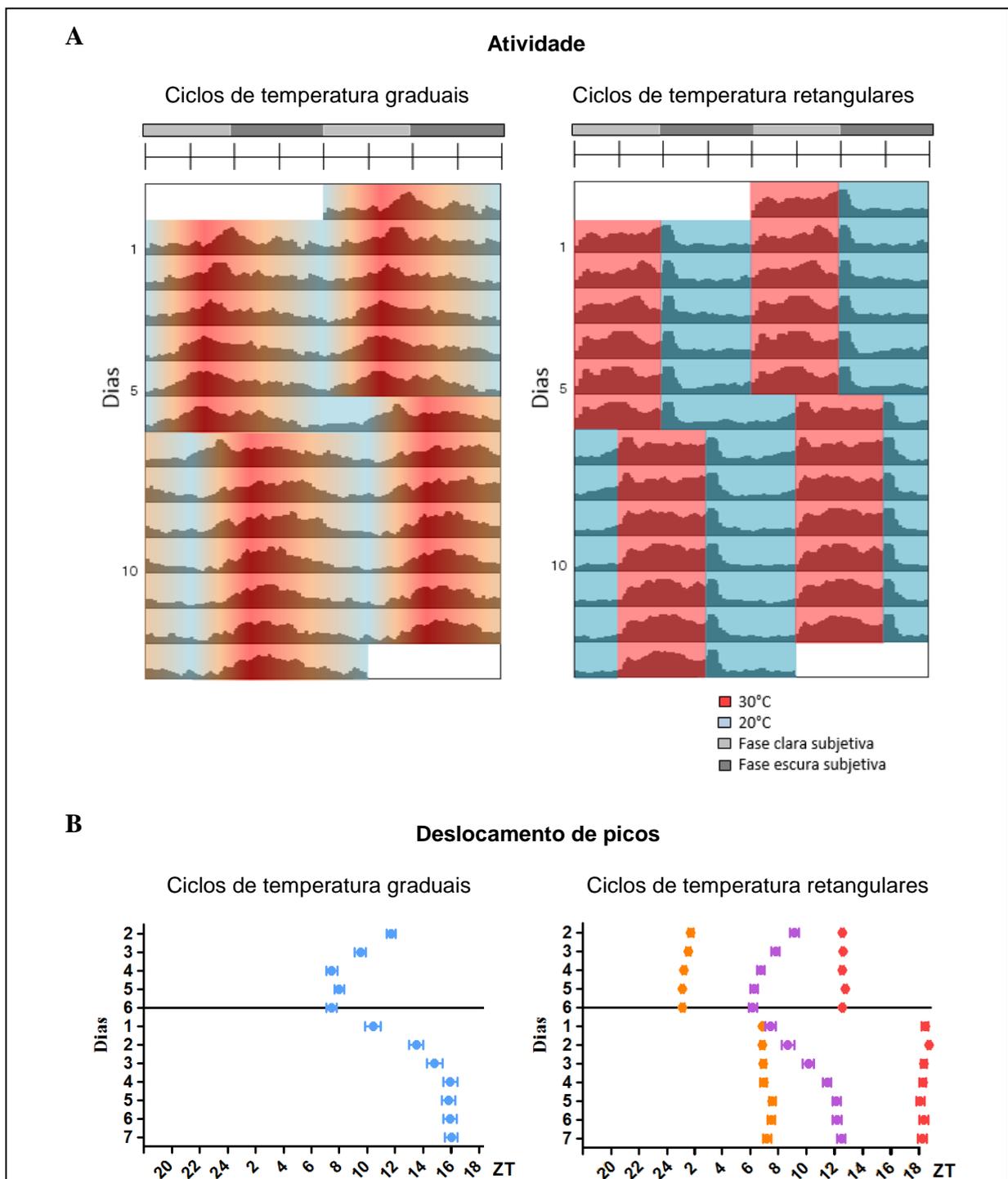


Figura 4.3: Actogramas de *Ae. aegypti* em escuro constante e diferentes ciclos de temperatura. (A) Actogramas duplamente plotados mostrando a média de atividade nos experimentos com ciclos de temperatura graduais (n=51) ou retangulares (n=115) e escuro constante. Primeiramente os mosquitos foram sincronizados pelos ciclos de cada regime durante 6 dias. Em seguida, deslocamos a fase dos ciclos com um *shift* de 6 horas a 20°C e mantivemos os mosquitos neste novo regime por mais 7 dias. **(B)** Média do deslocamento individual dos picos de atividade. No experimento com ciclos de temperatura graduais, destaca-se a fase do pico E (azul). No regime retangular observa-se o pico E (lilás), o pico da transição frio-quente (laranja) e o da transição quente-frio (vermelho). A linha horizontal marca o dia do *shift* de temperatura.

4.3 – Atividade sob ciclos de claro/escuro e temperatura

Nossos resultados sugerem que o ciclo de temperatura gradual que produzimos é capaz de sincronizar a atividade de *Ae. aegypti*, gerando menos artefatos experimentais e funcionando possivelmente de uma forma mais próxima ao natural. Mas, na natureza, os ciclos de temperatura não agem isoladamente e sim em conjunto com outros fatores ambientais. Como já citamos, os ciclos de claro/escuro são um dos principais fatores ambientais capaz de sincronizar a atividade de diversas espécies. Assim, nos perguntamos como os ciclos de temperatura graduais atuariam na presença dos ciclos de claro/escuro.

Diferente dos ciclos de temperatura, a coleta de dados do ciclo de claro/escuro é tecnicamente mais complexa. Primeiro, porque as oscilações de luminosidade envolvem uma gama de mudanças espectrais ao longo do dia. Segundo, porque as alterações na intensidade podem variar de 0 até 100 mil lux, dependendo não apenas do horário como também das condições meteorológicas (céu limpo ou nublado) e do local (área aberta ou sombreada). Assim, empregamos como referência um ciclo de claro/escuro previamente estabelecido para se estudar a atividade de *D. melanogaster* sob condições mais próximas ao observadas em um equinócio (Rieger *et al.*, 2007, Yoshii *et al.*, 2009). Neste regime, estabelece-se um padrão de claro/escuro com 12 horas de luz (máxima de 1000 lux), sendo 1,5h de subida e descida de luz simulando o amanhecer e o crepúsculo, mais 12 horas de escuro (0 lux).

Assim, uma vez estabelecido o perfil de oscilação de luz e temperatura diárias, pudemos avaliar como os ciclos de temperatura graduais atuariam na presença dos ciclos de claro/escuro. Para isso, expusemos os mosquitos aos ciclos de claro/escuro e temperatura em sua fase natural durante 6 dias. No 7º dia, atrasamos o início do ciclo de temperatura em 12 horas, fazendo com que os ciclos de claro/escuro e de temperatura ocorressem em fases opostas.

Observamos em ciclos de claro/escuro e temperatura em sua fase natural uma intensa atividade que se inicia no meio do dia e progressivamente aumenta até atingir o seu auge no ZT 12 (**figura 4.4**). Após o apagar das luzes, a atividade decai e se mantém baixa ao longo da noite. Observamos ainda que esses mosquitos apresentam um forte pico E e um quase imperceptível pico M (**figura 4.4**, linha

verde). Nossos resultados sugerem que isto estaria acontecendo devido às diferentes temperaturas a que cada pico é exposto em um ciclo gradual.

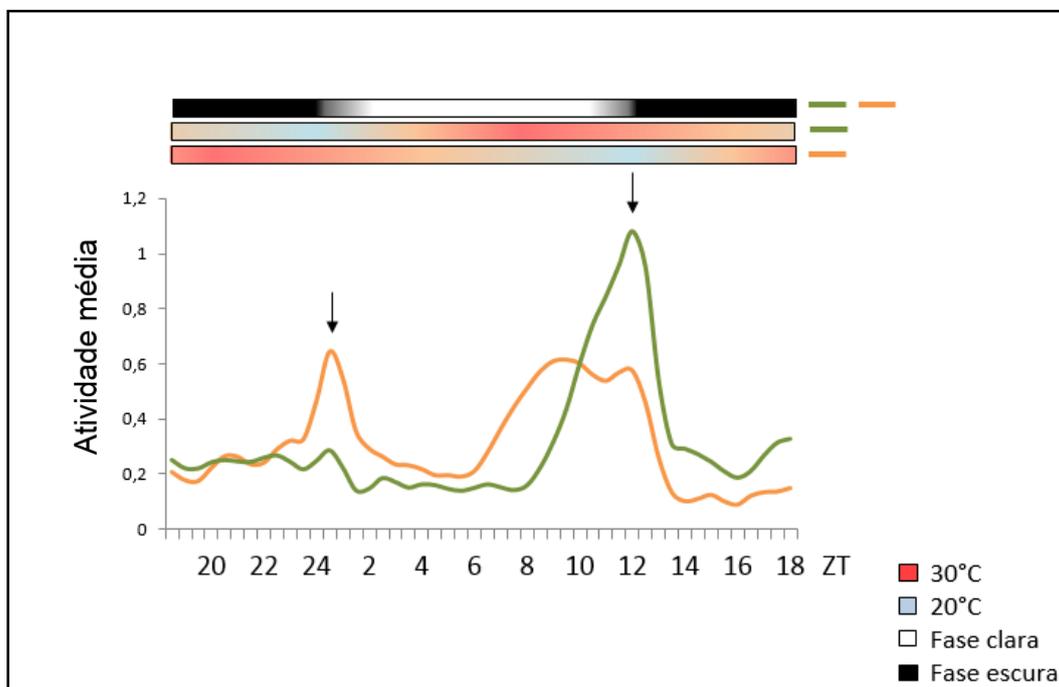


Figura 4.4: Atividade média em ciclos de claro/escuro e temperatura graduais. Os mosquitos foram expostos aos ciclos em fase (n=44, linha verde) ou fora de fase (n=44, linha laranja). As setas destacam o pico M e o pico E. O perfil médio plotado nos gráficos foi formado pela atividade média do 3º, 4º e 5º dias antes do *shift* (ciclos em fase) ou 3º, 4º e 5º dias após o *shift* (ciclos fora de fase).

Essa sugestão é reforçada ao colocarmos os ciclos de temperatura em uma fase oposta (deslocamento de 12h). Em tal condição conflitante vemos que os mosquitos mantêm o seu padrão diurno, confirmando a importância dos ciclos de claro/escuro para a sua sincronização, mas apresentam um aumento do pico M e um decréscimo do pico E (**figura 4.4**) se comparado ao ciclo em fase. Além disso, observamos que o pico E parece sofrer o que chamamos em cronobiologia de desacoplamento. Isso é, ele se divide, nesse caso em dois picos. Um pico permanece no ZT12 e outro se desloca até o ZT8,5 (**figura 4.4, tabela 4.1** pág.52). Isso faz com que o *onset* do pico E, ou seja, o horário que esse pico inicia, seja antecipado (**figura 4.4, tabela 4.2**), enquanto o *offset*, ou o horário que o pico termina, permaneça inalterado (**figura 4.4, tabela 4.3** pág. 52).

Para melhor compreendermos essa antecipação, acompanhamos o *onset* do pico E ao longo de todo o experimento. Durante os dias que os mosquitos estão expostos aos ciclos em fase, o *onset* do pico E ocorre por volta do ZT8. Após deslocarmos os ciclos de temperatura, a fase do *onset* muda para o ZT6 (**figura 4.5, tabela 4.2**). Essa alteração, no entanto, não ocorre de forma repentina. Observamos uma antecipação progressiva, completada após o quarto dia; sugerindo que o desacoplamento observado no pico E não seja o resultado de um mascaramento e sim de um efeito direto no relógio circadiano (**figura 4.5 A e B**).

