



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Pós-Graduação *Lato Sensu* em Entomologia Médica

Análise da expressão do gene *period* por hibridização *in situ* durante embriogênese do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Fernanda Ferreira Maissner

Orientadora: Prof^a Dra. Rafaela Vieira Bruno

Rio de Janeiro

2018

Fernanda Ferreira Maissner

Análise da expressão do gene *period* por hibridização *in situ* durante embriogênese do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Monografia apresentada como requisito para obtenção do grau de especialista, do Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Entomologia Médica, pelo Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Maria Goreti Rosa Freitas – Presidente

IOC/FIOCRUZ – Rio de Janeiro

Prof. Dr. José Luciano Nepomuceno da Silva

NUPEM/UFRJ – Campus Professor Aloísio Teixeira/Macaé

Dra. Luana Cristina Farnesi Ferreira

LABIMI, IOC/FIOCRUZ – Rio de Janeiro

Prof^ª. Dra. Dinair Couto Lima – Membro Suplente

IOC/FIOCRUZ – Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, 07 de dezembro de 2018

Maissner, Fernanda Ferreira.

Análise da expressão do gene *period* por hibridização *in situ* durante embriogênese do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) / Fernanda Ferreira Maissner. - Rio de Janeiro, 2018.

x,47 f.; il.

Monografia (Especialização) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Entomologia Médica, 2018.

Orientadora: Rafaela Vieira Bruno.

Bibliografia: f. 34-41

1. Genes de relógio. 2. *Aedes aegypti*. 3. *period*. 4. embriogênese. I. Título.

Dedico este trabalho *in memoriam* ao meu avô Rudolf Maissner
e minha tia Elazir Ferreira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus o dom da vida e ao Universo as boas energias que me mantiveram perseverante, ainda que, por vezes, não tenha entendido os caminhos que trilhava. Agradeço a Deus por sempre estar comigo.

Sou grata aos anjos da minha vida, que são as pessoas que mais me apoiaram e me ajudaram a chegar até aqui: meus pais Fátima e Maurício, os meus grandes e verdadeiros parceiros da vida.

Agradeço à minha tia Elazir, que me acolheu de braços abertos quando passei para este curso da Fiocruz, embora hoje ela não esteja mais presente comigo. Sei que vidas passadas infelizmente não mais testemunharão fisicamente a conclusão desta etapa, mas a senhora fez parte desta caminhada comigo, ainda que rompida de forma tão repentina. Deixo com este agradecimento minha saudade.

À minha orientadora Dra. Rafaela Bruno agradeço a oportunidade de me confiar este projeto com o qual trilhamos muitos desafios, os quais me fizeram crescer e amadurecer profissional e cientificamente. Valiosos foram os conselhos, a confiança o apoio e as sugestões.

Estendo minha gratidão à Dra. Flávia Borges Mury, minha primeira mãe científica, da UFRJ/Macaé, que sempre me acompanhou e me incentivou a continuar estudando, principalmente quando passei para a especialização e quem me indicou a Rafa como possível orientadora. Flavinha, você é uma pessoa alegre, com uma energia muito positiva e uma pessoa que admiro muito.

Também agradeço ao Dr. José Nepomuceno, professor e amigo, com quem, mesmo na distância, não perdi o contato. Ele sempre torceu pelo sucesso dos alunos, os quais, assim como eu, são muito gratos pelo ser inteligente e extrovertido que “anima a galera” da Biologia e do LIBHM-UFRJ/Macaé.

À equipe do LABIMI/IOC agradeço, especialmente: à Dra. Luana Farnesi, primeiramente pelo ser humano de bem com a vida que ela é e pela disponibilidade e atenção em me ensinar as técnicas básicas utilizadas; à Dra. Luciana Araripe, pelo convívio, pela serenidade e paz que traz ao ambiente; às mestrandas Andresa Borges e Jessica Rodrigues, pelas conversas diárias entre os experimentos, e ao técnico do laboratório, Robson Costa, pelo apoio de sempre – valeu, Robão!

Aos amigos da pós, em especial à Ana Beatriz Gois e à Marina Duarte, pela amizade que foi além da sala de aula, estendo meu muito obrigada pelo apoio de sempre, meninas!

Às amigas de longa data Sara Cabral e Geórgia Feltran meu carinho e gratidão por todo apoio que serem me deram e por serem as irmãs científicas que a vida me proporcionou.

À equipe do LAFICAVE do IBEx agradeço, por ter disponibilizado material para desenvolver esta pesquisa, em especial, ao técnico Gilberto, que proporcionou as rotinas de alimentação dos mosquitos: embora fosse apenas uma vez por semana, e aparentemente a convivência tenha sido pouca, você me ensinou muito, pois é um exemplo de ser humano com uma sabedoria enorme!

Agradeço também aos órgãos de fomento IOC (PAEF) e FAPERJ, pelos recursos financeiros que tornaram possível que este projeto acontecesse.

Aos membros da banca, Dra. Maria Goreti Rosa Freitas, Dra. Luana Farnesi, Dr. José Nepomuceno, e à Dra. Dinair Couto Lima, agradeço imensamente por aceitarem o convite de avaliar este trabalho.

Ao Dr. Ademir Martins agradeço pela revisão desta monografia e pela contribuição a esta pesquisa.

Ao carinho de todas as vezes da equipe da limpeza, em especial à Teca, ao Luciano (jardinagem) e à técnica Dona Neiva (LAGFB).

Por último, agradeço ao apoio de minha família, que, mesmo devido ao cotidiano agitado e à distância geográfica, sempre estiveram me incentivando a buscar e aproveitar as oportunidades que o conhecimento pode oferecer.

“Quando nada parece dar certo, vou ver o cortador de pedras martelando sua rocha talvez cem vezes, sem que uma única rachadura apareça. Mas, na centésima primeira martelada a pedra se abre em duas, e eu sei que não foi aquela que conseguiu isso, mas todas as que vieram antes.”

(Jacob Riis)

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1- INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Classe Insecta	01
1.1.1 O mosquito <i>Aedes aegypti</i>	01
1.2 Embriogênese em artrópodes.....	02
1.2.1 Embriogênese no <i>Ae. aegypti</i>	04
1.2.1.1 Características das cascas dos ovos de <i>Ae. aegypti</i> e etapas necessárias para estudo.....	05
1.3 Ritmos biológicos e Relógio Circadiano.....	08
1.3.1 Outros tipos de ritmos biológicos.....	10
1.3.2 Regulação molecular do relógio circadiano na <i>Drosophila melanogaster</i>	11
1.3.3 Relógio Circadiano e Insetos vetores.....	13
2- JUSTIFICATIVA DO TRABALHO.....	14
3- OBJETIVO GERAL.....	14
3.1 Objetivos específicos.....	14
4- METODOLOGIA.....	15
4.1 Criação de mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	15
4.2 Alimentação sanguínea das fêmeas.....	15
4.3 Postura sincronizada.....	15
4.4 Protocolo de remoção das cascas dos ovos de <i>Ae. aegypti</i>	16
4.5 Hibridização <i>in situ</i> em embriões de <i>Ae. aegypti</i>	17
5- RESULTADOS	20
5.1 Remoção do córion dos ovos de 5 HAOs	20
5.2 Remoção da casca dos ovos de 24 HAOs.....	21
5.3 Remoção da casca dos ovos de 12 HAOs.....	22
5.4 Hibridização <i>in situ</i> para <i>period</i>	24
5.4.1 Hibridização <i>in situ</i> em embriões de 5 HAOs.....	24
5.4.2 Hibridização <i>in situ</i> em embriões de 24 HAOs.....	25
5.4.3 Hibridização <i>in situ</i> em embriões de 12 HAOs.....	25
6- DISCUSSÃO.....	27
6.1 Motivação do Protocolo de remoção das cascas dos ovos.....	27
6.1.1 Remoção das cascas dos ovos de <i>Ae. aegypti</i>	27
6.2 Hibridização <i>in situ</i> para <i>period</i> em <i>Ae. aegypti</i>	30
7- CONCLUSÕES.....	33
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
9- ANEXOS.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	02
Figura 2 – Quadro comparativo entre classificação dos tipos de ovários em fêmeas, e banda germinal com exemplo de diferentes ordens de artrópodes.....	04
Figura 3 – Estágios de desenvolvimento do embrião de <i>Ae. aegypti</i> a 28 °C.....	05
Figura 4 – Esquema simplificado da formação e movimentação das membranas extra-embriônicas e da cutícula serosa.....	06
Figura 5 – Estágios da embriogênese associados à formação da cutícula serosa.....	07
Figura 6 – Relógio das flores, idealizado por Carolus Linnaeus.....	09
Figura 7 – Representação dos experimentos sobre o ritmo de abertura e fechamento foliares da <i>Mimosa pudica</i>	09
Figura 8 – Modelo do relógio circadiano em <i>Drosophila melanogaster</i>	11
Figura 9 – Representação da regulação molecular da 1ª alça de retroalimentação do relógio circadiano.....	14
Figura 10 – Embriões de <i>Ae. aegypti</i> de 5 HAOs após protocolo de remoção do córion dos ovos.....	21
Figura 11 – Embriões de <i>Ae. aegypti</i> de 24 HAOs após protocolo de remoção da casca dos ovos.....	22
Figura 12 – Embriões de <i>Ae. aegypti</i> de 12 HAOs após protocolo de remoção da casca dos ovos.....	23
Figura 13 – Hibridização <i>in situ</i> para <i>period</i> em embriões de <i>Ae. aegypti</i> de 5 HAOs.....	24
Figura 14 – Hibridização <i>in situ</i> para <i>period</i> em embriões de <i>Ae. aegypti</i> de 24 HAOs.....	25
Figura 15 – Hibridização <i>in situ</i> para <i>period</i> em embriões de <i>Ae. aegypti</i> de 12 HAOs.....	26
Figura 16 – Hibridização <i>in situ</i> para <i>period</i> em embriões de <i>Ae. aegypti</i> de 12 HAOs.....	26

RESUMO

Todo organismo presente na Terra está sujeito a alterações de luz e temperatura, devido aos movimentos de rotação do planeta, e exibe comportamentos diurnos ou noturnos em resposta a estas variações cíclicas. Dessa forma, os “ritmos circadianos” são regulados por um relógio endógeno que influencia processos como atividade locomotora e oviposição nos insetos, cujos principais genes já foram descritos em *Drosophila melanogaster*. Neste organismo, os diferentes ritmos circadianos são regulados em nível molecular pela interação dos chamados genes de relógio, como *period* (*per*), *timeless* (*tim*), *cycle* (*cyc*) e *Clock* (*Clk*). Já foi observado nesse modelo que os genes de relógio são expressos desde a embriogênese até a fase adulta, envolvidos em mecanismos como desenvolvimento e comportamento. Em *Aedes aegypti*, ainda não se tem conhecimento acerca da expressão dos genes de relógio durante eventos como a embriogênese. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar o padrão de expressão de *period*, um dos genes centrais do relógio em *Ae. aegypti*, nos diferentes momentos de 5, 12 e 24h do desenvolvimento embrionário. Os ovos de *Ae. aegypti* da linhagem Rockefeller foram mantidos em condições padrão de laboratório, com ciclos de LD 12:12h (12h de claro e 12h de escuro, *light/dark*) a 25 °C, com ração para larvas e alimentação *ad libitum* de sacarose 10% para adultos. Fêmeas com cerca de cinco dias de vida e inseminadas foram alimentadas com cobaio anestesiado e três dias depois submetidas à postura sincronizada a 28° C no escuro por 1 hora, para obtenção dos ovos de mesma idade. Após isto, foi realizado o protocolo de remoção dos envoltórios e fixação dos embriões de *Ae. aegypti* nos tempos de 5, 12 e 24 HAOs de desenvolvimento, para posteriores ensaios de hibridização *in situ*. Através dos resultados obtidos, pode-se observar uma boa remoção dos envoltórios dos ovos de 5 e 24 HAOs pelo protocolo, devido a ajustes como a otimização do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (NaClO). Porém, em embriões de 12 HAOs, mesmo com diferentes tentativas dos protocolos de remoção dos envoltórios, variadas concentrações e tempos de exposição ao NaClO, não foi possível a retirada dos envoltórios de forma satisfatória, e conseqüentemente não se obteve sucesso na hibridização *in situ* para *period*. Já para a hibridização *in situ* das demais idades, não observamos marcação para *period*, o que corrobora os resultados preliminares de RT-qPCR do nosso grupo. Desta forma, foi possível estabelecer um protocolo de remoção dos envoltórios dos embriões de *Aedes aegypti*, porém futuros estudos são necessários para aperfeiçoar esta técnica, a fim de elucidar o perfil de expressão de *period*, por hibridização *in situ*, ao longo da embriogênese, bem como dos demais genes de relógio em *Ae. aegypti*.

Palavras-chave: Genes de relógio; *Aedes aegypti*; *period*; embriogênese.

ABSTRACT

Every organism present on Earth is subject to changes in light and temperature, due to the rotational movements of the planet, and exhibit daytime or nighttime behavior in response to these cyclical variations. Thus, the "circadian rhythms" are regulated by an endogenous clock that influences processes such as locomotor activity and oviposition in the insects, whose main genes have already been described in *Drosophila melanogaster*. In this organism, the different circadian rhythms are regulated at the molecular level by the interaction of the clock genes like *period* (*per*), *timeless* (*tim*), *cycle* (*cyc*) and *Clock* (*Clk*). It has already been observed in this model that the clock genes are expressed from embryogenesis to adulthood, involved in mechanisms such as development and behavior. In *Aedes aegypti*, however, it is not known yet about the expression of the clock genes during events such as embryogenesis. Therefore, the objective of this study was to analyze the expression pattern of *period*, one of the central genes of the clock in *Ae. aegypti*, at different times of 5, 12 and 24h of embryonic development. The eggs of *Ae. aegypti* from the Rockefeller lineage were maintained under standard laboratory conditions, with cycles of LD 12: 12h (12h light and 12h dark, *light / dark*) at 25 °C, with ration for larvae and *ad libitum* feed of 10% sucrose for adults. Females about five days old and inseminated were fed an anesthetized guinea pig and three days later submitted to synchronized posture 28 °C in the dark for 1 hour to obtain the eggs. After this, the protocol of removal of the wraps and fixation of the embryos of *Ae. aegypti* at the times of 5, 12 and 24 development HAEs for further *in situ* hybridization assays. By the results obtained, a good removal of the egg shells of 5 and 24 HAEs by the protocol can be observed, due to adjustments such as the optimization of the exposure time to sodium hypochlorite (NaClO). However, in embryos of 12 HAEs, even with different attempts of the wrapping removal protocols, varied concentrations and exposure times to NaClO, it was not possible to remove the wrappings satisfactorily, and consequently no success was achieved in *in situ* hybridization for *period*. As for the *in situ* hybridization of the other ages, we did not observe labeling for *period*, which corroborates the preliminary results of our group's RT-qPCR. Thus, it was possible to establish a protocol for the removal of the envelope of the *Aedes aegypti* embryos, but future studies are necessary to improve this technique, in order to elucidate the *period's* expression profile, by *in situ* hybridization, along the embryogenesis, as well as as of the other clock genes in *Ae. aegypti*.

Keywords: Clock genes; *Aedes aegypti*; *period*; embryogenesis.

1- INTRODUÇÃO

1.1 Classe Insecta

Os indivíduos pertencentes à Classe Insecta apresentam grande abundância através da colonização bem-sucedida dos ambientes e fácil adaptação em diferentes *habitats*. Este sucesso é decorrente da evolução de características adaptativas como o surgimento de asas (Grimaldi & Engel, 2005), que permitiram explorar novos ambientes, com o benefício da fuga de eventuais predadores e a busca facilitada por fontes alimentares (Ruppert *et al.*, 2005).

Com a dispersão ao redor do planeta, passaram a ocupar diferentes nichos ecológicos e ecossistemas, além de adquirirem importâncias diversas como econômicas, ecológicas e em saúde pública (médico-sanitária). A ocorrência de impactos positivos de viés econômico pode ser exemplificada pelos agentes polinizadores e produtores de mel (*Apis mellifera*) e pelo controle biológico de pragas (Silva & Brito, 2015; Rocha, 2012). Além destes, agentes polinizadores de plantações de cacau e abacate (Ceratopogonidae – *Dasyhelea*, *Forcipomyia* e *Atrichopogon* respectivamente) (Soria & Bystrak, 1975; Wirth & Waugh, 1976; De Meillon & Wirth, 1979) também se configuram como exemplos de impactos ecológicos positivos dos insetos.

Existem também insetos com relevância econômica de impacto negativo, que podem causar prejuízos financeiros em plantações de algodão (*Dysdercus peruvianus*) (Miranda *et al.*, 2015), além das pragas de estocagem de grãos alimentícios, como a farinha (*Tribolium castaneum*) (Leite & Nascimento, 2008).

Já a importância médico-sanitária se estabelece pela transmissão de agentes patogênicos por seus respectivos vetores. Estes agentes podem causar doenças como febre amarela urbana (*Aedes aegypti*) e malária (*Anopheles gambiae*), onde os vetores possuem como característica comum o hábito hematofágico (Consoli & Oliveira, 1994).

1.1.1 O mosquito *Aedes aegypti*

Insetos hematofagos pertencentes à Ordem Diptera e Família Culicidae, com exceção de alguns gêneros, são transmissores de agentes patogênicos, como a Subfamília Culicinae. Esta engloba gêneros como *Aedes*, do qual podemos citar a espécie *Aedes aegypti*, que é adaptada ao meio urbano e configura-se como importante transmissor de patógenos, já que é considerada vetor de arbovírus como DENV, ZIKV e CHIKV (Jupp *et al.*, 1981; Nelson, 1986; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Maciel-de-Freitas *et al.*, 2012; Dupont-Rouzeryol *et al.*, 2012).

Este mosquito possui metamorfose completa, com ciclo de vida composto pelos estágios de ovo, quatro instares larvais, pupa e adulto (figura 1). Em condições naturais, tanto fêmeas como machos de *Ae. aegypti* alimentam-se de substâncias açucaradas, como o néctar

das plantas. Além disso, as fêmeas também apresentam alimentação sanguínea, mecanismo crucial para a maturação dos ovos (Christophers, 1960).

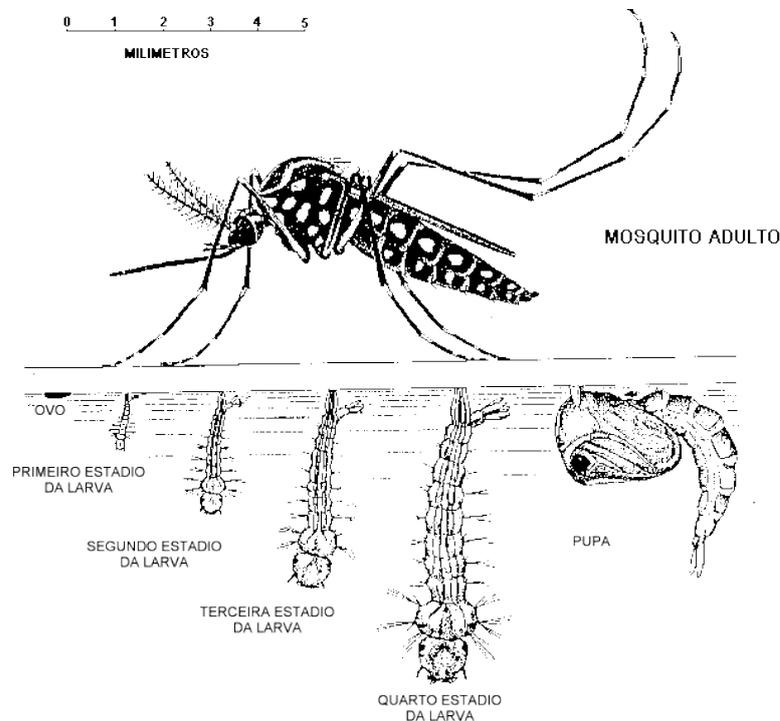


Figura 1: Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Fonte: https://dengue.cecom.unicamp.br/?page_id=215, acesso em: 02.01.2019.

Uma parte do ciclo de vida pouco estudada é a fase da embriogênese, constituída pelos ovos, que representa o desenvolvimento primordial do indivíduo, sendo este estágio o foco deste trabalho.

1.2 Embriogênese em artrópodes

Ao longo do processo de ovogênese, existem fatores como, por exemplo, a forma dos ovos de artrópodes, que pode apresentar formato esférico como ovos do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, além de exibir um formato alongado observado em ovos do barbeiro *Rhodnius prolixus*, um dos vetores da Doença de Chagas. Estes formatos são definidos durante o processo de ovogênese e estão relacionados com os tipos de provimento de fonte energética pelos ovários aos ovócitos e o tamanho dos ovos com a duração da embriogênese. Os ovários de insetos classificados de acordo com a presença de células nutridoras. Ovários panoísticos são aqueles que não possuem células nutridoras, presente em grupos filogenéticos de características mais basais. Já o tipo meroístico apresenta células nutridoras associadas a cada ovócito e estão presentes em ordens mais derivadas, como alguns exemplos de Diptera, da qual podemos citar o mosquito *Aedes aegypti* (Fonseca *et al.*, 2012) (figura 2).

Durante a embriogênese são formados os eixos ântero-posterior (AP) e dorso-ventral (DV), que serão fundamentais para orientação e futuras segmentação e organogênese. Estas definições são promovidas por grupos de genes, como os genes maternos, que configuram o eixo para o desenvolvimento embrionário e ativam os genes *gap*, que atuam na delimitação espacial, segmentação e polarização. Estes, por sua vez, ativam genes *pair-rule*, que estabelecem limites entre os segmentos e regulam os genes *segment polarity*, que mantêm a delimitação dos segmentos em compartimentos, separadamente (Davis & Patel, 2002; Liu & Kaufman, 2005).

O evento de embriogênese em insetos varia de acordo com o padrão de segmentação do plano corporal a partir da banda germinal, região em desenvolvimento que originará o embrião. Assim, são estabelecidas categorias para os embriões, como a classificação pela banda germinal, que ocorre conforme o espaço ocupado pelo embrião no interior do ovo, na região ventral, estando ainda relacionado com o ambiente (celular ou acelular) no qual o embrião irá definir sua organização corporal. Desta forma, os embriões são classificados como bandas germinais curta ou intermediária, e longa, que variam conforme os números de segmentos dentro da zona de formação, bem como conforme o tamanho relativo durante o desenvolvimento (Davis & Patel, 2002).

Os embriões denominados através da banda germinal longa compreendem insetos holometábolos, como o mosquito *Ae. aegypti* e a mosca *Drosophila melanogaster*. Dentre os insetos que apresentam banda germinal curta ou intermediária, destacam-se *Rhodnius prolixus* e *Tribolium castaneum* (Davis & Patel, 2002; Fonseca *et al.*, 2012; Kimelman & Martin, 2012) (figura 2).

Em embriões de banda curta ou média (intermediária), que possuem o tipo de ovário panoístico, a banda germinal ocupa uma porção ventro-posterior do ovo, com primeiras divisões em ambiente celular. Neste, os segmentos são formados em etapas, sendo inicialmente os segmentos da cabeça formados na fase do blastoderma celular, e posteriormente, os segmentos do tórax e abdômen se formam sucessivamente, a partir da zona de crescimento posterior, por reorganização celular (Davis & Patel, 2002; Fonseca *et al.*, 2012; Kimelman & Martin, 2012).

Os segmentos de embriões com esta classificação demandam um período de crescimento secundário, interligado a uma especificação dos segmentos posteriores (Davis & Patel, 2002; Fonseca *et al.*, 2012; Kimelman & Martin, 2012). A espécie *Oncopeltus fasciatus*, da ordem Hemiptera, apresenta embriões de banda germinal intermediária (Liu & Kaufman, 2005). Já a *Schistocerca gregaria* e a *Gryllus gryllus* apresentam banda germinal muito curta (Fonseca *et al.*, 2012) (figura 2).

Os embriões de banda longa, que possuem tipo de ovário meroístico, ocupam toda a região ventral do ovo. Os segmentos das porções corporais anterior e posterior são estabelecidos de forma simultânea, com as primeiras divisões realizadas em ambiente acelular. São classificados pelo contexto de utilização de células nutridoras durante o processo da ovogênese, apresentando um mecanismo de desenvolvimento filogenético altamente derivado. Estes organismos apresentam embriogênese mais rápida que os insetos banda curta (Davis & Patel, 2002; Fonseca *et al.*, 2012; Kimelman & Martin, 2012; Farnesi, 2014) (figura 2).