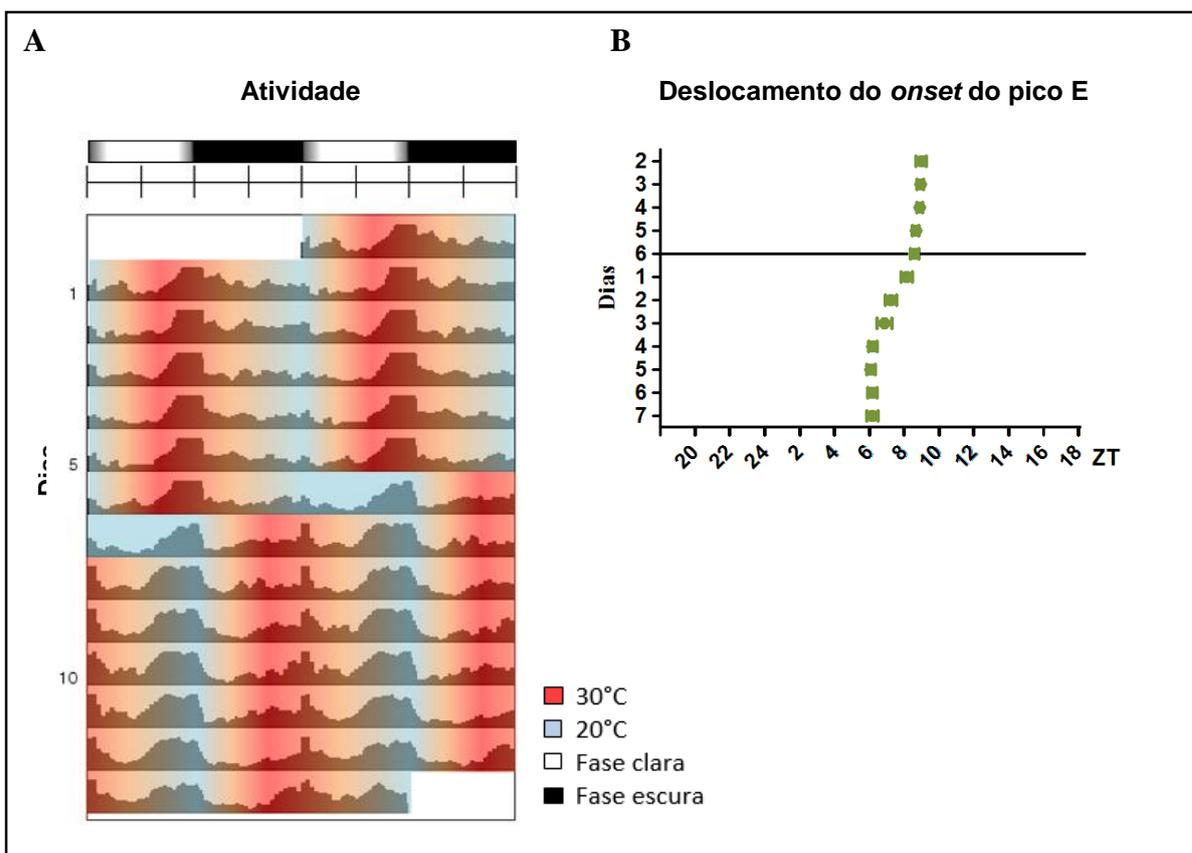


Figura 4.5: Actograma da atividade em ciclos de claro/escuro e temperatura graduais. (A) Actogramas duplamente plotados exibindo a média de atividade no experimento com ciclos de claro/escuro e temperatura graduais (n=44). Primeiramente os mosquitos foram expostos aos ciclos de claro/escuro e de temperatura em fase durante 6 dias. Em seguida, deslocamos a fase dos ciclos de temperatura com um *shift* de 12 horas a 20°C e mantivemos os mosquitos neste novo regime por mais 7 dias. **(B)** Média do deslocamento individual do *onset* do pico E (verde). A linha horizontal marca o dia do *shift* de temperatura.

4.4 – Expressão de genes do relógio circadiano

Diante da evidente influência dos ciclos de temperatura para a amplitude e ajuste de fase dos picos de atividade, aliado ao possível recrutamento do relógio circadiano para essa atuação, nos perguntamos se os efeitos observados seriam o resultado de uma interferência direta em genes que compõem o relógio. Assim, comparamos a expressão de *period*, *timeless*, *cryptochrome2*, *cycle*, *vri* e *Period-domain-protein-1* na cabeça de mosquitos expostos aos ciclos de claro/escuro e temperatura em fase ou fora de fase.

Quando submetidos aos ciclos em fase, *per* apresenta um pico de expressão no ZT17 e o mesmo pico, porém com uma expressão bastante reduzida em ciclos fora de fase. Essa redução de expressão também foi constatada em outros genes. Observamos que *cry2*, com seu padrão bimodal característico e picos em ZT1 e ZT15, mostrou similar redução em sua amplitude. O mesmo acontece com *tim*, que apresenta um pico em ZT13 nos ciclos em fase, mas reduz a expressão a ponto de perder sua ritmicidade em ciclos fora de fase (**figura 4.6**).

Interessantemente, com *cyc*, *vri* e *Pdp1* parece não ocorrer uma redução de amplitude e sim uma antecipação da expressão quando os ciclos estão em fases opostas. O pico da expressão de *cyc*, que ocorre no ZT5 em ciclos em fase, se desloca para o ZT1. O gene *vri*, que apresenta um pico disperso entre o ZT9 e ZT17 sob os ciclos em fase, passa a concentrar sua expressão no ZT9. Quanto a *Pdp1*, observamos que o pico desse gene, encontrado em ZT17 sob ciclos em fase, se antecipa até o ZT13 em ciclos fora de fase (**figura 4.6**).

Em síntese, nossa análise comparativa revelou alterações de expressão em todos os genes de relógio observados em ciclos em fase e fora de fase. Isto seria mais um indicativo que os efeitos ocasionados pelos ciclos de temperatura graduais sobre os picos de atividade do mosquito *Ae. aegypti* envolve o recrutamento do relógio circadiano.

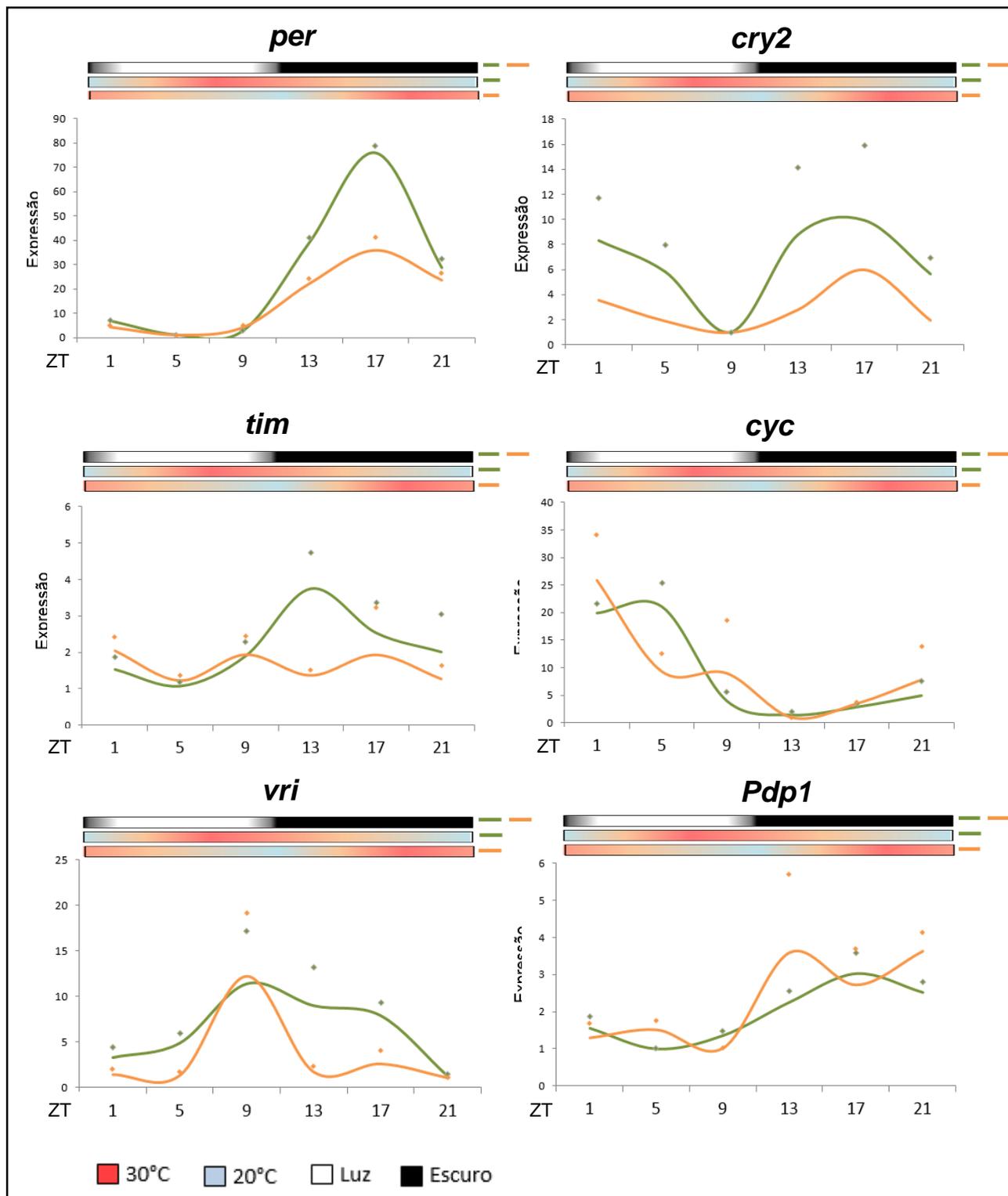


Figura 4.6: Análise da expressão de genes do relógio circadiano, na cabeça de *Ae. aegypti*. Observa-se a expressão em ciclos de claro/escuro e temperatura graduais em fase (linha verde) ou fora de fase (linha laranja). Os gráficos mostram a expressão de *per* (*period*), *cry2* (*cryptochrome2*), *tim* (*timeless*), *cyc* (*cycle*), *vri* (*vrille*) e *Pdp1* (*Par-domain-protein-1*). Utilizamos três replicatas, com um *pool* de 10 indivíduos cada (ver metodologia). Os pontos representam o desvio padrão.

4.5 – O papel de *nocte* para a sincronização por ciclos de temperatura

Uma vez que os ciclos de temperatura graduais sincronizam o relógio circadiano de *Ae. aegypti*, nos perguntamos como a informação passada por esse indicador ambiental seria encaminhada para o cerne do relógio desses vetores. Um candidato para isso é *nocte*, já que, como citado anteriormente, esse gene seria fundamental para a sincronização pelos ciclos de temperatura e funcionalidade dos órgãos cordotonais em *D. melanogaster* (Sehadova et al. 2009). Assim, começamos a investigar o papel de *nocte* em *Ae. aegypti*, utilizando como estratégia a técnica de RNA de interferência. Injetamos o RNA dupla-fita de *nocte* no tórax de fêmeas adultas, a fim de observarmos as implicações do silenciamento desse gene sobre a sincronização pelos ciclos de temperatura.