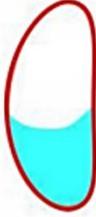
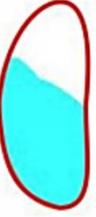
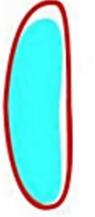
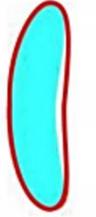
Tipos de ovários em fêmeas						
	Panoístico	Meroístico				
		Telotrófico		Poli-trófico		
Banda germinal						
Embriogênese (dias)	20	10	4	3	1	
Classificação da banda germinal	Banda curta	Banda curta ou intermediária		Banda longa		

Figura 2: Quadro comparativo entre classificação dos tipos de ovários em fêmeas e banda germinal com exemplo de diferentes ordens de artrópodes. Em ovários do tipo meroístico telotrófico, as células nutridoras permanecem no germário, enquanto que em ovários do tipo meroístico poli-trófico, as células nutridoras são compartimentalizadas em cada cisto germinal, acompanhando todo o processo de desenvolvimento e amadurecimento até a liberação do ovócito e consequente apoptose das células nutridoras e foliculares (maternas). Fonte: Adaptado de Fonseca *et al.* (2012).

1.2.1 Embriogênese no *Aedes aegypti*

O *Ae. aegypti* possui padrão de formação do embrião semelhante ao que ocorre em *D. melanogaster* (Bate & Arias, 1993) e *Anopheles albitarsis* (Monnerat *et al.*, 2002). Estudos pioneiros mostraram aspectos embrionários de *Ae. aegypti*, como o desenvolvimento inicial do mosquito (Raminani & Cupp, 1975) e a embriologia avançada, pela organogênese (Raminani & Cupp, 1978). Posteriormente, foi comprovada a relação entre a temperatura e desenvolvimento embrionário, evidenciando que em *Ae. aegypti* a 25 °C a embriogênese ocorre em 77,4 HAOs [Hora(s) Após Qviposição – em inglês HAE(s) – Hour(s) After Eggposition], já a 28 °C ocorre mais rapidamente em 61,6 HAOs (Farnesi *et al.*, 2009).

Em Vital *et al.* (2010), estudo aqui utilizado como base para identificação dos estágios embrionários, com embriogênese realizada a 28 °C (figura 3), foi observada em 0 HAO, logo após a postura, ovo destacado do endocóxon (figura 3 A). Posteriormente, a fase do

blastoderma sincicial, em que células polares, precursoras da linha germinativa, encontram-se fora do blastoderma (figura 3 B). Em 3 HAOs e 5 HAOs ocorre a formação do blastoderma celular, com a região pósterio-ventral se destacando do endocócion e dos limites celulares (figura 3 C). Também foram sinalizados em 10 HAOs o evento da extensão da banda germinal (figura 3 D), em 15 HAOs observa-se o início da retração da banda germinal e lobo cefálico evidente (figura 3 E) e em 24 HAOs, a retração da banda germinal com a região cefálica segmentada (figura 3 F), até atingir o completo desenvolvimento, por volta de 62 HAOs (figura 3 I), com nítida segmentação do embrião, evidenciando o aparecimento da cabeça, segmentos torácicos e abdominais e sifão respiratório (Vital *et al.*, 2010).

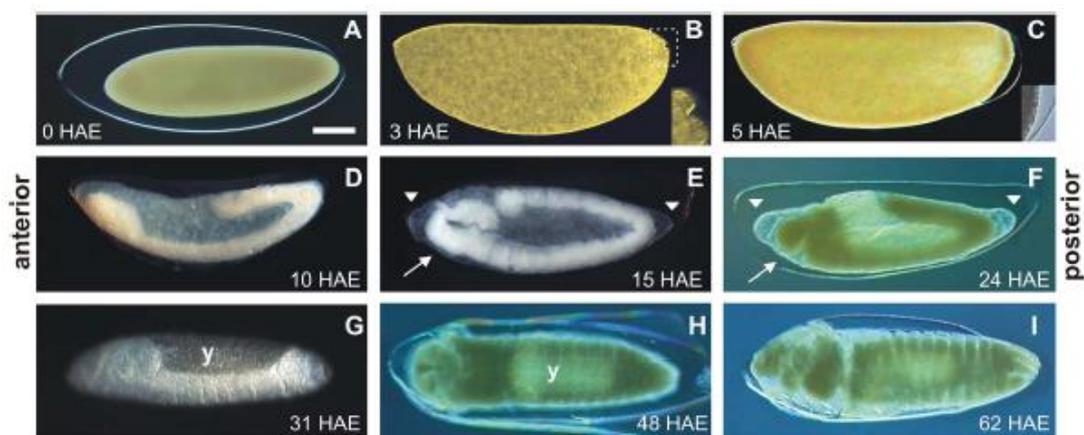


Figura 3: Estágios de desenvolvimento do embrião de *Ae. aegypti* a 28°C. **(A)** Embrião em 0 HAO após postura dos ovos, destacado do endocócion. **(B)** Embrião de 3 HAOs no estágio de formação do blastoderma sincicial, com ampliação evidenciando células polares destacadas do blastoderma. **(C)** 5 HAOs, na fase de blastoderma celular, em que a ampliação demonstra a região pósterio-ventral se destacando do endocócion e dos limites celulares. **(D)** Em 10 HAOs, o embrião encontra-se na fase de extensão da banda germinal. **(E)** Em 15 HAOs, o embrião encontra-se no início da retração da banda germinal. **(F)** Em 24 HAOs, o embrião está na fase de retração da banda germinal. **(G)** Em 31 HAOs, o embrião encontra-se na fase de fechamento dorsal, em que y representa a região do vitelo. **(H)** Em 48 HAOs, o embrião encontra-se no estágio de organogênese avançado, com segmentação da larva parcialmente evidente. **(I)** Em 62 HAOs, o embrião encontra-se na fase final da embriogênese, evidenciando o aparecimento da cabeça, os segmentos torácicos e abdominais e o sifão respiratório. A cabeça da seta em **(E)** e **(F)** demonstra os limites da cutícula serosa, destacada do endocócion, com a margem translúcida envolvendo o embrião, e a seta em **(E)** e **(F)** representa a região de segmentação cefálica do embrião. Escala utilizada: 100 µm. Fonte: Vital *et al.* (2010).

1.2.1.1 Características das cascas dos ovos de *Ae. aegypti* e etapas necessárias para estudo

Os ovos de *Ae. aegypti* formam uma rígida e densa camada protéica denominada cócion (Snodgrass, 1935; Wigglesworth, 1950), dividida em duas subcamadas: o endocócion, a mais interna, de caráter rígido e homogêneo, e o exocócion, mais externa e frouxa (Christophers, 1960; Clements, 1992; Valle *et al.*, 1999).

Neste vetor, os ovos recém-postos apresentam coloração branca, com característica permeável, e, após cerca de 1 hora e 30 min, apresentam coloração enegrecida (Li & Li, 2006). Os processos de enrijecimento e escurecimento são determinados pelos mecanismos de esclerotização e melanização do endocócion, respectivamente, e ocorrem simultaneamente,

uma vez que as vias bioquímicas apresentam similaridades, compartilhando componentes críticos e essenciais para ambos os processos (Li, 1994).

Durante a melanização, ocorrem ligações cruzadas entre proteínas estruturais do endocóron, essenciais para a esclerotização e a pigmentação cuticular (Hopkins & Kramer, 1992; Andersen, 2012). São ativadas enzimas como fenoxidase e dopadescarboxilase em catálises de melanização, como também a enzima peroxidase que contribui para a esclerotização do endocóron no *Ae. aegypti* (Li & Christensen, 1993; Li *et al.*, 1996).

Além do endocóron e do exocóron, durante a etapa de máxima extensão da banda germinal, ainda na embriogênese precoce, células da serosa secretam uma matriz extracelular denominada cutícula serosa, a qual fica situada logo abaixo do endocóron, está relacionada ao momento de aquisição da resistência à dessecação e confere impermeabilidade ao embrião (Clements, 1992; Rezende *et al.*, 2008; Farnesi *et al.*, 2009) (figura 4). Estudos em ovos de culicídeos demonstram que, além da cutícula serosa, a melanização da casca dos ovos também está associada diretamente ao processo de resistência à dessecação (Farnesi *et al.*, 2017).

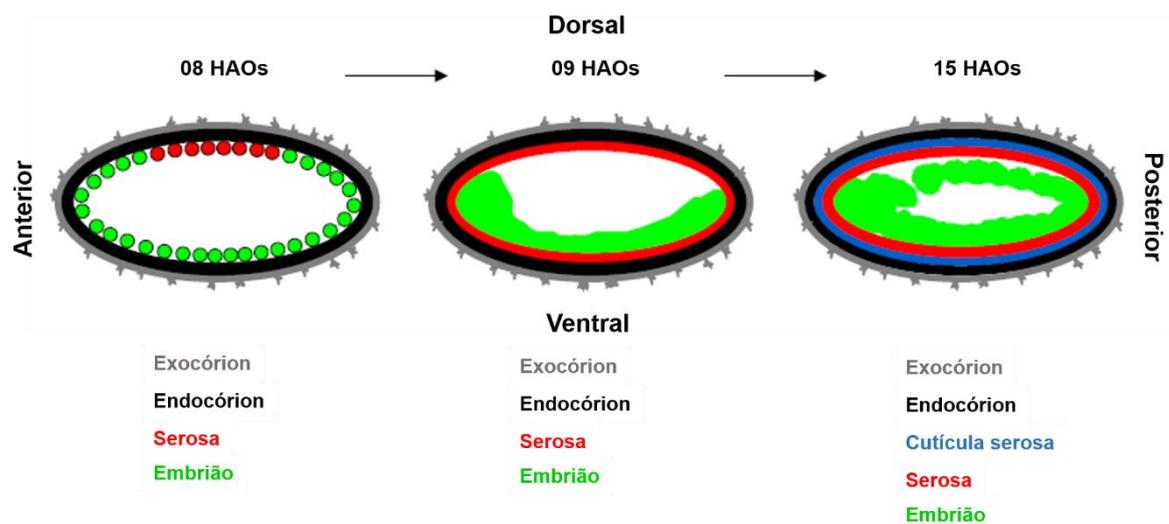


Figura 4: Esquema simplificado da formação e movimentação das membranas extraembrionárias e da cutícula serosa no *Ae. aegypti*, com embriogênese a 28 °C. Fonte: Rezende *et al.* (2008).

A partir deste momento, será designado o termo córion para embriões de 5 HAOs, que compreende as camadas do exocóron e endocóron. Já embriões a partir de 12 HAOs, que já apresentam a cutícula serosa, será utilizado o termo casca dos ovos, composta por exocóron, endocóron e cutícula serosa.

Assim, os processos de estudos durante a embriogênese tornam-se mais laboriosos, pois se faz necessária a retirada destes envoltórios para a manipulação do embrião, pois as suas características físicas representam um entrave para os estudos de desenvolvimento embrionário (Rezende *et al.*, 2008).

Estudos em culicídeos como *Aedes sticticus* e *Aedes vexans* evidenciaram a técnica para clarificação de endocórior de mosquitos, permitindo a visualização dos estágios de desenvolvimento, pelo uso de soluções suplementadas com substâncias clarificantes como o clorito de sódio (NaClO_2) (Trpis, 1970; Christophers, 1960), também estudados em outras espécies posteriormente, como o *Ae. aegypti* (Rezende *et al.*, 2008; Farnesi *et al.*, 2009; Vital *et al.* 2010) (figura 5) e o *An. albitalarsis* (Monnerat *et al.*, 2002), alavancando o estudo da biologia do desenvolvimento destes insetos.

O uso de soluções contendo hipoclorito de sódio (NaClO) pode, em diferentes concentrações como 30 e 50% (3,6% e 6% de cloro ativo, respectivamente) e diferentes tempos de exposição, promover a digestão do córion dos ovos, como do mosquito *Ae. aegypti* nos referidos estudos, sem danificar a cutícula serosa. Esta é resistente à digestão por NaClO , dependendo das variáveis de concentração e tempo utilizados (Rezende *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2014; Farnesi *et al.*, 2015).