Para confirmarmos a redução da expressão de *nocte* nos mosquitos injetados com o dsRNA, tivemos o cuidado de previamente analisar o perfil de expressão desse gene em mosquitos não injetados. Observando que *nocte* é um gene que não tem expressão cíclica (**figura 4.7 A**), comparamos sua expressão em mosquitos injetados com o dsRNA de *nocte* ou do gene controle *LacZ* no ZT5 do 2º e 4º dia após a injeção. Assim, confirmamos a redução na expressão de *nocte* tanto na cabeça, quanto no corpo de mosquitos injetados com o seu dsRNA (**figura 4.7 B**).

Considerando que as influências mais evidentes dos ciclos de temperatura graduais ocorrem sobre a amplitude dos picos de atividade e o *onset* do pico E, esperávamos que se *nocte* contribuísse para a sincronização pelos ciclos de temperatura, os mosquitos silenciados para esse gene teriam prejuízos na amplitude de sua atividade e na antecipação do *onset* de seu pico E em ciclos fora de fase. A comparação entre os mosquitos injetados com o dsRNA de *nocte* ou de *LacZ*, confirmam essas expectativas.

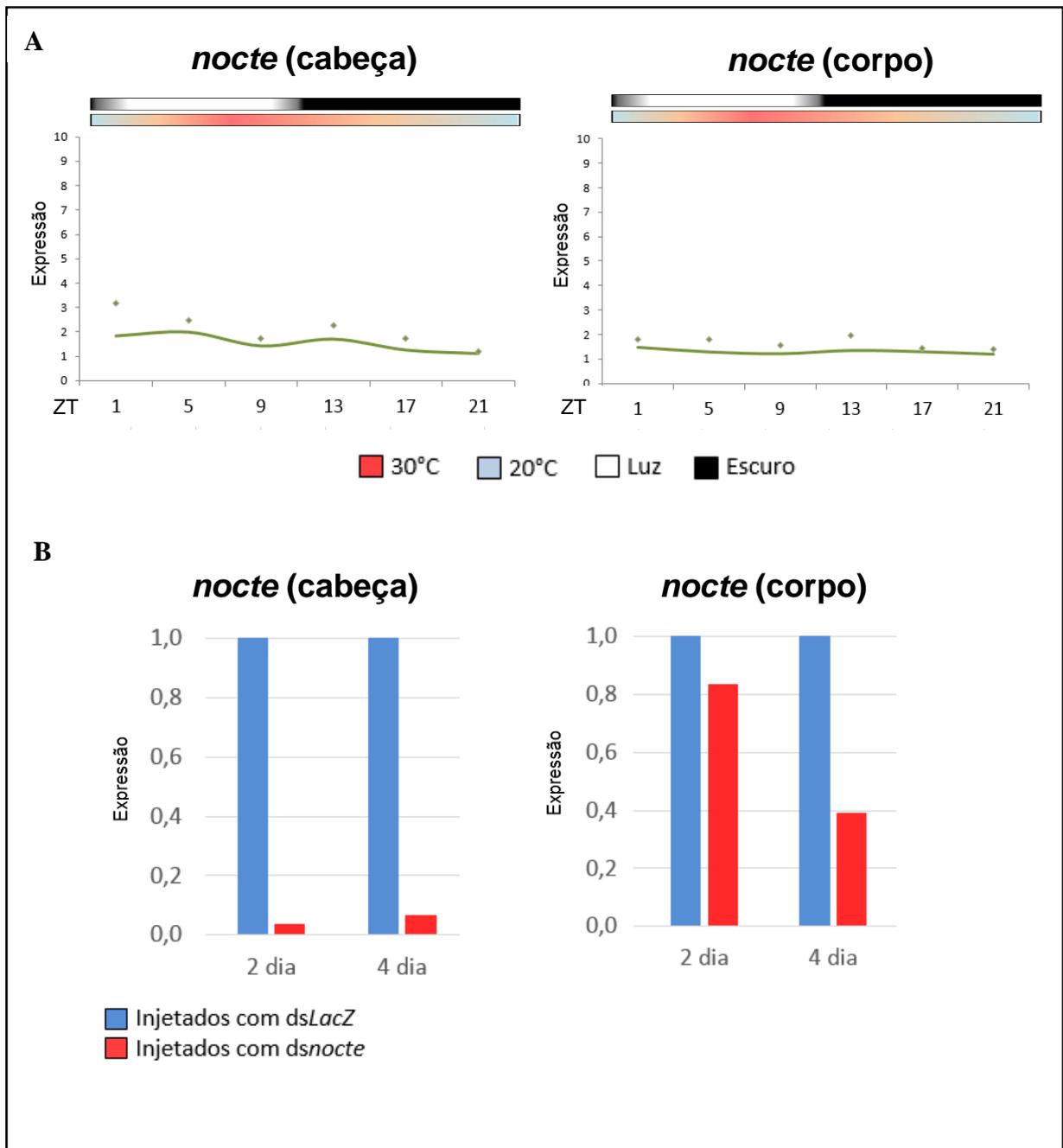


Figura 4.7: Silenciamento de *nocte* (A) Análise da expressão de *nocte* na cabeça e no corpo de mosquitos não injetados submetidos aos ciclos em fase. Utilizamos três replicatas, com um *pool* de 10 indivíduos cada (ver metodologia). Os pontos representam o desvio padrão. (B) Expressão de *nocte* na cabeça e no corpo de mosquitos injetados com RNA dupla-fita de *LacZ* e o RNA dupla-fita de *nocte*. Os mosquitos injetados foram submetidos aos ciclos em fase e coletamos um *pool* de 10 indivíduos no ZT5 do 2º e 4º dia após a injeção (ver metodologia).

Observamos que em ciclos fora de fase, o *offset* do pico E nos mosquitos silenciados para *nocte* permanece idêntico ao *offset* do grupo controle ou ao *offset* dos mosquitos não injetados em ciclos em fase e fora de fase (figura 4.8, figura 4.9 C, tabela 4.3). O mesmo acontece com os dois picos originados do desacoplamento do pico E. Não encontramos qualquer diferença na fase desses picos entre os mosquitos silenciados para *nocte* e os demais grupos experimentais (figura 4.8, figura 4.9 A, tabela 4.1). No entanto, assim como esperado, observamos que os mosquitos silenciados para *nocte* apresentam uma forte redução da amplitude de sua atividade e um padrão de *onset* do pico E intermediário, que não se diferencia do *onset* em ciclos em fase, nem do *onset* em ciclos fora de fase (figura 4.8, figura 4.9 B, tabela 4.2). Assim, consideramos que *nocte* possa ter um importante papel para a sincronização pelos ciclos de temperatura em *Ae. aegypti*.

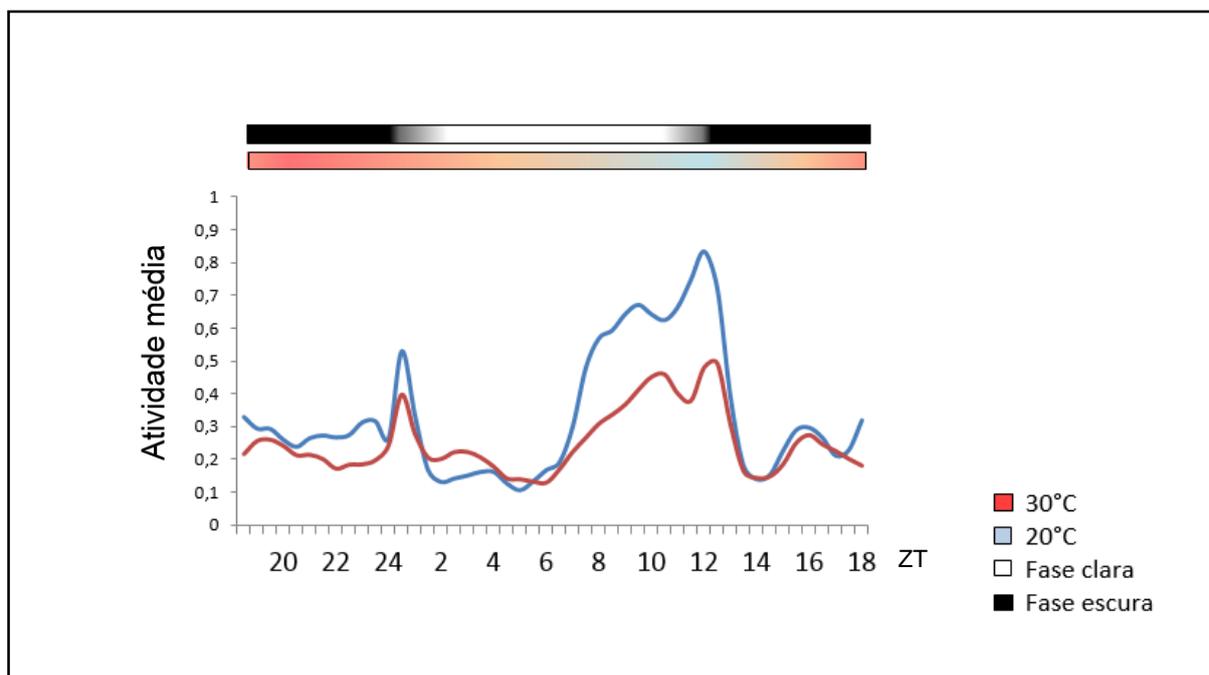


Figura 4.8: Atividade de mosquitos injetados com dsRNA. Atividade média de mosquitos injetados com o RNA dupla-fita de *nocte* (n=20, linha vermelha) ou de *LacZ* (n=22, linha azul) submetidos a ciclos de claro/escuro e temperatura fora de fase. O perfil médio plotado nos gráficos foi formado pela atividade média do 3º, 4º e 5º dias em ciclos fora de fase.

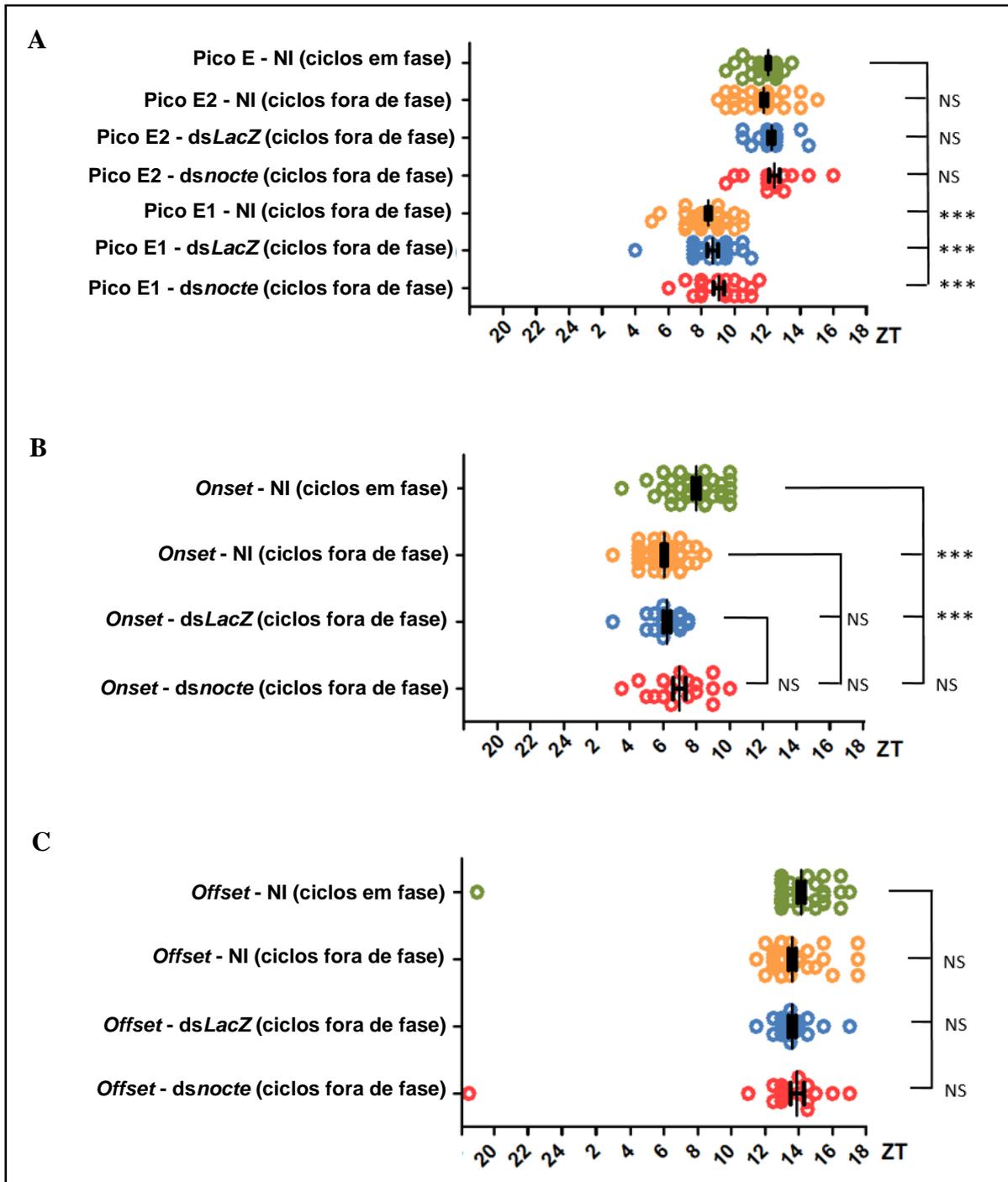


Figura 4.9: Análise do onset, offset e picos. (A) Análise individual da fase do pico E em ciclos de claro/escuro e temperatura em fase ou do desacoplamento desse pico (E1 e E2) em ciclos fora de fase. (B) Análise individual do onset do pico E em ciclos em fase ou fora de fase. (C) Análise individual do offset do pico E em ciclos em fase ou fora de fase. (A, B e C) Os diferentes grupos experimentais são separados por cores. Destacamos os mosquitos íntegros (não injetados, NI) expostos aos ciclos em fase, por círculos verdes ou submetidos aos ciclos fora de fase por círculos laranjas. Os mosquitos injetados com o dsRNA de *nocte* ou de *LacZ* e expostos aos ciclos fora de fase são representados por círculos azuis e vermelhos, respectivamente. *** = $P < 0.001$ segundo o Teste Kruskal-Wallis. NS = não significativo.

Tabela 4.1: Pico E (ciclos em fase), Picos E1 e E2 (ciclos fora de fase)

		Pico E - NI	Pico E1 - NI	Pico E2 - NI	Pico E1 - dsLacZ	Pico E2 - dsLacZ	Pico E1 - dsnocte	Pico E2 - dsnocte
Média		12,05 ± 0,78	8,41 ± 1,17	11,78 ± 1,2	8,7 ± 1,51	12,23 ± 0,91	9,05 ± 1,48	12,4 ± 1,41
Análise estatística	Pico E - NI							
	Pico E1 - NI	$P < 0,001$						
	Pico E2 - NI	NS	$P < 0,001$					
	Pico E1 - dsLacZ	$P < 0,001$	NS	$P < 0,001$				
	Pico E2 - dsLacZ	NS	$P < 0,001$	NS	$P < 0,001$			
	Pico E1 - dsnocte	$P < 0,001$	NS	$P < 0,001$	NS	$P < 0,001$		
	Pico E2 - dsnocte	NS	$P < 0,001$	NS	$P < 0,001$	NS	$P < 0,001$	

NI: Mosquitos íntegros (não injetados)

dsLacZ: Mosquitos injetados com o RNA dupla-fita de *LacZ*

dsLacZ: Mosquitos injetados com o RNA dupla-fita de *nocte*

Método estatístico: Teste Kruskal-Wallis

NS: não significativo

Tabela 4.2: Onset do pico E

		NI (ciclos em fase)	NI (ciclos fora de fase)	dsLacZ (ciclos fora de fase)	dsnocte (ciclos fora de fase)
Média		7,99 ± 1,42	6,06 ± 1,15	6,23 ± 1,02	6,98 ± 1,66
Análise estatística	NI (ciclos em fase)				
	NI (ciclos fora de fase)	$P < 0,001$			
	dsLacZ (ciclos fora de fase)	$P < 0,001$	NS		
	dsnocte (ciclos fora de fase)	NS	NS	NS	

NI: Mosquitos íntegros (não injetados)

dsLacZ: Mosquitos injetados com o RNA dupla-fita de *LacZ*

dsLacZ: Mosquitos injetados com o RNA dupla-fita de *nocte*

Método estatístico: Teste Kruskal-Wallis

NS: não significativo

Tabela 4.3: Offset do pico E

		NI (ciclos em fase)	NI (ciclos fora de fase)	dsLacZ (ciclos fora de fase)	dsnocte (ciclos fora de fase)
Média		14,16 ± 1,48	13,63 ± 1,43	13,61 ± 1,12	13,90 ± 1,72
Análise estatística	NI (ciclos em fase)				
	NI (ciclos fora de fase)	NS			
	dsLacZ (ciclos fora de fase)	NS	NS		
	dsnocte (ciclos fora de fase)	NS	NS	NS	

NI: Mosquitos íntegros (não injetados)

dsLacZ: Mosquitos injetados com o RNA dupla-fita de *LacZ*

dsLacZ: Mosquitos injetados com o RNA dupla-fita de *nocte*

Método estatístico: Teste Kruskal-Wallis

NS: não significativo

5 – DISCUSSÃO

Diversos estudos vêm se preocupando em entender como a temperatura ambiental pode influenciar os ritmos de atividade de mosquitos vetores. A grande maioria dessas investigações são feitas no campo, onde se estabelece uma correlação entre as taxas de captura e a atividade em um determinado horário. Em um dos primeiros estudos sobre o tema, Bidlingmayer (1967) observou que a maioria das espécies de mosquitos coletadas em suas armadilhas na Florida apresentavam maior atividade durante o crepúsculo do que pelo amanhecer e atribuiu esse fato às baixas temperaturas encontradas na localidade durante a manhã.

Para investigar melhor esse efeito, Bidlingmayer (1974, 1985) comparou o nível de captura do mosquito *Culex nigripalpus* durante o amanhecer e crepúsculo em dias com diferentes temperaturas. Ele observou que quando as temperaturas matinais eram baixas (entre 20 e 12°C) para cada 1°C a menos havia uma diminuição entre 12-14% na taxa de captura. Corbet (1965a) sugere que a ocorrência do padrão bimodal de atividade é mais frequente em regiões tropicais, possivelmente porque as temperaturas matinais são mais altas próximo à linha do equador.

Embora os estudos no campo contribuíssem muito para o nosso entendimento atual, essa abordagem apresenta algumas limitações. Entre elas, destaca-se o fato de que a densidade populacional pode afetar consideravelmente a real interpretação dos dados. Um exemplo para isso também advém no clássico trabalho de Bidlingmayer (1967). Inicialmente Bidlingmayer observou que a espécie *Culex nigripalpus* apresentava uma correlação positiva entre a atividade e o aumento de temperatura, enquanto a espécie *Coquillettidia perturbans* possuía uma correlação negativa entre esses fatores. No entanto, em uma segunda análise constatou-se que por *Culex nigripalpus* possuir maior abundância populacional no verão, quando as temperaturas são elevadas, e *Coquillettidia perturbans* no outono e primavera, quando as temperaturas são mais baixas, essas correlações ocorriam unicamente devido às alterações sazonais no tamanho da população.

Além da densidade populacional, a abordagem no campo esbarra em outras complicações, como o fato de que a curva de atividade obtida para uma população

pode camuflar variações individuais ou a impossibilidade de se estudar isoladamente a influência dos ciclos de temperatura sobre o comportamento, assim como os mecanismos moleculares que regem o funcionamento desse indicador ambiental.

A fim de amenizar essas problemáticas, em um estudo recente nosso grupo investigou em condições controladas de laboratório a influência de ciclos de temperatura com transições abruptas (retangulares) para duas espécies: o mosquito diurno *Aedes aegypti* e o noturno *Culex quinquefasciatus*. Foi constatado que mesmo na ausência dos ciclos de claro/escuro, os ciclos de temperatura seriam capazes de promover ritmos na atividade locomotora e na expressão de genes do relógio circadiano dessas espécies (Rivas, 2010). Além disso, sugerimos que os ciclos de temperatura sejam mais importantes para *Ae. aegypti* do que para *Cx. quinquefasciatus*, uma vez que em ciclos de claro/escuro e temperatura fora de fase *Ae. aegypti* distribui a sua atividade entre a fase clara-fria e a fase escura-quente, enquanto a atividade de *Cx. quinquefasciatus* permanece concentrada na fase escura-quente (Rivas, 2010).

Embora tenhamos dado um passo importante para a compreensão da influência dos ciclos de temperatura, a utilização de ciclos retangulares em laboratório poderia ocultar um dos papéis mais importantes dos ciclos de temperatura no campo: a influência da mínima e máxima temperatura sobre os picos de atividade matinal e vespertino. Além disso, em *D. melanogaster*, evidências recentes demonstram que a atividade dessa espécie assume um perfil diferente em ciclos de temperatura retangulares comparado a ciclos de temperatura graduais com variações mais próximas ao natural (Yoshii *et al.*, 2009).

Assim, procuramos padronizar para uso em laboratório um regime seminatural que fosse o mais próximo possível das variações diárias de temperatura ao longo de um dia no Rio de Janeiro (**figura 4.1**). Escolhemos como modelo o mosquito *Aedes aegypti*, devido à grande importância epidemiológica desses vetores e a influência dos ciclos de temperatura para a modulação de sua atividade. Nossa análise revelou que os ciclos temperatura graduais que produzimos é tão eficiente para sincronizar e arrastar a atividade de *Ae. aegypti* quanto os já conhecidos ciclos retangulares, com a vantagem de não produzir artefatos experimentais após as mudanças abruptas de temperatura (**figura 4.2, figura 4.3**).

Com relação aos picos de atividade, diferentemente do que ocorre em *D. melanogaster* (Yoshii *et al.*, 2009, Bywalez *et al.*, 2012), não observamos qualquer indício do pico matinal em mosquitos submetidos a ciclos de temperatura graduais ou retangulares (**figura 4.2**). Levando em consideração que o pico M não é controlado pelo relógio em *Ae. aegypti*, mas está presente em ciclos de claro/escuro retangulares (Taylor & Jones, 1969; Jones, 1981; Gentile *et al.*, 2009), é provável que os ciclos de temperatura não consigam promover o mascaramento do pico matinal na ausência dos ciclos de claro/escuro.