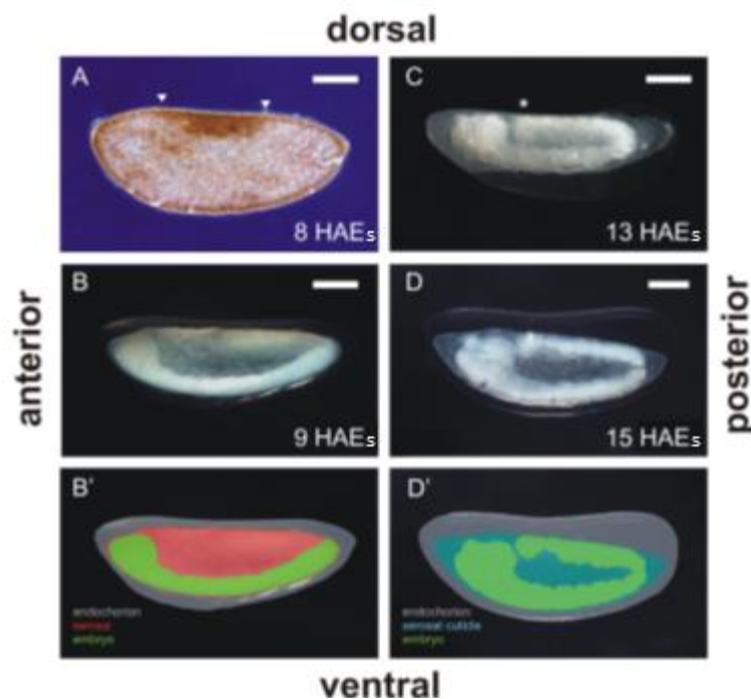


Figura 5: Estágios da embriogênese associados à formação da cutícula serosa do *Ae. aegypti*, com desenvolvimento a 28 °C. Clarificação pelo método de Trpis. **(A)** Embrião de 8 HAOs, evidenciando a formação da serosa primordial representado pelas cabeças de seta. **(B)** Embrião de 9 HAOs na fase de extensão da banda germinal, demonstrando formação completa da serosa. **(C)** Embrião de 13 HAOs após completa extensão da banda germinal e **(D)** embrião de 15 HAOs no início da retração da banda germinal. **(B')** e **(D')** evidenciam as delimitações das camadas, representada pelas diferentes cores ao redor do embrião. Fonte: Rezende *et al.* (2008).

Procedimentos semelhantes foram empregados em *Melanoplus differentialis* (Slifer, 1945) e *An. gambiae* (Goltsev *et al.*, 2009), sob diferentes concentrações e tempos de exposição. Adicionalmente, sabe-se que soluções fixadoras contendo formaldeído tamponado com fosfato, como o Millonig (Carson *et al.*, 1973), auxiliam na preservação de detalhes das ultraestruturas do desenvolvimento.

No entanto, a escassez de estudos moleculares por hibridização *in situ* na embriogênese dos mosquitos apresenta, portanto, relação intrínseca com a impermeabilidade e a rigidez da casca do ovo, o que dificulta a fixação do tecido (Monnerat *et al.*, 1999) e a internalização de sondas, dificultando a realização de técnicas de hibridização *in situ* e imunohistoquímica (Rezende *et al.*, 2008; Clemons *et al.*, 2010).

Estudos envolvendo a embriogênese vêm sendo desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do laboratório. Concentrando maiores esforços, nosso grupo estuda a influência de determinados genes em ritmos biológicos, como a atividade locomotora em adultos de *Aedes aegypti*, além de, mais recentemente, estudos que visam a caracterização da expressão desses mesmos genes durante o desenvolvimento embrionário.

1.3 Ritmos Biológicos e Relógio Circadiano

Desde o surgimento da vida na Terra, a maioria dos organismos está submetida a ciclos diários de luz e temperatura, devido aos movimentos de rotação da Terra. Devido a diferentes pressões seletivas, os organismos desenvolveram adaptações frente às variações cíclicas e evoluíram de forma a apresentar oscilações rítmicas diárias nos padrões de fisiologia e comportamento a fim de estruturar suas atividades. Estas oscilações apresentam duração aproximada de 24 horas e foram denominados por Franz Halberg, em 1959, de “ritmos circadianos” (do latim *circa* = cerca e *diem* = dia) (Moore-Ede *et al.*, 1982; Marques & Menna-Barreto, 1999; Rivas, 2012).

Diversas evidências se sucederam ao longo de muitos anos, como as observações empíricas do movimento das folhas de *Tamarindus indica* (tamarindo) feitas por Thasos, historiador acompanhante de Alexandre, o Grande (325 a.C.). Além dele, houve também as explorações de Carolus Linnaeus, que estudou o processo de abertura e fechamento das pétalas das flores, em 1751, originando o “relógio das flores” (figura 6), que ele utilizou como proposta para demonstrar as diferentes horas do dia (Marques & Menna-Barreto, 1999; Foster & Kreitzman, 2005).

Além deles, podemos citar Jean-Jacques d’Ortous de Mairan, em 1729, que realizou os primeiros experimentos de controle endógeno dos ritmos biológicos, com a espécie *Mimosa pudica*, a “dormideira”, para estudar o sistema de abertura de suas folhas durante o dia e seu fechamento à noite. Em condições controladas de escuro constante, foi observado que, mesmo sem incidência luminosa, representada pela caixa de isolamento, persistia o ato de abrir e fechar das folhas de forma similar (figura 7) (Moore-Ede *et al.*, 1982; Marques & Menna-Barreto, 1999; Foster & Kreitzman, 2005).

Eine Blumen-Uhr



Figura 6: Relógio das flores, idealizado por Carolus Linnaeus, em 1751. Fonte: Moore-Ede *et al.* (1982).



Figura 7: Representação dos experimentos sobre o ritmo de abertura e fechamento foliares da *Mimosa pudica* (“dormideira”), por Jean-Jacques d’Ortous de Mairan, em 1729. Fonte: Amoretty *et al.* (2013) adaptado de Moore-Ede *et al.* (1982).

Outro estudioso que utilizou a *Mimosa pudica* como modelo, Augustin de Candolle, em 1832, fez observações acerca da ritmicidade de 22 a 23 horas entre a repetição no movimento das folhas, sob a ausência de fontes luminosas. Ele observou que quando livres de indicações ambientais de passagem do tempo, os ritmos têm um período próximo, mas não de exatamente 24 horas. Desta forma, esta característica foi posteriormente intitulada de “período em livre curso” (do inglês, *free running period*) (Marques & Menna-Barreto, 1999; Johnson *et al.*, 2003).

Estudos prévios com camundongos, *Neurospora* e *Drosophila* comprovaram que os ritmos biológicos tinham origem endógena (Hamner *et al.*, 1962), fazendo com que, até o

término da década de 1980, o fator de controle exógeno destes ritmos fosse refutado (Marques & Menna-Barreto, 1999). Posteriormente, experimentos de Colin Pittendrigh mostraram-se importantes ao elucidar a propriedade de “arrastamento” de passagem do tempo do relógio circadiano por fatores ambientais, denominados *Zeitgebers* (Moore-Ede *et al.*, 1982; Pittendrigh, 1993; Marques & Menna-Barreto, 1999; Foster & Kreitzman, 2005).

Um modelo de estudo de ritmo circadiano que tem seus processos muito bem elucidados é a *Drosophila melanogaster*. Esta mosca possui um relógio circadiano composto molecularmente de diversos genes que formam alças autorregulatórias de retroalimentação negativa (Hardin, 2011), em que a luz e a temperatura atuam como indicadores ambientais importantes para o seu funcionamento (Saunders, 2002; Boothroyd & Young, 2008). Estudos iniciais em linhagens mutantes de *D. melanogaster* indicaram alterações comportamentais, relacionadas a mutações em um mesmo *locus*, denominado *period (per)* (Konopka & Benzer, 1971; Stanewsky, 2002), e alavancaram descobertas de outros genes envolvidos nos ritmos biológicos do inseto, como o gene *timeless (tim)* (Sehgal *et al.*, 1994).

1.3.1 Outros tipos de ritmos biológicos

A cronobiologia é a ciência que analisa a organização temporal dos indivíduos, por meio do estudo dos ritmos e fenômenos físicos e bioquímicos periódicos que ocorrem nos seres vivos, ou seja, é responsável por estudar fenômenos que possuam determinada frequência. Estes, intitulados de ritmos biológicos, expressam a ocorrência de um fenômeno biológico de forma cíclica, que varia periodicamente no tempo (Araújo & Marques, 2002).

Embora os ritmos circadianos, que apresentam uma duração estimada de 24 horas, sejam os mais abordados pela representação da maioria das funções biológicas, existem outros tipos de ritmos biológicos. Franz Halberg propôs, em 1959, alguns tipos de ritmos como os ritmos ultradianos, que possuem periodicidade menor que 24 horas, repetindo-se várias vezes ao dia, como o batimento cardíaco, a frequência respiratória e as secreções hormonais. Há também os ritmos infradianos que possuem duração maior do que 24 horas, dos quais podemos citar o ciclo menstrual, a hibernação e os processos de desenvolvimento como a somitogênese em vertebrados (Halberg, 1969; Capel *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2003 *apud* Moura & Silva, 2010; Hood & Amir, 2018).

Nos ritmos infradianos, em particular, que compreendem períodos maiores que 24 horas, são consideradas diversas variáveis ambientais que são suas reguladoras (Hood & Amir, 2018). Assim, eventos infradianos como a embriogênese, que apresentam ritmo devido à progressão do desenvolvimento do embrião, são compostos de etapas e fenômenos únicos que levam à formação do futuro indivíduo.

Neste trabalho, o foco será um dos genes que compõe a primeira alça de retroalimentação negativa (figura 9), o gene *period* (*per*). A primeira alça de retroalimentação negativa é constituída pelos genes *period*, *timeless*, *Clock* e *cycle*, que codificam as proteínas PERIOD (PER) e TIMELESS (TIM), CLOCK (CLK) e CYCLE (CYC), respectivamente. Através da ação do heterodímero CLK-CYC, que se liga à região E-box (CACGTG) dos promotores dos genes *per* e *tim*, ocorre a transcrição dos destes genes, no meio do dia, e alcançam níveis máximos de expressão no início da noite (Hao *et al.*, 1997; Allada *et al.*, 1998; Darlington *et al.*, 1998; Rutila *et al.*, 1998; Bruno, Lima-Camara & Peixoto, 2012).

Quando se encontram no citoplasma, ainda em forma livre, PER e TIM podem sofrer modificações pós-traducionais, tais como a ação da quinase DOUBLETIME (DBT), que fosforila PER (Edery *et al.*, 1994; Kloss *et al.*, 1998; Price *et al.*, 1998; Kloss *et al.*, 2001) e a encaminha para a degradação pela via ubiquitina-proteassoma.

Posteriormente, quando alcançam níveis mais altos no citoplasma, PER e TIM se associam formando um heterodímero, que estabiliza e protege PER da degradação (Price *et al.*, 1995; Stanewsky, 2002; Stanewsky, 2003; Taghert & Lin, 2005; Yu *et al.*, 2006). Deste modo, é formado o trímero DBT-PER-TIM (Kloss *et al.*, 2001), que promove a fosforilação de CLK, desassociando o heterodímero CLK/CYC da região promotora dos genes e, conseqüentemente, reprimindo a sua transcrição (*per* e *tim*) (Bae *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2006; Hardin, 2011).

Ao amanhecer, a partir desta interrupção, ocorre o declínio de seus produtos PER e TIM, que sofrem degradação, através da fosforilação de PER por DBT (Edery *et al.*, 1994; Kloss *et al.*, 1998; Price *et al.*, 1998; Naidoo *et al.*, 1999; Kloss *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2007; Hardin, 2011). Temos ainda a ação da proteína CRYPTOCHROME (CRY), uma fotoliase, ativada pela presença de fonte luminosa, que promove o “acerto” do relógio. Na presença de luz, ocorre uma mudança conformacional em CRY, que permite que ela consiga se ligar a TIM, recrutando outras proteínas como a JETLAG e marcando-a para a degradação via proteassoma (Stanewsky *et al.*, 1998; Peschel *et al.*, 2009; Bruno, Lima-Camara & Peixoto, 2012).

Isto acarreta a desassociação de CLK, que, hipofosforilada, se acumula e posteriormente forma novamente o heterodímero CLK/CYC, que se liga à região E-box e inicia um novo ciclo, com a transcrição de *per* e *tim* (Hardin, 2011).

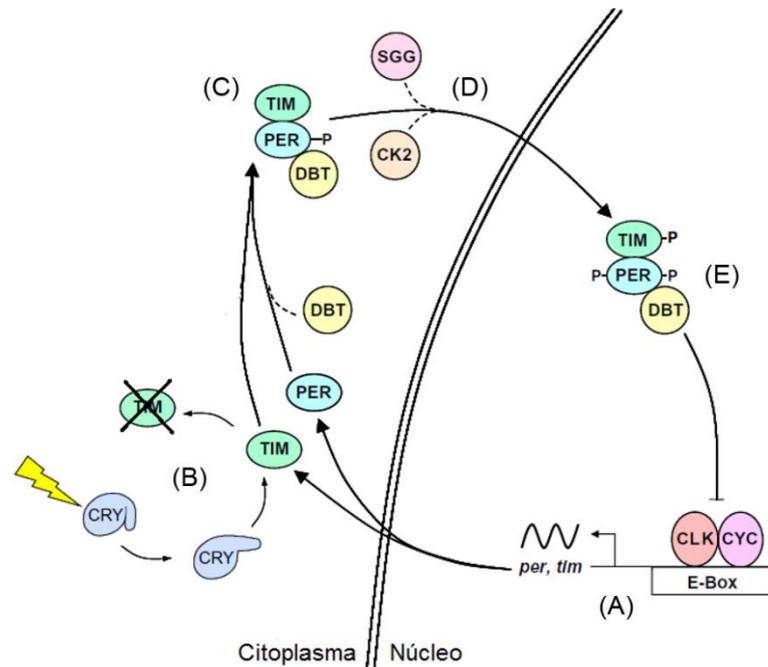


Figura 9: Representação da regulação molecular da 1ª alça de retroalimentação do relógio circadiano na *D. melanogaster*. **(A)** As proteínas CLK e CYC se ligam na região E-box do promotor e ativam a transcrição de vários genes como *period*, *timeless*, *clock* e *cycle*. **(B)** *period* (*per*) e *timeless* (*tim*), ao serem translocados para o citoplasma, são traduzidos nas proteínas PER e TIM, que sofrem ação de quinases que os encaminham para a degradação. **(C)** Para evitar este processo, PER e TIM formam o heterodímero (PER-TIM), acumulando-se no citoplasma, **(D)** e, ao ingressar no núcleo após serem fosforiladas, **(E)** inibem a atividade do heterodímero CLK-CYC, inibindo, assim, a transcrição dos seus próprios genes. A linha dupla representa a delimitação entre o núcleo e o citoplasma. A linha senoidal representa a transcrição de mRNA dos genes envolvidos nesta alça, como *period* e *timeless*. As linhas tracejadas indicam a ação de quinases, que fosforilam as proteínas, as quais ficam acopladas ao grupamento fosfato, representado pela letra (-P). Fonte: Teles-de-Freitas (2015) com adições, adaptado de Hardin (2011).

1.3.3 Relógio Circadiano e Insetos Vetores

Com relação a outros insetos, como o mosquito *Ae. aegypti*, não se tem conhecimento suficiente sobre os mecanismos moleculares que regulam o seu relógio circadiano. Porém, sabe-se que há estudos que mostram a influência do relógio circadiano em processos como a atividade locomotora e a hematofagia (Bruno, Lima-Camara & Peixoto, 2012).

Há estudos, por exemplo, que evidenciam a diferença da expressão do gene de relógio *cry2* em *Ae. aegypti* e em *Culex quinquefasciatus*, envolvendo a repressão por PER e/ou CRY2. Foi visto que o *Ae. aegypti* ainda apresenta padrão bimodal de expressão e supõe-se que seja modulado pelas proteínas PDP1 e VRI, responsável pela expressão cíclica de *cycle* (Gentile *et al.*, 2009). Estudos posteriores descreveram a expressão de *cycle* e *period* em cérebros de mosquitos adultos de *Ae. aegypti* sob condições de luminosidade cíclica, demonstrando que *period* é expresso em fase oposta à de *cycle* (Gentile *et al.*, 2009; Chahad-Ehlers *et al.*, 2013).

2- JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Com relação ao mosquito *Ae. aegypti*, os estudos mostram que a influência do relógio circadiano normalmente está associada aos adultos, em processos como atividade locomotora e hematofagia. No entanto, ainda não temos conhecimento sobre como os genes do relógio são expressos em outros ritmos biológicos como a embriogênese, assim como sua função durante o desenvolvimento embrionário, já que não se trata de um evento circadiano.

Devido ao fato da embriogênese ainda ser uma parte do ciclo de vida que não é amplamente elucidada na bibliografia especializada e constituir-se em uma das fases mais importantes para os métodos de controle populacional, uma vez que não apresenta capacidade de dispersão ativa (Beament, 1989; Monnerat *et al.*, 2002; Wolpert & Tickle, 2011), estudos nesta área mostram-se necessários.

Dados não publicados do nosso grupo (anexo A) demonstram a expressão de genes do relógio, como *period*, em estágios embrionários do mosquito *Ae. aegypti*, reforçando a relevância da compreensão do papel destes genes nas fases iniciais do mosquito. Assim, o presente estudo visa elucidar aspectos da biologia do inseto acerca da expressão no embrião e eventuais funções destes genes durante esta fase do ciclo de vida do vetor.

3- OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo é analisar o padrão de expressão do gene de relógio *period* em diferentes momentos da embriogênese do *Ae. aegypti*.

3.1 Objetivos específicos

- Validar um protocolo de remoção das cascas dos ovos, mantendo a sua integridade.
- Verificar o padrão de expressão espaço-temporal do gene *period* em embriões de *Ae. aegypti* nos tempos de 5 HAOs, 12 HAOs e 24 HAOs de desenvolvimento.
- Comparar os resultados obtidos na hibridização *in situ* com os dados preliminares de expressão gênica relativa por RT-qPCR.

4 - METODOLOGIA

4.1 Criação de mosquitos *Aedes aegypti*

Os mosquitos *Ae. aegypti* da linhagem Rockefeller utilizados durante o estudo provêm do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (LAFICAVE/IOC), sediado no Instituto de Biologia do Exército (IBEx).

A eclosão dos ovos é realizada em bacias com 1,5 litro de água milli-RO (osmose reversa) e ração de peixe Tetra Marine Granules. Para a alimentação das larvas, usamos uma proporção de 18 unidades de ração para 100 larvas, adicionada a cada 2 dias. As bacias são mantidas em 45-60% de umidade relativa, em uma Incubadora Precision (Thermo Fischer) a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, programada para ciclos de claro e escuro 12:12h (LD – do inglês *light/dark*). Após atingir o estágio de pupa, elas são transferidas para uma gaiola (16,3 cm x 18,8 cm, largura e altura, respectivamente), e, ao atingirem a fase adulta, os mosquitos são providos com alimentação *ad libitum* de solução açucarada (sacarose 10%).

4.2 Alimentação sanguínea das fêmeas

Cinco a sete dias após a emergência dos adultos, fêmeas de *Ae. aegypti* mantidas 24 horas sob a ausência de sacarose 10% (em jejum) foram alimentadas por 15 minutos com sangue de cobaio, no caso, um porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*) previamente anestesiado. Este procedimento foi realizado mediante aprovação do Comitê de Ética – CEUA/Fiocruz LW-20/14 concedido ao LAFICAVE. Após a alimentação, as fêmeas foram mantidas por 72 horas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, período em que ocorrerá a ovogênese.

4.3 Postura sincronizada

Três dias após a alimentação sanguínea, as fêmeas foram adormecidas em gelo e rapidamente transferidas para placas de Petri 100 mm x 20 mm (BD Falcon) para obtenção dos ovos. Distribuídas em grupos de 5 fêmeas por placa, as placas foram forradas com papel filtro umedecido com cerca de 3 ml de água filtrada e mantidas em incubadora por 1 hora a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. As placas foram envoltas por papel alumínio, de acordo com procedimento adaptado de Rezende *et al.* (2008) e Farnesi *et al.* (2009). Após o período, as fêmeas foram descartadas, e as placas vedadas com Parafilme (M, Bemis).

Os tempos embrionários foram identificados a partir das horas após a postura, aqui representadas como HAOs (horas após oviposição), iniciando-se a contagem em 0 HAO, 1 hora após o momento inicial em que as fêmeas foram condicionadas à oviposição. Assim, os ovos foram mantidos a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ em ciclos de claro-escuro de 12:12h (LD), até o término da coleta de respectivos pontos da embriogênese. A identificação dos estágios embrionários foi realizada de acordo com Vital *et al.* (2010) como será abordado posteriormente.

4.4 Protocolo de remoção das cascas dos ovos de *Ae. aegypti*

Após a postura sincronizada, foi realizada a coleta de ovos nos tempos de 5 HAOs, 12 HAOs e 24 HAOs, mantidos a 28 °C, para a remoção das cascas dos ovos com a finalidade de isolar os embriões de *Ae. aegypti*. Este protocolo abaixo refere-se à técnica para remoção do córion dos ovos de 5 HAOs.

Os ovos foram transferidos das placas com auxílio de um pincel e acondicionados, cerca de 500 ovos por microtubos de 1,5 ml. Em cada microtubo, foi adicionado 1ml de solução de Trpis (Trpis, 1970) (anexo B) sob agitação por 5 minutos. Posteriormente os ovos foram lavados com água Milli-Q por 3 vezes, com rápida centrifugação em baixa rotação (4800 rpm/ 2100 g) por 3 segundos utilizando a Centrífuga Eppendorf 5415 D, entre as lavagens.

Aos ovos foram adicionados 500 µl de PBS 1X (Tampão Fosfato-Salino – anexo B) + formaldeído 9% e 500 µl de heptano resfriado à - 80 °C (quadro 1) e deixados em agitação constante por 1 hora. Após retirada a fase inferior do líquido (aquosa), adicionados 500 µl de água Milli-Q fervente (quadro 1), agitando vigorosamente em vórtex por 1 minuto.

Depois, retirando-se novamente a fase inferior, adicionou-se 700 µl de metanol resfriado a - 80 °C, agitando vigorosamente por 1 minuto no vórtex. Em seguida, retirou-se toda a solução e foi realizada lavagem com metanol à temperatura ambiente (25 °C) por 3 vezes. Posteriormente, os embriões foram reidratados em mistura de 500 µl de PBS 1X e 500 µl de metanol na proporção 1:1, e, após, 1 ml (100%) de PBS 1X. Em seguida, foi adicionado 1ml de solução de fixação Millonig (Carson *et al.*, 1973) (Anexo B), deixado em agitação por 20 minutos.

Em seguida, a solução foi retirada e os ovos lavados 3 vezes com PBS 1X, e, logo após, com hipoclorito de sódio (Alvox composição 12% NaOCl, Vetex), diluído em água Milli-Q. A referida etapa da exposição ao hipoclorito de sódio (NaOCl) foi realizada em diferentes concentrações e variados tempos de exposição (quadro 1). Depois, foi realizada a lavagem dos embriões em PBST 1X (tween-20 a 0,05%) (anexo B), com centrifugação em baixa rotação (4800 rpm/ 2100 g) por 3 segundos, e estocados em PBS 1X a 4 °C, até seguirem para a etapa seguinte de hibridização *in situ*.

Em outro momento, os embriões foram transferidos para lâminas histológicas a fim de realizar o registro fotográfico com o programa PLA6xxx-Capture, utilizando câmera Pixelink modelo PL-A662, acoplada à Lupa Zeiss SteREO Discovery.V12.

Quadro 1 – Variáveis do protocolo de remoção das cascas dos ovos de *Aedes aegypti*

Pontos da embriogênese	Trpis	Heptano	Metanol (-80°C)	Água fervente + Metanol -80°C	Concentração hipoclorito de sódio (NaClO)	Concentração final de cloro ativo	Tempo de exposição NaClO
5 HAOs	5 min	-80°C	X	-	15% (v/v)	1,8%	1 min 1 min e 10s 1 min e 20s*
24 HAOs	5 min	25°C	-	X	50% (v/v)	6%	1 min 1 min e 10s 1 min e 20s*
12 HAOs	5 min	25°C	-	X	30% (v/v)	3,6%	1 min e 20s
	5 min	25°C	-	X	35% (v/v)	4,2%	1 min e 20s
	5 min	25°C	-	X	40% (v/v)	4,8%	1 min e 20s
	5 min	25°C	-	X	45% (v/v)	5,4%	1 min e 20s
	5 min	25°C	-	X	50% (v/v)	6%	1 min e 20s
	5 min	25°C	-	X	50% (v/v)	6%	2 min e 30s 3 min 5 min
	10 min	-80°C	X	-	50% (v/v)	6%	2 min e 40s*

Trpis, heptano, água fervente, metanol e concentrações de NaClO, adaptados aos diferentes tempos de embriogênese. (*) Condições do protocolo escolhidas como melhor funcionamento dentre as adaptações testadas. (X) assinalado: indica uso das variáveis metanol; água fervente + metanol. (-) Variável não testada. As diferentes cores em 12 HAOs representam os blocos de testes realizados com condições variadas. Os tempos de embriogênese estudados encontram-se nos estágios embrionários de fase do blastodermis celular (5 HAOs), extensão da banda germinal (12 HAOs) e retração da banda germinal, com segmentação da região cefálica (24 HAOs). Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Hibridização *in situ* em embriões de *Ae. aegypti*

O protocolo de hibridização *in situ* foi estabelecido e adaptado a partir de Haugen *et al.* (2010), Chahad-Ehlers *et al.* (2013) e Santos (2018). As soluções usadas neste protocolo estão descritas no anexo B.