Ainda no que diz respeito aos picos de atividade, observamos que o pico E ocorre em um horário diferente em ciclos de temperatura graduais com relação aos ciclos de temperatura retangulares (**figura 4.2**). Se compararmos à fase que esse pico assume em ciclos de claro/escuro (ZT12) (Gentile *et al.*, 2009), podemos constatar uma antecipação maior em ciclos de temperatura retangulares (ZT6) do que em ciclos de temperatura graduais (ZT8). Considerando que o pico vespertino está sob o controle circadiano, é bastante provável que os ciclos claro/escuro e temperatura graduais promovam a sincronização do relógio com maior sinergia do que ciclos de claro/escuro e temperatura retangulares.

Para melhor entender como os ciclos de temperatura graduais atuam na presença dos ciclos de claro/escuro, expusemos os mosquitos a esses indicadores ambientais simultaneamente. Observamos que nessas condições o pico E passa a se concentrar no ZT12 (**figura 4.4**), o mesmo horário que esse pico ocorre em ciclos de claro/escuro (Gentile *et al.*, 2009), demonstrando a importância dos ciclos de claro/escuro para o ajuste de fase do pico vespertino. Constatamos também que o pico M exibe uma baixa amplitude no regime que simulamos, sugerindo que temperaturas de 20°C encontradas nos equinócios no começo da manhã poderiam inibir o pico matinal.

Os ciclos de temperatura graduais que produzimos representam variações médias encontradas durante o ano no Rio de Janeiro. Mas no inverno a temperatura mínima pode facilmente cair dos 20°C (**figura 5.1 A**), enquanto no verão se mantém quase sempre acima desses patamares (**figura 5.1 B**). Assim, é bastante provável que esses mosquitos apresentem um padrão bimodal de atividade no verão e um perfil mais crepuscular no inverno do Rio de Janeiro. Similar ao que especulamos

para o Rio de Janeiro, Suwannachote (2009), em sua abordagem no campo, descreve coletar menos mosquitos *Ae. aegypti* nas manhãs de inverno da Tailândia onde registra-se temperaturas mínimas de $\approx 21^{\circ}\text{C}$.

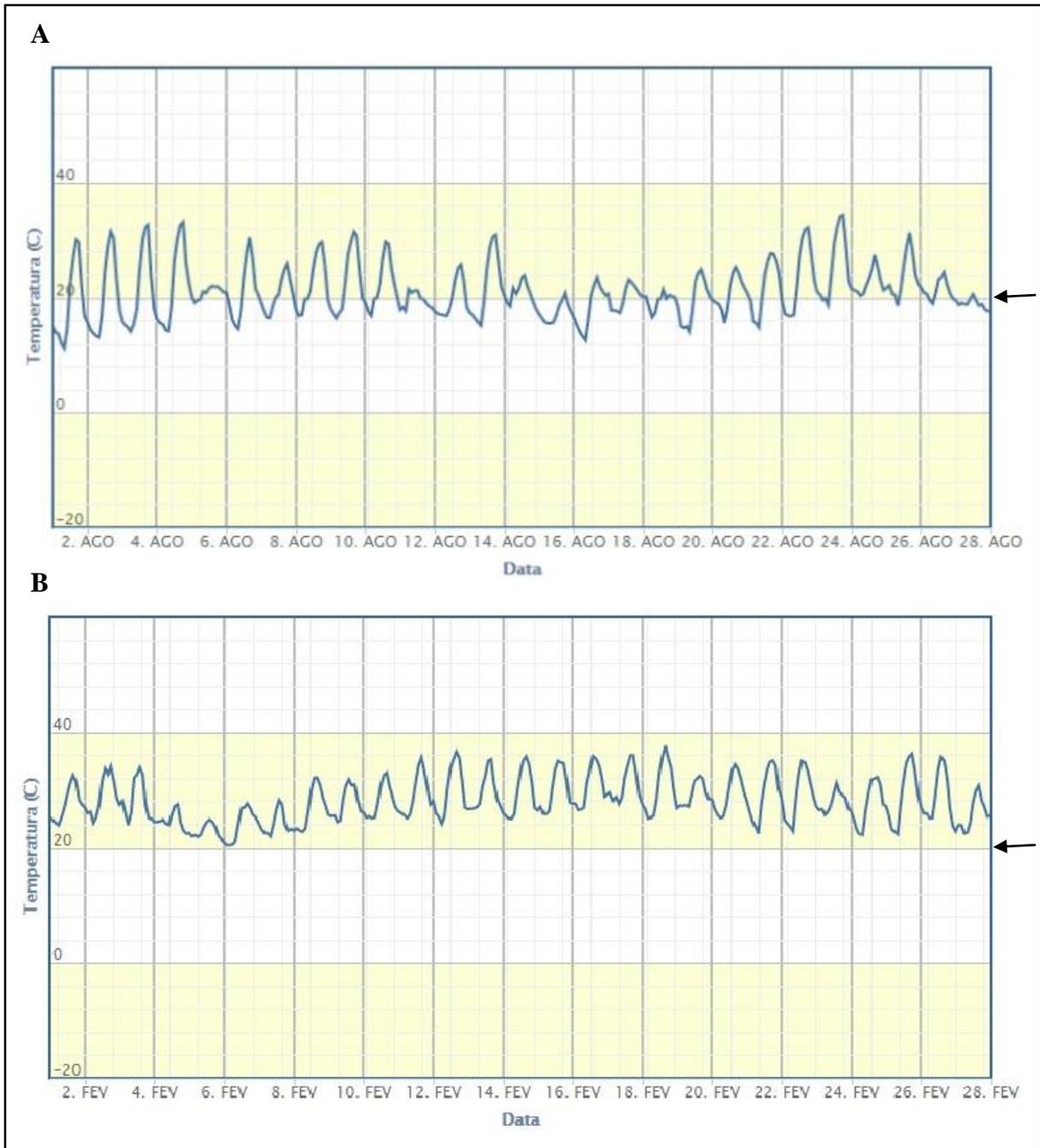


Figura 5.1: Temperaturas em um mês de inverno e verão no Rio de Janeiro. Temperaturas diárias registradas pelo Instituto Nacional de Meteorologia, na estação A621, Vila Militar, Rio de Janeiro. **(A)** Temperaturas diárias em um mês de inverno (agosto de 2013). **(B)** Temperaturas diárias em um mês de verão (fevereiro de 2013). **(A-B)** Os gráficos foram retirados do site inmet.gov.br. As setas indicam temperaturas de 20°C . **Figura 4.9: Análise do onset, offset e picos.** **(A)** Análise individual da fase do

Para melhor avaliar a influência dos ciclos de claro/escuro e temperatura graduais, nosso próximo passo, foi submeter os mosquitos a esses indicadores em fases conflitantes. Nessas condições vemos um aumento do pico matinal e a diminuição do pico vespertino quando comparado aos ciclos graduais em fase (**figura 4.4**), o que reforça a influência dos ciclos de temperatura para a amplitude dos picos de atividade. Mas não observamos uma distribuição da atividade entre a fase clara e a fase escura em ciclos graduais conflitantes, como Rivas (2010) havia descrito em ciclos retangulares conflitantes.

Curiosamente, em sua análise Rivas utiliza exatamente as mesmas temperaturas máximas (30°C) e mínimas (20°C) que empregamos em nosso estudo. É provável que *Ae. aegypti*, sendo uma espécie diurna, tenha preferência por concentrar sua atividade na fase clara. Mas nesse regime retangular conflitante, durante toda a fase clara os mosquitos estão expostos a 20°C, temperatura que descrevemos inibir a atividade de *Ae. aegypti*. Assim, é possível que em ciclos retangulares conflitantes *Ae. aegypti* seja parcialmente ativo à noite como uma “fuga” das baixas temperaturas encontradas durante o dia.

Por outro lado, quando os mosquitos estão em ciclos graduais conflitantes a temperatura mínima (20°C) que inibiria a sua atividade não acontece durante uma fase e sim durante um momento: o ZT12, onde o pico vespertino ocorre (**figura 4.4**). Coincidentemente, em ciclos graduais conflitantes, a atividade não se divide entre fases (clara ou escura), mas o que se divide é o pico vespertino. O pico E sofre o que chamamos em cronobiologia de desacoplamento, dando origem a um pico que permanece na mesma fase e a outro que se antecipa (**figura 4.4**).

Uma vez que o pico vespertino é aquele que está sob o controle do relógio, investigamos se as alterações comportamentais refletiriam alterações em genes que compõem o relógio na cabeça de *Ae. aegypti*. Observamos que em ciclos de claro/escuro e temperatura graduais em fase todos os genes analisados (*per*, *tim*, *cry2*, *cyc*, *vri* e *Pdp1*) (**figura 4.6**) apresentaram um padrão de expressão muito semelhante ao descrito por Gentile e colaboradores (2009) em ciclos de claro/escuro.

Quando colocamos esses mosquitos em ciclos graduais conflitantes, vimos que os genes da primeira alça (*per*, *tim* e *cry2*) apresentam uma redução de expressão, enquanto os genes da segunda alça (*cyc*¹, *vri* e *Pdp1*) sofrem uma

antecipação se comparado aos ciclos em fase (**figura 4.6**). Em *Drosophila melanogaster*, as alças regulatórias do relógio circadiano podem ter diferentes funções. Os componentes da primeira alça PER-TIM, ao interagir com CLK-CYC, têm a capacidade de inibir a expressão de *vri*, *Pdp1* e *E75* (Zheng *et al.*, 2009; Cyran *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2014). Por outro lado, a segunda alça parece não intervir diretamente na regulação da primeira. Kim e colaboradores (2002) demonstram isso ao colocar um promotor de *per* ou *tim* no gene *Clk*. A inversão de fase na expressão de *Clk* pouco interfere na expressão dos genes da primeira alça.

No entanto, diversos estudos de microarranjo vêm demonstrando que grande parte dos RNAs rítmicos da cabeça de *Drosophila melanogaster* apresentam uma fase de expressão similar a *Clk* (Ceriani *et al.*, 2002; Claridge-Chang *et al.*, 2001; Keegan *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2002b; McDonald and Rosbash, 2001; Ueda *et al.*, 2002; Wijnen *et al.*, 2006). Além disso, o silenciamento ou o aumento na expressão de *Pdp1* suprimem os ritmos comportamentais (Benito *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2009).

Essas evidências sugerem que enquanto a primeira alça está principalmente envolvida na regulação do relógio circadiano, a segunda alça funcionaria como um *link* entre o relógio e os genes de *output*, responsáveis pelos mais variados processos rítmicos em *Drosophila melanogaster*. Sendo assim, em um modelo meramente especulativo para *Ae. aegypti*, talvez a baixa expressão dos repressores *per*, *tim* e *cry2* leve à expressão antecipada de *vri*, *Pdp* e *cyc*, e por conseguinte à antecipação observada ao nível comportamental em ciclos conflitantes.

Diante da evidente importância dos ciclos de temperatura para a sincronização do relógio circadiano e dos ritmos de atividade do vetor *Ae. aegypti*, investigamos que estrutura seria capaz de interpretar a informação passada por esse indicador ambiental. Em *D. melanogaster*, a sincronização pelos ciclos de temperatura se inicia nos neurônios periféricos, através dos órgãos cordotonais. Essas estruturas seriam capazes de interpretar os ciclos de temperatura e transmitir a informação até o marcapasso central no cérebro (Sehadova *et al.*, 2009).

1 – Diferente de *D. melanogaster*, em *Ae. aegypti* *cyc* apresenta uma expressão cíclica, uma fase semelhante à *Clk*, além de aparentemente possuir sítios V/P-boxes em sua região promotora (Gentile *et al.*, 2009; Rivas, comunicação pessoal). Assim, consideramos que esse gene faça parte da segunda alça.