Embriões previamente fixados, desprovidos dos envoltórios, armazenados em PBS 1X, foram gradualmente transferidos para PBST 1X (0,1% Tween-20) (v/v), e lavados em placa agitadora por 5 minutos. Após, foram fixados em 500 µl de PFA (paraformaldeído) 4% (p/v) sob agitação por 10 minutos, lavados 3 vezes com PBST 1X, por 5 minutos cada e posteriormente homogeneizados em temperatura ambiente em bateria de solução de hibridização com DNA de esperma de salmão (Hyb Buffer) + PBST 1X, por 5 min:

- I. 50% PBST 1X: 50% Hyb Buffer
- II. 25% PBST 1X: 75% Hyb Buffer

Em seguida, os embriões foram incubados com 50 µl de Hyb Buffer 100%, por 2 vezes, 5 minutos cada, e posteriormente em 50 µl Hyb de Buffer a 100% a 55 °C por 1 hora, na fase de pré-hibridização. Após esses procedimentos, foram adicionados 50 µl de Hyb Buffer + sondas, previamente aquecidos por 5 minutos a 90 °C. Para a detecção do mRNA *period*, utilizamos as sondas previamente sintetizadas com os promotores T7 e SP6 para as sondas

antissenso e senso, respectivamente (Chahad-Ehlers *et al.*, 2013) (DIG RNA Labeling Kit, Roche, Cat. Nº 11 175 025 910), com diluição 1:100, e incubados *over night* (de 12 a 16 horas) a 55 ° C em banho seco. A sonda controle foi confeccionada com o promotor SP6, e representa a sequência senso, idêntica à sequência do mRNA encontrada na célula-alvo de interesse, e a sonda sintetizada com o promotor T7 representa a sequência complementar à sonda senso.

Abaixo, os seguintes *primers* utilizados para a sequência das sondas:

Forward: 5' GAGCTCCATATTTTGAGACATC 3'

Reverse: 5' TATGAAAGACCGTCCAAGC 3'

No dia seguinte, os embriões foram incubados em 50 µl de Hyb Buffer a 55 °C em banho seco, por 4 vezes, 30 minutos cada. Em seguida, foram transferidos gradualmente para PBST 1X nas proporções:

- I. 2:1 Hyb Buffer: PBST 1X – 15 min a 55 °C
- II. 1:2 Hyb Buffer: PBST 1X – 15 min a 55 °C

Em seguida os embriões foram lavados em 500 µl PBST 1X em temperatura ambiente, com centrifugação em baixa rotação (4000 rpm/ 1500 g) por 3 segundos na Centrífuga Eppendorf 5415 D, e, após isso, foram lavados com a mesma solução por 2 vezes, em agitador, por 15 minutos cada. Os embriões foram lavados e posteriormente incubados em 500 µl de solução de bloqueio contendo soro de cabra – NGS 5% (do inglês *Normal Goat Serum*, Sigma G9023) em PBST 1X por 1 hora (em agitador). Logo depois, a solução de bloqueio foi removida, e os embriões foram incubados em 500 µl de anticorpo antidigoxigenina-AP (Anti-digoxigenin-fluorescein, Fab fragments, Roche, Cat. Nº 11 207 741 910) diluição 1:1000 em PBST 1X, de 12 a 16 horas a 4 °C.

Após esse período, as amostras foram lavadas 2 vezes com 500 µl de PBST 1X em temperatura ambiente por 5 minutos, com centrifugação em baixa rotação entre as lavagens (4000 rpm/ 1500 g), e 3 vezes com 500 µl de PBST 1X em agitador por 15 minutos cada. Posteriormente, embriões foram lavados com 500 µl de tampão de coloração e incubados na mesma solução 2 vezes, 5 minutos cada. O tampão de coloração (*Staining Buffer*) é utilizado para a detecção da enzima fosfatase alcalina conjugada ao anticorpo antidigoxigenina.

Por fim, os embriões foram transferidos para a placa de 24 poços, e foi adicionado em cada poço 1 ml da solução de revelação NBT/BCIP (BCIP/NBT *Liquid Substrate System*, Sigma, B1911). Os embriões foram incubados durante 4 minutos e observados em lupa, para verificar o surgimento de marcação roxa nos embriões. A reação de NBT/BCIP foi interrompida com adição de PBS 1X, e os embriões foram lavados 3 vezes com PBST 1X na própria placa e armazenados em microtubos de 1,5 ml contendo glicerol 70% em etanol, em *freezer* (a - 20 °C).

Em outro momento, os embriões foram transferidos para lâminas histológicas para o registro fotográfico com o programa Motic Image Plus 2.0, que foi realizado utilizando-se Microscópio Nikon Eclipse E200 com câmera Moticom 3.0 MP acoplada.

5 – RESULTADOS

5.1- Remoção do córion dos ovos de 5 HAOs

Utilizando-se o protocolo original (item 4.4) padronizado para os ovos de 5 HAOs, foi possível notar que ainda apresentavam resquícios de córion remanescente, o que poderia prejudicar a eficiência da hibridização *in situ*, além dos embriões apresentarem aspecto bastante danificado. Neste sentido, foram feitos testes, a fim de ajustar alguns passos do protocolo com o propósito de otimizar o resultado, como requisito essencial para a próxima etapa.

Os ajustes realizados consistiram em centrifugações adaptadas à baixa rotação, já que o passo requerido de “spin” no protocolo foi adaptado à centrífuga (equipamento), utilizando-se centrifugações de curta duração, a fim de separar os ovos da solução em questão. Em princípio, foram utilizadas rotações mais altas, entre 8000-9000 rpm (9000 rpm/ 7500 g), o que ocasionou prejuízos aos embriões, resultando em um aspecto danificado, pela extrusão de seus conteúdos.

Posteriormente, com o objetivo de manter a integridade dos embriões para os sucessivos experimentos de hibridização *in situ*, as curtas centrifugações foram ajustadas, diminuindo-se gradativamente a velocidade de rotação até atingir-se o ideal de 4800 rpm (2100 g), que se considerou suficiente para precipitar os ovos, porém sem danificá-los.

Da mesma forma, outro ajuste também realizado está relacionado com a redução do montante de ovos dispostos por tubo, facilitando que as soluções do protocolo que atuam sob constante agitação, como Millonig (solução fixadora) e hipoclorito de sódio, entrassem em contato com a superfície total dos ovos.

Por fim, um item também modificado foi o aumento do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio, pois, conforme abordado anteriormente, ele é utilizado para promover a digestão do córion dos ovos. O tempo inicial de lavagem era de 1 minuto em NaClO 15% (v/v), passando por graduais mudanças de 1 minuto e 10 segundos até o tempo final de 1 minuto e 20 segundos (quadro 1). Este último tempo de exposição ao NaClO de 1 minuto e 20 segundos (figura 10 C-D) foi determinado como padrão não somente para 5 HAOs como para as demais idades embrionárias (12 e 24 HAOs).

Desta forma, a partir das alterações que originaram o protocolo final (item 4.4), os resultados indicam uma melhora gradual da remoção dos envoltórios em 5 HAOs de desenvolvimento. Contudo, com a aderência das células da serosa e do âmnion à região dorsal do ovo, o tratamento com NaClO em 1 minuto e 20 segundos (figura 10 C-D) promoveu

uma remoção da maior parte do córion em comparação com os tempos anteriores de 1 minuto (figura 10 A) e 1 minuto e 10 segundos (Figura 10 B).



Figura 10: Embriões de *Ae. aegypti* de 5 HAOs após protocolo de remoção do córion dos ovos, com exposição ao hipoclorito de sódio (NaClO) 15% (v/v), em diferentes tempos de exposição e respectivos aumentos. (A) 1 minuto – 70x, (B) 1 minuto e 10 segundos – 29x, (C-D) 1 minuto e 20 segundos – 70x. Barra de escala utilizada: 1 mm.

5.2 Remoção das cascas dos ovos de 24 HAOs

Para os ovos de 24 HAOs, o protocolo utilizado foi adaptado para remoção das cascas dos ovos, que compreende o exocórien, o endocórien e a cutícula serosa. Através da modificação da temperatura do heptano de - 80 °C para temperatura ambiente (25 °C) incubado com o PBS + formaldeído 9%; adição do passo de choque térmico com H₂O Milli-Q fervente, e posteriormente adição de metanol a - 80 °C, conforme estabelecido (anexo D).

Nesta respectiva idade, foi utilizado o novo tempo de exposição ao hipoclorito de sódio de 1 minuto e 20 segundos, porém na concentração de 50% NaClO (v/v) (figura 11). Após a realização do protocolo, os embriões apresentaram-se íntegros e sob ausência de parte de seus envoltórios, porém ainda foi possível observar a presença da cutícula serosa, o envoltório translúcido (figura 11 B, D) de indispensável remoção. Além deste, ainda foi possível observar

pigmentação remanescente do endocórrion, mesmo que em menor quantidade (figura 11 A, D).

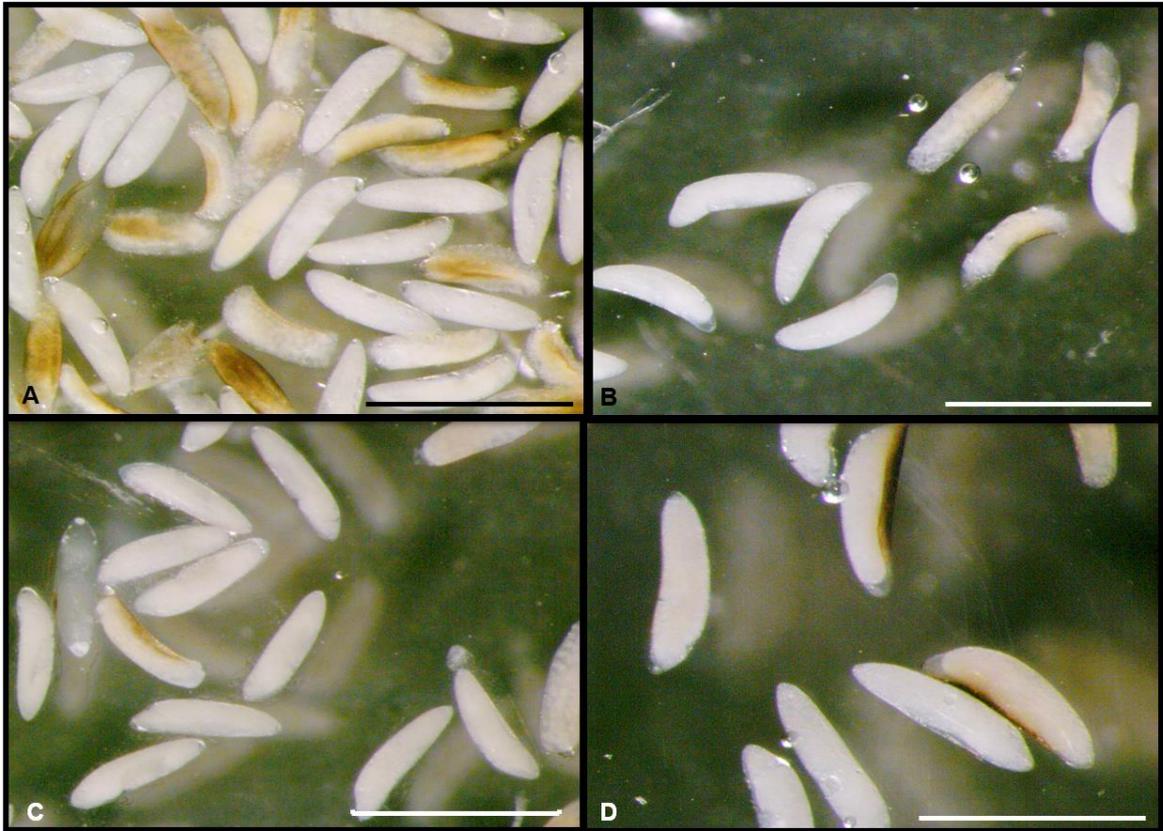


Figura 11: Embriões de *Ae. aegypti* de 24 HAOs após protocolo de remoção das cascas dos ovos, com hipoclorito de sódio (NaClO) 50% (v/v), em 1 min e 20 s de exposição e respectivos aumentos (A-C) 70x e (D) 100x. Barra de escala utilizada: 1 mm.

5.3 Remoção das cascas dos ovos de 12 HAOs

Paralelamente, para o tempo de 12 HAOs, constituindo um ponto intermediário entre os embriões mais jovens (5 HAOs) e mais tardios (24 HAOs), foi realizado um primeiro teste utilizando-se o protocolo de remoção das cascas dos ovos de 24 HAOs como referência. Neste, a etapa da digestão com hipoclorito de sódio foi adaptada entre as concentrações de 15% (5 HAOs) e 50% (24 HAOs) para a concentração 30% NaClO (v/v) em 1 minuto e 20 segundos de exposição, e, após a realização do referido protocolo, os embriões foram encaminhados para a hibridização *in situ* (anexo E, figura II).

Posteriormente, como não se obteve sucesso, foram realizados quatro experimentos subsequentes do mesmo protocolo com adaptação a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (35%, 40%, 45% e 50%) (v/v), mantendo-se o mesmo tempo de exposição (1 minuto e 20 segundos). Desta forma, foi escolhida a concentração de 50% NaClO (v/v) para aprimoramento desta etapa do protocolo, e embriões seguiram para a hibridização *in situ* (anexo E, figura III).

Em outro momento, foram realizados novos testes com a maior concentração de hipoclorito de sódio (NaClO) utilizada neste trabalho (50% NaClO) (v/v). A etapa de digestão foi realizada nos diferentes tempos de exposição: 2 minutos e 30 segundos (figura 12 D), 3 minutos (figura 12 E-F), e 5 minutos. Dentro deste terceiro bloco de testes, selecionamos os embriões que foram submetidos ao protocolo com exposição de 5 minutos, que, então, foram conduzidos para a hibridização *in situ*.

Em seguida, uma nova tentativa de remoção dos envoltórios foi realizada, desta vez com o protocolo padronizado para os ovos de 5 HAOs. Assim, foram adaptados à etapa de lavagem com Trpis de 5 para 10 minutos, seguida de exposição ao NaClO 50% (v/v) por 2 minutos e 40 segundos, o que gerou o protocolo final (anexo C). Com o auxílio da lupa, foi possível observar, dentre os testes realizados, que os embriões estavam visualmente melhores quanto ao desprovimento dos envoltórios, o que nos motivou à escolha dos tempos de exposição ao NaClO utilizados (2 minutos e 40 segundos, do atual protocolo; e 5 minutos, referente ao escolhido do bloco anterior). Assim, estes embriões foram enviados para a hibridização *in situ*.

Contudo, apesar das diversas tentativas de remoção das cascas dos ovos (item 4.4, quadro 1), e com as diferentes concentrações de NaClO aplicadas – 35% (figura 12 A), 40% (figura 12 B), 45% (figura 12 C), e 50% (figura 12 D – F) –, não houve sucesso.

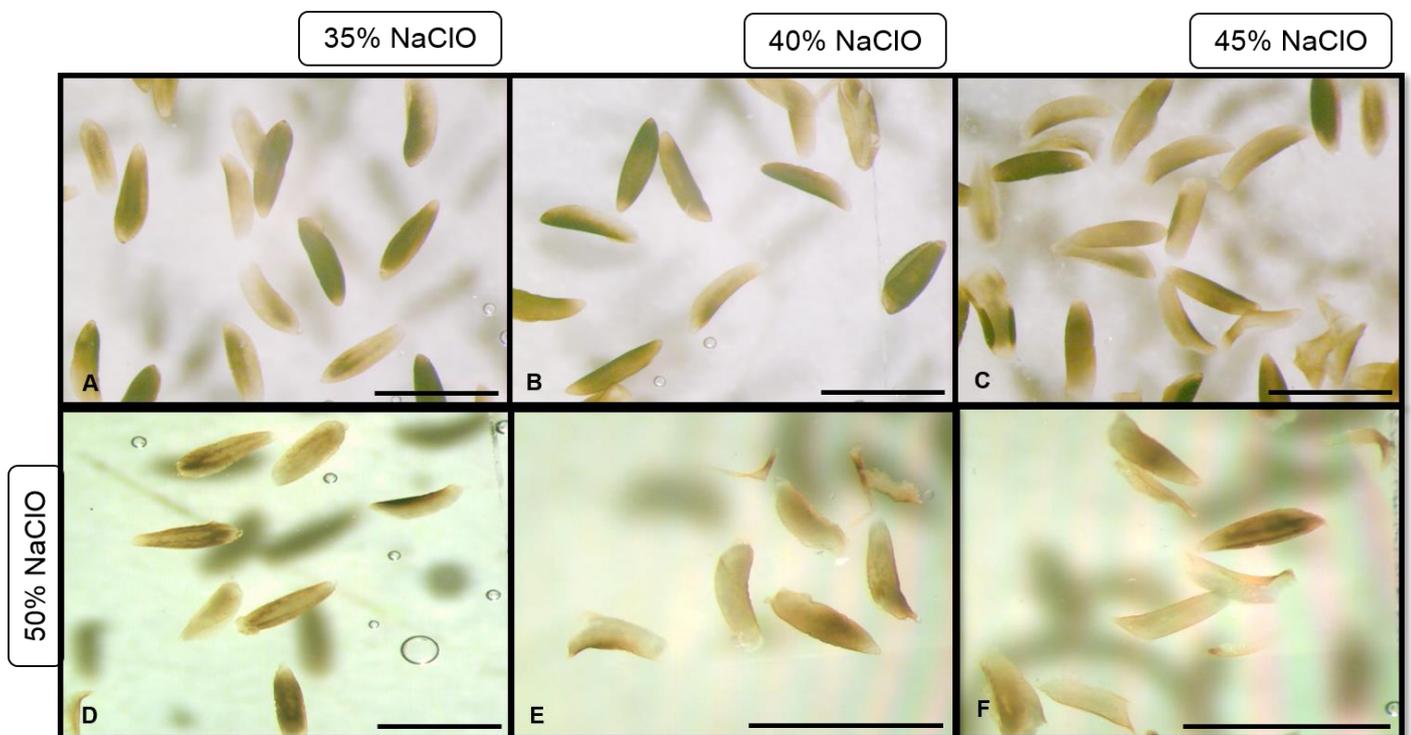


Figura 12: Embriões de *Ae. aegypti* de 12 HAOs após protocolo de remoção das cascas dos ovos, com hipoclorito de sódio (NaClO) (v/v), nas concentrações em (A) 35% NaClO, (B) 40% NaClO e (C) 45% NaClO e 50% NaClO (D-F), com exposição de 1 minuto e 20 segundos (A-C), 2 minutos e 30 segundos (D), e 3 minutos (E-F). Aumento de 38x (A-D) e 70x (E-F). Barra de escala utilizada: 1 mm.

Desta forma, nos experimentos é possível observar que partes da casca sofreram a ação de soluções do tratamento, porém outras partes se mantiveram com o endocóxon pouco clarificado (figura 12 B, E), bem como embriões bastante danificados, devido à desintegração da cutícula serosa. A ausência de cutícula serosa, observada pelas extremidades rompidas, região da linha de deiscência e do *cap*, permitiu invasão das soluções do tratamento causando a destruição parcial do embrião.

5.4 Hibridização *in situ* para *period* em embriões de *Ae. aegypti*

Após o protocolo de remoção dos envoltórios dos embriões, estes foram encaminhados para a hibridização *in situ* a fim de avaliar a expressão do gene de relógio *period* nos embriões de 5, 12 e 24 HAOs.

5.4.1 Hibridização *in situ* em embriões de 5 HAOs

Os resultados da hibridização *in situ* para embriões de 5 HAOs (figura 13) evidenciam que não há expressão de *period* nesta idade (figura 13 A-C).

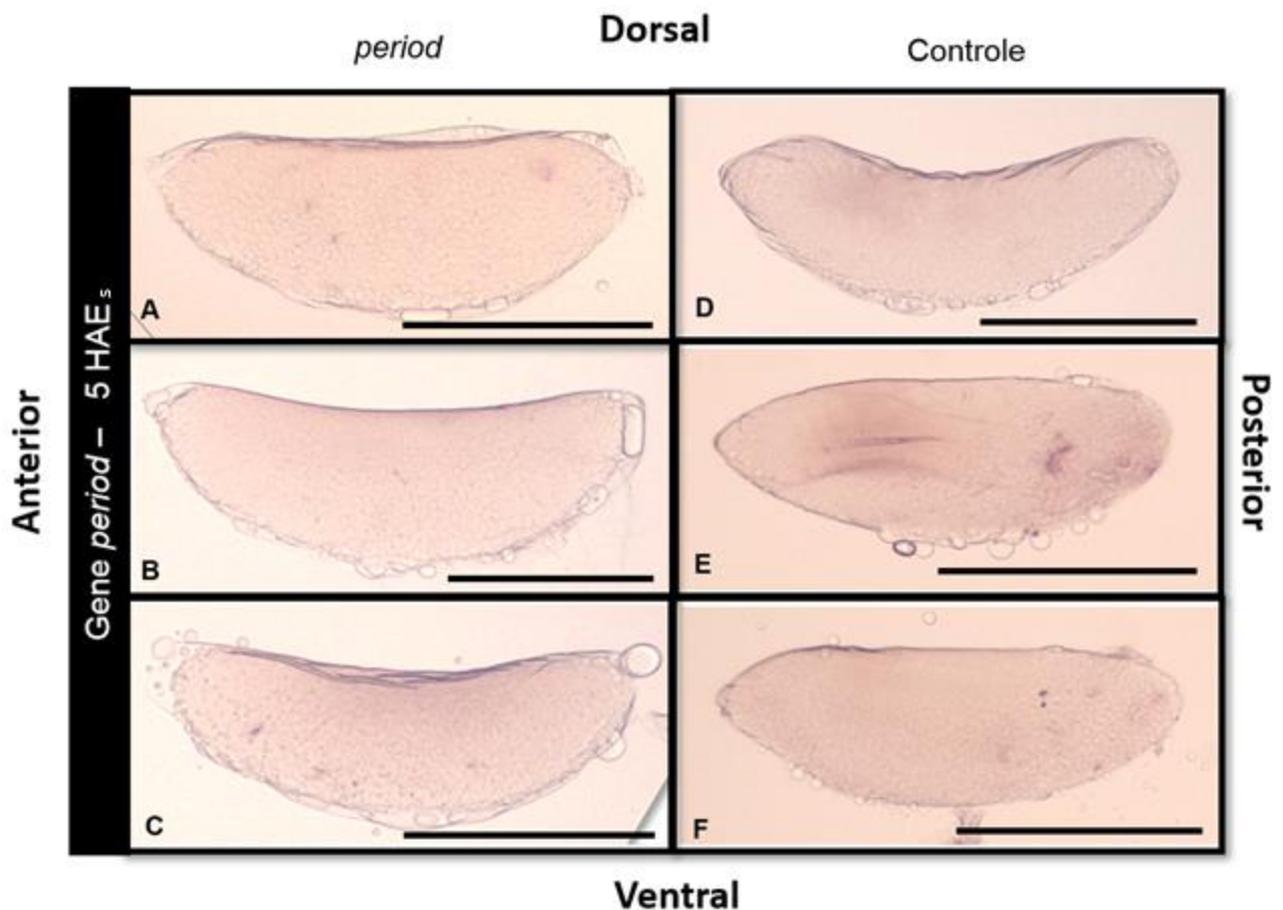


Figura 13: Hibridização *in situ* para *period* em embriões de *Ae. aegypti* de 5 HAOs sem expressão para este gene (A-C). Sonda controle (D-F). Nas margens horizontais, temos a orientação anterior e posterior dos embriões, e, nas margens verticais, as orientações dorsal e ventral. Barra de escala: 500 μ m. Aumento de 100x.

5.4.2 Hibridização *in situ* em embriões de 24 HAOs

Para a hibridização *in situ* dos embriões de 24 HAOs, não há expressão de *period* (figura 14 A-D). No entanto, foi possível identificar estruturas nos embriões estudados, como a cutícula serosa (figura 14 A, C-F), além da evidência de retração da banda germinal, corroborando o respectivo tempo de desenvolvimento embrionário de acordo com Vital *et al.* (2010).