Sabendo que o gene *nocte* causa prejuízos ao funcionamento dos órgãos cordotonais e a sincronização pelos ciclos de temperatura, promovemos *knockdown* por RNA de interferência desse gene no mosquito *Ae. aegypti*. A redução na expressão de *nocte* parece ser bastante semelhante ao alcançado por Gentile e colaboradores (2013b) utilizando a mesma metodologia para o gene *timeless*. Similar ao descrito por esse grupo, observamos no quarto dia após a injeção do dsRNA, uma redução na expressão de *nocte* para cerca de 40% no corpo e um silenciamento ainda mais pronunciado na cabeça de *Ae. aegypti* (**Figura 4.7**).

Quando submetemos os mosquitos silenciados para *nocte* aos ciclos fora de fase, observamos que o *offset* assim como os picos originados do desacoplamento do pico E permanecem idênticos ao dos mosquitos injetados com dsRNA de *LacZ* ou não injetados (**figura 4.8, figura 4.9 A e C**). Por outro lado, os mosquitos silenciados para *nocte* apresentaram uma menor amplitude de atividade e um padrão de *onset* intermediário, entre o *onset* encontrado em ciclos em fase e aquele observado em ciclos conflitantes (**figura 4.8, figura 4.9 B, anexo 1**).

Visto que em *D. melanogaster* a sincronização pelos ciclos de temperatura se inicia nos tecidos periféricos, é possível que nos mosquitos injetados com o dsRNA de *nocte*; a pouca, porém existente, expressão desse gene no corpo seja suficiente para promover diferentes respostas individuais. Enquanto alguns indivíduos conseguiriam responder normalmente, antecipando o seu *onset* quando deslocamos a fase dos ciclos de temperatura (ciclos conflitantes); para outros, a redução na expressão de *nocte* prejudicaria essa antecipação.

Uma vez que as influências mais evidentes dos ciclos de temperatura graduais ocorrem sobre a amplitude dos picos de atividade e o *onset* do pico E, o fato dos mosquitos silenciados para *nocte* apresentarem prejuízo justamente nesses parâmetros nos indica a influência de *nocte* para a sincronização pelos ciclos de temperatura em *Ae. aegypti*. Como em *D. melanogaster* *nocte* está ligado ao funcionamento dos órgãos cordotonais, é provável que tais estruturas atuem na sincronização pelos ciclos de temperatura nesses importantes vetores.

6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- Conseguimos estabelecer em laboratório um ciclo de temperatura gradual capaz de sincronizar a atividade de *Ae. aegypti* de forma similar ao que ocorre na natureza. Como em nossas análises utilizamos as aferições do Rio de Janeiro, acreditamos que futuros estudos empregando o mesmo protocolo para diferentes regiões e épocas do ano poderão vir a contribuir bastante para o entendimento da influência dos ciclos de temperatura sobre essa espécie.
- A análise dos ciclos graduais em fase ou fora de fase nos permite supor que os ciclos de claro/escuro atuem fixando o horário dos picos e limitando a fase clara como a faixa em que a atividade deve preferencialmente ocorrer. Por outro lado os ciclos de temperatura graduais parecem interferir diretamente na amplitude dos picos de atividade e na fase do pico vespertino. Sendo assim, provavelmente esses indicadores atuem em sinergia na natureza para promover a completa sincronização da atividade de *Ae. aegypti*.
- Considerando que a nossa análise se limitou a observar dois regimes onde a diferença de fase era de zero (ciclos em fase) ou de doze horas (ciclos conflitantes), futuros estudos em regimes com diferença de fases maiores ou menores, como proposto por Pittendrigh & Bruce (1959) e Oda & Friesen (2011), poderão ajudar a responder se existe em *Ae. aegypti* uma hierarquia entre esses indicadores ambientais.
- Nossos resultados sugerem que as alterações observadas ao nível comportamental em ciclos conflitantes sejam em grande parte o reflexo de alterações no relógio circadiano. Acreditamos que enquanto os genes da primeira alça (*per*, *tim* e *cry2*) diminuem a amplitude de sua expressão, os genes da segunda alça (*cyc*, *vri* e *Pdp1*) sofreriam uma antecipação em ciclos fora de fase.
- Ao expor o mosquito *Ae. aegypti* aos ciclos de claro/escuro e temperatura em fase ou fora de fase, pudemos constatar que regimes

com a mesma temperatura média (25°C) produziram efeitos completamente diferente sobre os ritmos de atividade e expressão circadiana. Isso nos sugere que a mínima e máxima temperaturas encontradas durante o amanhecer e o crepúsculo sejam mais importantes para a nível de atividade do vetor *Ae. aegypti* do que as médias diárias.

- Uma vez que o relógio circadiano controla não apenas os ritmos de atividade em *Ae. aegypti*, como também o crescimento, imunidade, resposta a inseticidas etc (Ptitsyn *et al.*, 2011; Leming *et al.*, 2014), é possível que investigações utilizando os ciclos de temperatura graduais que propomos garanta efeitos sobre a fisiologia e o desenvolvimento mais próximo ao encontrado na natureza do que as tradicionalmente utilizadas, temperaturas constantes (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Chan & Johansson, 2012; Polson *et al.*, 2012; Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2013).
- Por fim, demos um importante passo para a elucidação de como os ciclos de temperatura sincronizam o relógio circadiano. Uma vez que os mosquitos silenciados para um gene que participa do funcionamento dos órgãos cordotonais (*nocte*) tiveram prejuízos na sincronização pelos ciclos de temperatura, é bastante provável que tais estruturais desempenhem esse papel. Futuros estudos poderão investigar nos mosquitos silenciados para *nocte* os possíveis defeitos estruturais gerados nos órgãos cordotonais e o efeito da diminuição de expressão desse gene sobre o relógio circadiano.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abruzzi, K.C.; Rodriguez, J.; Menet J.S.; Desrochers, J.; Zadina, A.; Luo, W., Tkachev, S. and Rosbash, M. (2011) *Drosophila* CLOCK target gene characterization: implications for circadian tissue-specific gene expression. *Genes Dev.* 25, 2374–2386.

Akten, B.; Jauch, E.; Genova, G.K.; Kim, E.Y.; Edery, I.; Raabe, T. and Jackson, F.R. (2003) A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator. *Nat. Neurosci.* 6, 251–257.

Allada, R.; White, N.E.; So, W.V.; Hall, J.C. and Rosbash, M. (1998). A mutant *Drosophila* homolog of mammalian *Clock* disrupts circadian rhythms and transcription of *period* and *timeless*. *Cell* 93, 791–804.

Amoretty, P.R.; Padilha, K.P.; Freitas, R.T.; Bruno, R.V. (2013) Uso de *Drosophila melanogaster* como modelo para o estudo do relógio circadiano em insetos vetores. *Acta Scientiae et Technicae*, v. 1, p. 1, 2013.

Aschoff J. (1960) Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 25: 11-28.

Bachleitner, W.; Kempinger, L.; Wulbeck, C; Rieger, D; Helfrich-Forster, C (2007) Moonlight shifts the endogenous clock of *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, vol. 104, n°. 9

Bargiello, T.A. and Young, M.W. (1984) Molecular genetics of a biological clock in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:2142-2146.

Bargiello, T.A.; Saez, L.; Baylies, M.K.; Gasic, G.; Young, M.W. and Spray, D.C. (1987) The *Drosophila* clock gene *per* affects intercellular junctional communication. *Nature* 328:686-691.

Banerji, J.; Sands, J.; Strominger, J.L. and Spies, T. (1990) A gene pair from the human major histocompatibility complex encodes large proline-rich proteins with multiple repeated motifs and a single ubiquitin-like domain. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 87: 2374-2378.

Benito, J., Zheng, H., and Hardin, P. E. (2007). PDP1epsilon functions downstream of the circadian oscillator to mediate behavioral rhythms. *J. Neurosci.* 27, 2539–2547.

Bidlingmayer, W.L. (1967) A comparison of trapping methods for adult mosquitoes: Species response and environmental influence. *J Med Entomol* 4 200-220

Bidlingmayer, W.L. (1974) The influence of environmental factors and physiological stage on flight patterns of mosquitoes taken in the vehicle aspirator and truck, suction, bait and New Jersey light traps. *J Med Entomol* 11: 119-146

Bidlingmayer, W.L. (1985) The measurement of adult mosquito population changes-some considerations. *J Am Mosq Control Assoc* 1: 328-348

Boothroyd, C.E.; Wijnen, H.; Naef, F.; Saez, L. and Young, M.W. (2007) Integration of light and temperature in the regulation of circadian gene expression in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 3, e54.

Busza, A.; Emery-Le, M.; Rosbash, M. and Emery, P. (2004) Roles of the two *Drosophila* CRYPTOCHROME structural domains in circadian photoreception. *Science.* 304, 1503–1506.

Busza, A.; Murad, A. and Emery, P. (2007) Interactions between circadian neurons control temperature synchronization of *Drosophila* behavior. *J. Neurosci.* 27, 10722–10733.

Bywalez; Menegazzi P.; Rieger D.; Schmid B.; Helfrich-Förster C. and Yoshii. T. (2012) The Dual-Oscillator System of *Drosophila melanogaster* Under Natural-Like Temperature Cycles. *Chronobiology International*, 29(4): 395–407

Ceriani, M. F., Hogenesch, J. B., Yanovsky, M., Panda, S., Straume, M., and Kay, S. A. (2002). Genome-wide expression analysis in *Drosophila* reveals genes controlling circadian behavior. *J. Neurosci.* 22, 9305–9319.

Chan, M. and Johansson, M. A. The Incubation Periods of Dengue Viruses. (2012). The Incubation Periods of Dengue Viruses. *PLoS ONE* 7(11): e50972. doi:10.1371/journal.pone.0050972.

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

Claridge-Chang, A., Wijnen, H., Naef, F., Boothroyd, C., Rajewsky, N., and Young, M. W. (2001). Circadian regulation of gene expression systems in the *Drosophila* head. *Neuron* 32, 657–671.

Clements, A.N. (1999) *The Biology of Mosquitoes Vol. 2: Sensory Reception and Behaviour*. New York: CABI Publishing.

Collins, B.H.; Rosato, E. and Kyriacou, C.P. (2004) Seasonal behavior in *Drosophila melanogaster* requires the photoreceptors, the circadian clock, and phospholipase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 1945–1950.

Consoli, R.A.G.B and Oliveria, R.L. (1994) *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.*, Fiocruz., Rio de Janeiro.

Corbet, P.S. (1965). Reproduction in mosquitoes of the high arctic. *Proc. XIIth Int. Congr. Em., London* 817-18.

Corbet, P.S. (1966b.) Diel patterns of mosquito activity in a high arctic locality: Hazen Camp, Ellesmere Island, N.W.T. *Can. Entomol.* 98: 1238-52.

Corbet, P.S. and H.V. Danks. (1973). Seasonal emergence and activity of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a high arctic locality. *Can. Entomol.* 105:837-72.

Costa, E.A.P.A; Santos, E. M. M; Correia J. C. and Albuquerque C. M. R. (2010). Impact of small variations in temperature and humidity on the reproductive activity and survival of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 54(3): 488–493.

Currie, J.; Goda T. and Wijnen H. (2009) Selective entrainment of the *Drosophila* circadian clock to daily gradients in environmental temperature. *BMC Biology*, 7:49 doi:10.1186/1741-7007-7-49

Cyran, S.A.; Buchsbaum, A.M.; Reddy, K.L.; Lin, M.C.; Glossop, N.R.; Hardin, P.E.; Young, M.W.; Storti, R.V. and Blau, J. (2003) *vriille*, *Pdp1*, and *dClock* form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*. 112, 329–341.

Darlington, T.K.; Wager-Smith, K.; Ceriani, M.F.; Staknis, D.; Gekakis, N.; Steeves, T.D.; Weitz, C.J.; Takahashi J.S. and Kay S.A. (1998) Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science*. 280, 1599-1603.

Das, S. & Dimopoulos, G. (2008) Molecular analysis of photic inhibition of blood-feeding in *Anopheles gambiae*. *BMC Physiology*. 16, 8-23.

De, J.; Varma V.; Saha, S.; Sheeba, V. and Sharma, V.K. (2013) Significance of activity peaks in fruit flies, *Drosophila melanogaster*, under seminatural conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 28;110(22):8984-9

Dolezelova, E.; Dolezel, D. and Hall J.C. (2007) Rhythm Defects Caused by Newly Engineered Null Mutations in *Drosophila's cryptochrome* Gene. *Genetics*. Sep; 177(1): 329–345.

Ederly, I.; Zwiebel, L.J.; Dembinska, M.E. and Rosbash, M. (1994) Temporal phosphorylation of the *Drosophila period* protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91, 2260-2264.

Egan, E.S.; Franklin, T.M.; Hilderbrand-Chae, M.J.; McNeil, G.P.; Roberts, M.A.; Schroeder, A.J.; Zhang, X. and Jackson, F.R. (1999). An extra retinally expressed insect *cryptochrome* with similarity to the blue light photoreceptors of mammals and plants. *J. Neurosci*. 19, 3665–3673.

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

Emery, P.; Stanewsky, R.; Hall, J.C. and Rosbash, M. (2000a). A unique circadian-rhythm photoreceptor. *Nature*. 404, 456–457.

Emery, P.; Stanewsky, R.; Helfrich-Forster, C.; Emery-Le, M.; Hall, J.C. and Rosbash M. (2000b) *Drosophila* CRY Is a Deep Brain Circadian Photoreceptor. *Neuron*, Vol. 26, 493–504,

Foster, R. and Kreitzman, L. (2005) Rhythms of life: The biological clocks that control the daily lives of every living thing. Profile books Ltd, London.

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, G.B.; Meireles-Filho, A.C.; Lima, J.B. and Peixoto, A.A. (2009) Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: *cry2* is different. J Biol Rhythms. 24 (6), 444-51.

Gentile, C.; Sehadova, H.; Simoni, A.; Chen, C. and Stanewsky, R. (2013a) *Cryptochrome* Antagonizes Synchronization of *Drosophila's* Circadian Clock to Temperature Cycles. Current Biology 23, 1–11.

Gentile, C; Rivas, G.B.S.; Lima, J.B.P.; Bruno R.V. and Peixoto A.A. (2013b) Circadian clock of *Aedes aegypti*: effects of blood-feeding, insemination and RNA interference. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 108(Suppl. I): 80-87.

Glaser, F.T. and Stanewsky, R. (2005) Temperature synchronization of the *Drosophila* circadian clock. Curr Biol. 15, 1352-63.

Glaser, F.T. and Stanewsky, R. (2007) Synchronization of the *Drosophila* circadian clock by temperature cycles. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 72, 233–242.

Gekakis, N.; Saez, L.; Delahaye-Brown, A.M.; Myers, M.P.; Sehgal, A.; Young, M.W. and Weitz, C.J. (1995) Isolation of TIMELESS by PER protein interaction: defective interaction between TIMELESS protein and long-period mutant PERL. Science; 270: 811-815.

Glossop, N.R.; Houl, J.H.; Zheng, H.; Ng, F.S.; Dudek, S.M. and Hardin, P.E. (2003). VRILLE feeds back to control circadian transcription of *Clock* in the *Drosophila* circadian oscillator. Neuron 37, 249–261.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41, 95-98.

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

Hashimoto, M.; Nakamura, N.; Obayashi, H.; Kimura, F.; Moriwaki, A.; Hasegawa, G.; Shigeta, H.; Kitagawa, Y.; Nakano, K.; Kondo, M.; Ohta, M., Nishimura, M. (1999) Genetic contribution of the BAT2 gene microsatellite polymorphism to the age-at-onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *Hum Genet.*; 105(3):197-9.

Helfrich-Forster C. (2000) Differential control of morning and evening components in the activity rhythm of *Drosophila melanogaster* - sex-specific differences suggest a different quality of activity. *J Biol Rhythms.* 15,135-154.

Helfrich-Forster, C.; Winter, C.; Hofbauer, A.; Hall, J.C. and Stanewsky, R. (2001) The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron.* 30, 249–261.

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

Ishikawa, T.; Matsumoto, A.; Kato, T. Jr; Togashi, S.; Ryo, H.; Ikenaga, M.; Todo, T.; Ueda, R. and Tanimura, T. (1999) DCRY is a *Drosophila* photoreceptor protein implicated in light entrainment of circadian rhythm. *Genes Cells.*;4(1):57-65

Johnson, C.H.; Elliott, J.A. and Foster, R. Entrainment of circadian programs. (2003) *Chronobiol Int.* 20,741-774.

Jones, M.D.R (1981) The programming of circadian flight-activity in relation to mating and the gonotrophic cycle in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Physiological Entomology* 6:307-313.

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

Keegan, K. P., Pradhan, S., Wang, J. P., and Allada, R. (2007). Meta-analysis of *Drosophila* circadian microarray studies identifies a novel set of rhythmically expressed genes. *PLoS Comput. Biol.* 3, e208.

Kernan, M.J. (2007) Mechanotransduction and auditory transduction in *Drosophila*. *Pflugers Arch.* 454, 703–720.

Kim, E. Y., Bae, K., Ng, F. S., Glossop, N. R., Hardin, P. E., and Edery, I. (2002). *Drosophila* CLOCK protein is under posttranscriptional control and influences light-induced activity. *Neuron* 34, 69–81.

Kim, E.Y., and Edery, I. (2006) Balance between DBT/CKepsilon kinase and protein phosphatase activities regulate phosphorylation and stability of *Drosophila* CLOCK protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 6178–6183.

Kloss B.; Price J.L.; Saez L.; Blau J.; Rothenfluh A.; Wesley C.S. and Young M.W. (1998) The *Drosophila* clock gene *double-time* encodes a protein closely related to human *casein kinase I epsilon*. *Cell.* 94, 97-107.

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

Konopka, R.J. and Benzer, S. (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68,2112-2116.

Kumar, S.; Chen D.; Jang, C.; Nall, A.; Zheng, X and Sehgal, A. (2014) An ecdysone-responsive nuclear receptor regulates circadian rhythms in *Drosophila* NATURE COMMUNICATIONS, 5:5697 DOI: 10.1038

Leming, M.T; Rund, S.S.C; Behura, S.K.; Duffield, G.E. and O'Tousa J.E. (2014) A database of circadian and diel rhythmic gene expression in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *BMC Genomics*, 15:1128

Levine, J.D.; Funes, P.; Dowse, H.B. and Hall J.C. (2002) Advanced analysis of a *cryptochrome* mutation's effects on the robustness and phase of molecular cycles in isolated peripheral tissues of *Drosophila*. *BMC Neurosci* 15;3:5.

Lim, C.; Chung, B.Y.; Pitman, J.L.; McGill, J.J.; Pradhan, S.; Lee, J.; Keegan, K.P.; Choe, J. and Allada, R. (2007) *Clockwork orange* encodes a transcriptional repressor important for circadian clock amplitude in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 17, 1082–1089.

Lima-Camara, T.N.; Bruno R.V.; Luz P.M.; Castro M.G.; Lourenço-de-Oliveira R.; Sorgine M.H. and Peixoto A.A. (2011) Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. PLoS One. 8, e17690.

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

Lin, J.M.; Kilman, V.L; Keegan, K.; Paddock, B., Emery-Le, M.; Rosbash, M., and Allada, R. (2002a) A role for *casein kinase 2 alpha* in the *Drosophila* circadian clock. Nature. 420, 816–820.

Lin, Y., Han, M., Shimada, B., Wang, L., Gibler, T. M., Amarakone, A., Awad, T. A., Stormo, G. D., Van Gelder, R. N., and Taghert, P. H. (2002b). Influence of the *period*-dependent circadian clock on diurnal, circadian, and aperiodic gene expression in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 9562–9567.

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

Lourenço-de-Oliveira R., Rua R.V, Vezzani D., Willat G., Vazeille M., Mousson L. and Failloux A.B. (2013) *Aedes aegypti* from temperate regions of South America are highly competent to transmit dengue virus. BMC Infectious Diseases 2013, 13:610.

Majercak, J.; Sidote, D.; Hardin, P. E. and Ederly, I. (1999) How a circadian clock adapts to seasonal decreases in temperature and day length. Neuron. 24, 219–230.

Majercak, J.; Chen, W.F. and Ederly, I. (2004) Splicing of the period gene 30-terminal intron is regulated by light, circadian clock factors, and phospholipase C. Mol. Cell. Biol. 24, 3359–3372.

Marques, N. and Menna-Barreto, L. (1999) Cronobiologia: princípios e aplicações, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Martinek, S.; Inonog, S.; Manoukian, A.S. and Young, M.W. (2001) A role for the segment polarity gene *shaggy/GSK-3* in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*. 105, 769–779.

Matsumoto, A.; Ukai-Tadenuma, M.; Yamada, R.G.; Houl, J.; Uno, K.D.; Kasukawa, T.; Dauwalder, B.; Itoh, T.Q.; Takahashi, K.; Ueda, R.; Hardin, P.E.; Tanimura, T. and Ueda H.R. (2007) A functional genomics strategy reveals *clockwork orange* as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. *Genes Dev*. 21, 1687–1700.

McDonald, M. J., and Rosbash, M. (2001). Microarray analysis and organization of circadian gene expression in *Drosophila*. *Cell* 107, 567–578.

Miyasako, Y.; Umezaki, Y. and Tomioka, K. (2007) Separate sets of cerebral clock neurons are responsible for light and temperature entrainment of *Drosophila* circadian locomotor rhythms. *J. Biol. Rhythms*. 22, 115–126.

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

Myers, M.P.; Wager-Smith, K.; Wesley, C.S.; Young, M.W. & Sehgal A. Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, *timeless*. *Science* 1995; 270: 805-808.

Myers M.P.; Wager-Smith K.; Rothenfluh-Hilfiker A. and Young M.W. (1996) Light-induced degradation of TIMELESS and entrainment of the *Drosophila* circadian clock. *Science*. 271, 1736–1740.

Naidoo, N.; Song, W.; Hunter-Ensor, M. and Sehgal, A. (1999) A role for the proteasome in the light response of the *timeless* clock protein. *Science*. 285, 1737–1741.

Nene, V.; Wortman, J.R.; Lawson, D.; Haas, B.; Kodira, C. *et al* (2007). Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*. 22;316(5832):1718-23.

Nielsen, E. T. and H. T. Nielsen. (1966). Observations on mosquitoes in Greenland. *Medd. Gronland* 170:5-9,

Nitabach, M.N., and Taghert, P.H. (2008) Organization of the *Drosophila* circadian control circuit. *Curr. Biol.* 18, R84–R93. Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Res* 29,e45.

Oda, G. and Friesen, W. O. (2011) Modeling Two-Oscillator Circadian Systems Entrained by Two Environmental Cycles. *PLoS ONE* 6(8): e23895. doi:10.1371/journal.pone.0023895

Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.

Pittendrigh, C.S. (1954) On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 40, 1018-1029.

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

Pittendrigh, C.S. and Bruce V.G. (1959) Daily rhythms as coupled oscillator systems and their relation to thermoperiodism and photoperiodism. In: Withrow RB, editor. *In Photoperiodism and related phenomena in plants and animals.* Washington, DC: Am Assoc Adv Sci. pp. 475–505

Pittendrigh, C.S. and Daan, S. (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and lability of spontaneous frequency. *J. comp. Physiol.* 106: pp. 223-252

Price, J.L.; Dembinska, M.E.; Young, M.W. and Rosbash, M. (1995) Suppression of PERIOD protein abundance and circadian cycling by the *Drosophila* clock mutation *timeless*. *EMBO J.* 14, 4044-4049.

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

Ptitsyn, A.A.; Reyes-Solis, G.; Saavedra-Rodriguez, K.; Betz J.; Suchman, E.L.; Carlson, J.O. and Black, W.C. (2011). Rhythms and synchronization patterns in gene expression in the *Aedes aegypti* mosquito. *BMC Genomics.* 17, 12-153.

Polson, K. A.; Brogdon, W. G.; Rawlins, S. C. and Chadee D. D. (2012) Impact of environmental temperatures on resistance to organophosphate insecticides in *Aedes aegypti* from Trinidad. *Rev Panam Salud Publica* 32(1).

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

Richier, B., Michard-Vanhee, C., Lamouroux, A., Papin, C., and Rouyer, F. (2008). The clockwork orange *Drosophila* protein functions as both an activator and a repressor of clock gene expression. *J. Biol. Rhythms* 23, 103–116.

Rieger, D.; Stanewsky, R. and Helfrich-Forster, C. (2003) 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*. 18,377-391.

Rieger, D.; Fraunholz, C.; Popp, J.; Bichler, D.; Dittmann, R. and Helfrich-Förster C. (2007). The Fruit Fly *Drosophila melanogaster* Favours Dim Light and Times Its Activity Peaks to Early Dawn and Late Dusk, *J Biol Rhythms* 22: 387.

Rivas, G.B.S. (2010) Análise comparativa dos ritmos de atividade locomotora e expressão circadiana de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. Rio de Janeiro; Doutorado [Biologia Celular e Molecular] – Instituto Oswaldo Cruz.

Rivas, G. B. S.; Souza, N.A.; Peixoto, A. A. and Bruno, R. V. (2014) Effects of temperature and photoperiod on daily activity rhythms of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Parasites & Vectors*, 7:278

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

Saunders, D.S. (2002) *Insect Clocks*. 3rd edition. Elsevier.

Schmid, B.; Helfrich-Förster C. and Yoshii T. (2011) A new ImageJ plug-in "ActogramJ" for chronobiological analyses. *J Biol Rhythms*. 26(5), 464-7.

Sehadova, H.; Glaser, F.T.; Gentile, C.; Simoni, A.; Giesecke, A.; Albert, J.T. and Stanewsky R. (2009) Temperature entrainment of *Drosophila's* circadian clock involves the gene *nocte* and signaling from peripheral sensory tissues to the brain. *Neuron*. 64 (2), 251-66.

Sehgal, A.; Price, J. L.; Man, B. and Young, M. W. (1994). Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant *timeless*. *Science* 263, 1603–1606.

Sehgal, A.; Rothenfluh-Hilfiker, A.; Hunter-Ensor, M.; Chen, Y.; Myers, M. P. and Young, M. W. (1995). Rhythmic expression of *timeless*: A basis for promoting circadian cycles in *period* gene autoregulation. *Science* 270, 808–810.

Selby, C.P. and Sancar A. (1999) A third member of the photolyase/blue-light photoreceptor family in *Drosophila*: a putative circadian photoreceptor. *Photochem Photobiol*. 69(1):105-7.

Shearman, LP; Sriram, S; Weaver, DR; Maywood, ES; Chaves, I; Zheng, B; Kume, K; Lee, C.C.; van der Horst GT; Hastings M.H. (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288:1013-1019.

Simoni, A., Wolfgang, W., Topping, M. P., Kavlie, R. G., Stanewsky, R., Albert J.T. A Mechanosensory Pathway to the *Drosophila* Circadian Clock (2014). *SCIENCE VOL 343*.

Singal, D.P., Li J, Zhu Y. (2000) "HLA class III region and susceptibility to rheumatoid arthritis." *Clin Exp Rheumatol*. 18(4):485-491.

Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1995) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3rd edition. New York: W. H. Freeman.

Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S.A., Rosbash, M., and Hall, J.C. (1998). The *cryb* mutation identifies *cryptochrome* as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*. 95, 681–692.

Stanewsky, R. (2002) Clock mechanisms in *Drosophila*. *Cell Tissue Res*. 309, 11-26.

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

Suri V., Qian, Z., Hall, J.C. and Rosbash M. (1998) Evidence that the TIM light response is relevant to light-induced phase shifts in *Drosophila melanogaster*. *Neuron*. 21, 225-234.

Suwannachote N., Grieco J.P., Achee N.L., Suwonkerd W., Wongtong S., and Chareonviriyaphap T. (2009) Effects of environmental conditions on the movement patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) into and out of experimental huts in Thailand. *Journal of Vector Ecology*. Vol. 34, no. 2

Tachinardi P. (2012) Efeitos das variações de temperatura ambiental em ritmos circadianos. *Revista da Biologia* 9(3): 13–18

Taghert P.H. and Lin Y. (2005) Tick-Talk, the cellular and molecular biology of *Drosophila* circadian rhythms. In *Comprehensive Molecular Insect Science*, Elsevier, 357-394

Taylor B. and Jones M.D.R. (1969) 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* 51:59-70.

Tomioka K. and Yoshii T. (2006) Entrainment of *Drosophila* circadian rhythms by temperatura cycles. *Sleep and Biological Rhythms*. 4, 240–247.

Tomioka K. and Matsumoto A. (2010) A comparative view of insect circadian clock systems. *Cell. Mol. Life Sci*. 67, 1397–1406.

Tomotani B. M., and Oda G. A. (2012) Diurnos ou Noturnos? Discutindo padrões temporais de atividade. *Revista da Biologia*. 9(3): 1–6

Ueda, H. R., Matsumoto, A., Kawamura, M., Iino, M., Tanimura, T., and Hashimoto, S. (2002). Genome-wide transcriptional orchestration of circadian rhythms in *Drosophila*. *J. Biol. Chem*. 277, 14048–14052.

Vanin S., Bhutani S., Montelli S., Menegazzi P., Green E.W., Pegoraro M. Sandrelli F., Costa R. and Kyriacou C.P. (2012) Unexpected features of *Drosophila* circadian behavioural rhythms under natural conditions. *Nature*. 484, 371-376.

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

Wijnen, H., Naef, F., Boothroyd, C., Claridge-Chang, A., and Young, M. W. (2006). Control of daily transcript oscillations in *Drosophila* by light and the circadian clock. PLoS Genet. 2, e39.

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

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

Yoshii T., Fujii K. and Tomioka K. (2007) Induction of *Drosophila* Behavioral and Molecular Circadian Rhythms by Temperature Steps in Constant Light. J Biol Rhythms. 22; 103-114.

Yoshii, T., Hermann, C., and Helfrich-Forster, C. (2010). *Cryptochrome* positive and - negative clock neurons in *Drosophila* entrain differentially to light and temperature. J. Biol. Rhythms 25, 387–398.

Yoshii, T., Vanin, T. Costa R., Helfrich-Förster C. (2009) Synergic Entrainment of *Drosophila's* Circadian Clock by Light and Temperature J Biol Rhythms 24: 452

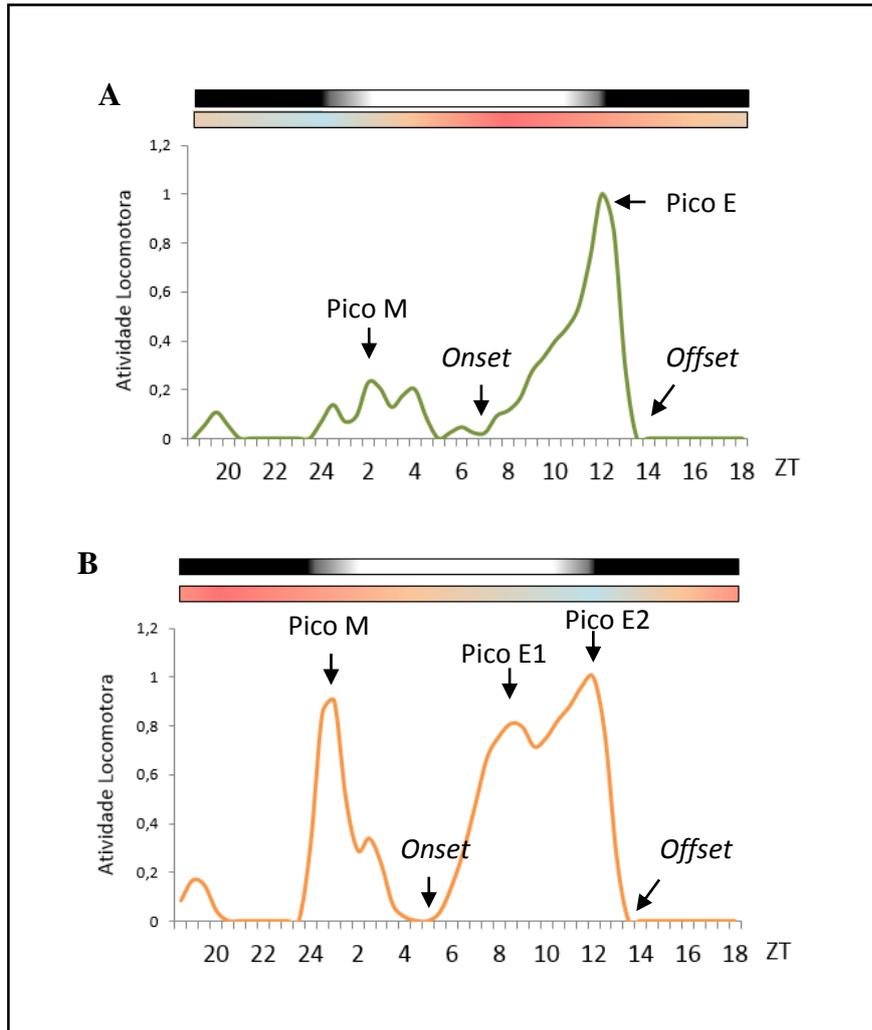
Yu Q., Jacquier A.C., Citri Y., Hamblen M., Hall J.C. and Rosbash M. (1987) Molecular mapping of point mutations in the *period* gene that stop or speed up biological clocks in *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci U S A 84:784-788.

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

Yuan Q., Metterville D., Briscoe A.D., Reppert S.M. (2007) Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. Molecular and Biology Evolution. 24, 948-55.

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

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



Anexo 1: Esquema representando os picos de atividade, o *onset* e o *offset* do pico E. (A) Atividade de um indivíduo em ciclos de claro/escuro e temperatura graduais em fase. (B) Atividade de um indivíduo em ciclos de claro/escuro e temperatura graduais fora de fase.