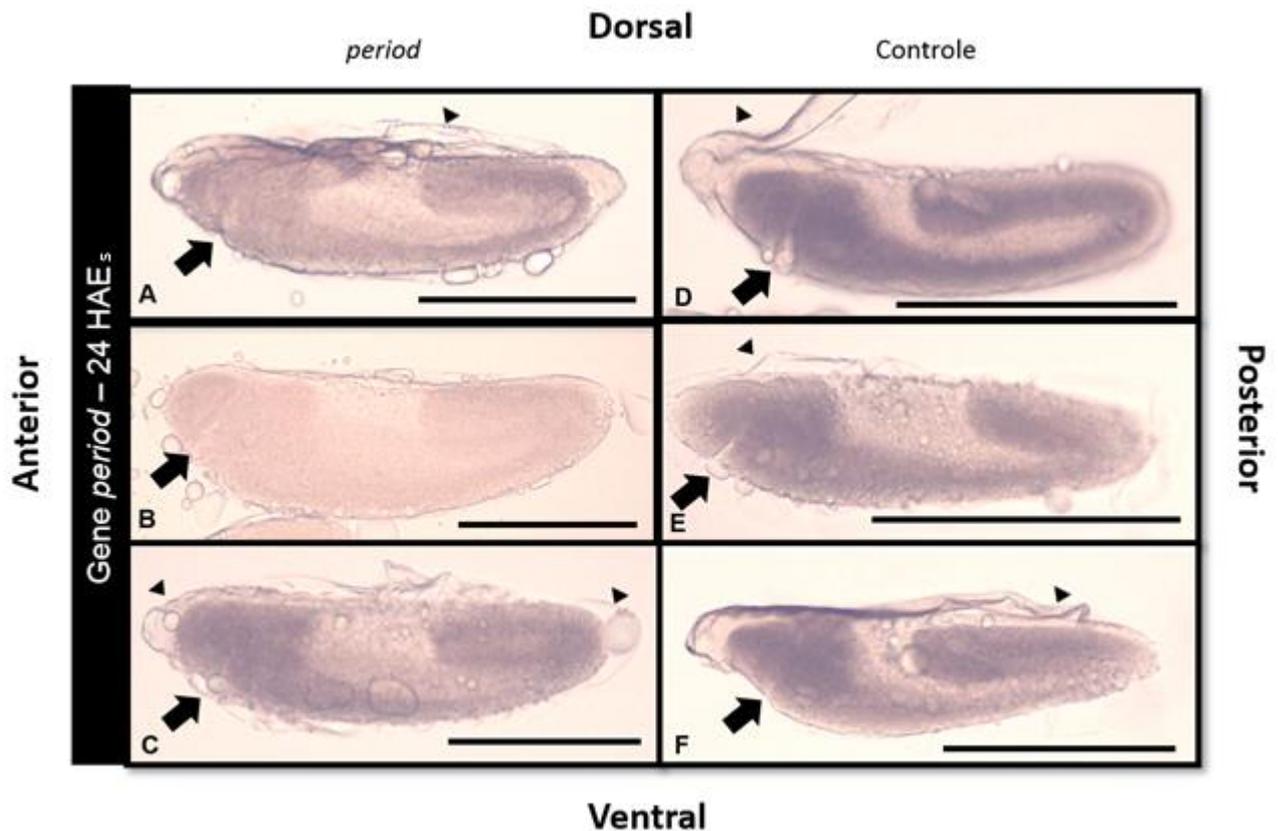


Figura 14: Hibridização *in situ* para *period* em embriões de *Ae. aegypti* de 24 HAOs. Embriões sem expressão para este gene (A - D), com parâmetro de retração da banda germinal, representado pela seta preta espessa, evidenciado para esta idade do desenvolvimento a 28 °C, e a cutícula serosa indicada pela cabeça de seta (A, C-F). Sonda controle (senso) (E-F). Nas margens horizontais, temos a orientação anterior e posterior dos embriões, e, nas margens verticais, as orientações dorsal e ventral. Barra de escala: 500 μ m. Aumento de 100x.

5.4.3 Hibridização *in situ* em embriões de 12 HAOs

Para os embriões de 12 HAOs, mesmo com diferentes experimentos de hibridização *in situ* (figuras 15 e 16), não foi possível observar expressão para *period* (figura 15 A-C; figura 16 A-B).

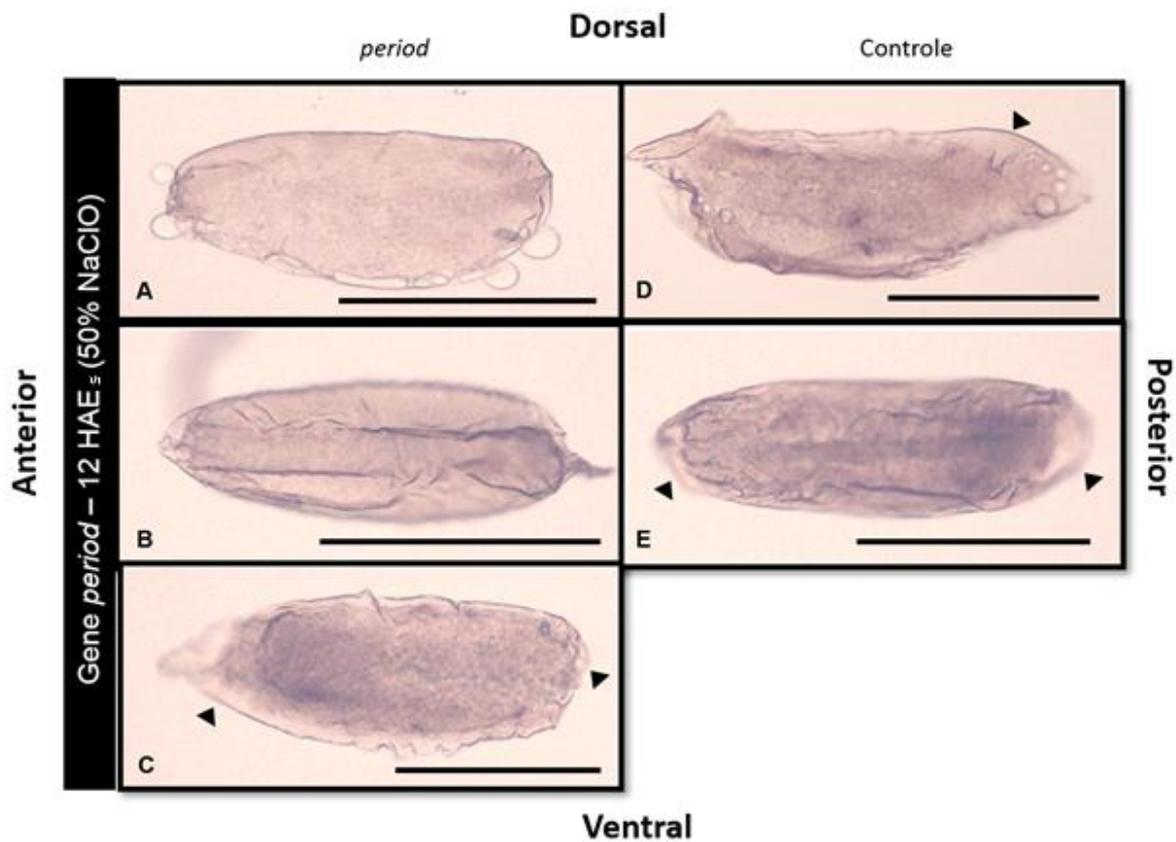


Figura 15: Hibridização *in situ* para *period* em embriões de *Ae. aegypti* de 12 HAOs, com exposição 50% NaClO (v/v) por 5 minutos, mostrando alguns ovos com córion ainda remanescente, sem sucesso para marcação para *period* (A-C). Sonda controle (senso) (D-E). A cabeça de seta representa a formação da cutícula serosa. Nas margens horizontais, temos a orientação anterior e posterior dos embriões, e, nas margens verticais, as orientações dorsal e ventral. Barra de escala: 500 μ m. Aumento de 100x.

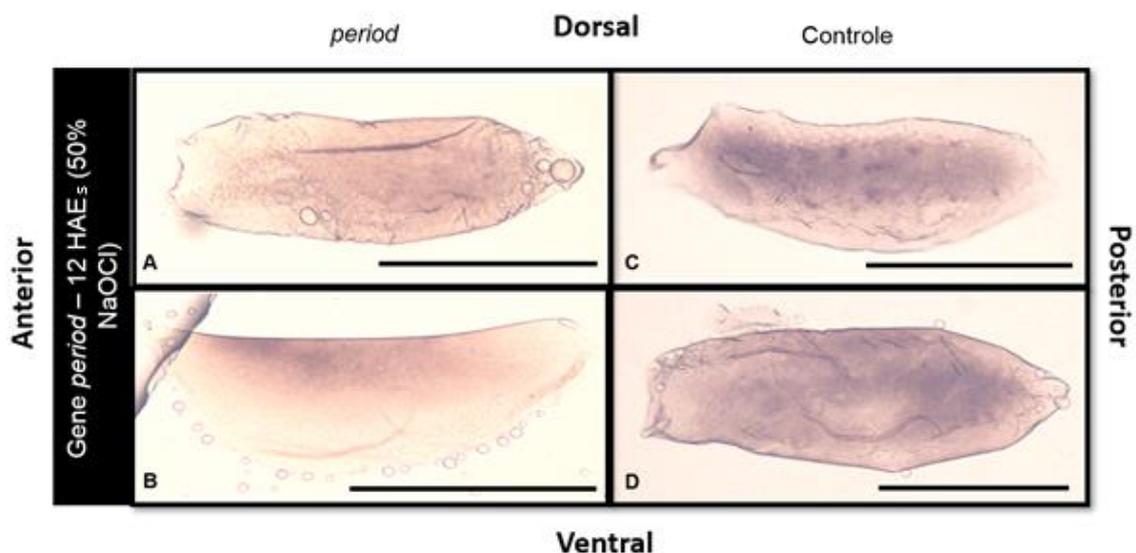


Figura 16: Hibridização *in situ* para *period* em embriões de *Ae. aegypti* de 12 HAOs, com exposição 50% NaClO (v/v) por 2 minutos e 40 segundos, porém sem marcação para *period* (A-B). Sonda controle (senso) (C-D). Nas margens horizontais, temos a orientação anterior e posterior dos embriões, e, nas margens verticais, as orientações dorsal e ventral. Barra de escala: 500 μ m. Aumento de 100x.

6- DISCUSSÃO

6.1 Motivação do Protocolo de remoção das cascas dos ovos

Os ovos de mosquitos possuem uma casca, denominada córion, composta pelo exocórion e o endocórion (Beckel, 1958; Hinton, 1968; Clements, 1992; Monnerat *et al.*, 1999; Valle *et al.*, 1999), que promove rigidez e proteção ao embrião contra condições ambientais adversas. Os ovos de mosquitos pertencentes aos gêneros *Aedes* e *Anopheles* tornam-se escuros e rígidos (Clements, 1992), o que dificulta o estudo de processos que envolvem a embriogênese devido a mecanismos de enrijecimento (esclerotização) e escurecimento (melanização) do endocórion (Clements, 1992; Li, 1994; Farnesi, 2014).

No *Ae. aegypti*, estes mecanismos, que de forma geral ocorrem entre 2 e 3 horas de desenvolvimento embrionário, acontecem de forma acentuada, pelo alto grau de melanização, em simultaneidade com o mecanismo de enrijecimento (Christophers, 1960; Clements, 1992; Han *et al.*, 2000; Li & Li, 2006).

Assim, em experimentos que abordam estudos com embriogênese são requeridas técnicas de retirada dos envoltórios pigmentados e enrijecidos. Consequentemente, este procedimento possibilita que agentes fixadores bem como sondas de hibridização *in situ* possam atingir o embrião, tornando possível observar padrões de expressão gênica *in situ* ao longo da embriogênese. Portanto, neste trabalho modificamos um protocolo pré-estabelecido de remoção dos envoltórios de embriões de *Ae. aegypti*, com a finalidade de concentrar esforços para promover a retirada da rígida casca dos ovos deste inseto.

Estudos envolvendo expressão de genes de relógio em mosquitos têm sido desenvolvidos principalmente em adultos, sob diferentes condições e aspectos como expressão dos genes que compõem as alças de retroalimentação negativa no *Ae. aegypti* e no *Culex quinquefasciatus* (Gentile *et al.*, 2009), e expressão de *cycle* e *period* em cérebros do *Ae. aegypti* (Chahad-Ehlers *et al.*, 2013). Contudo, estudos envolvendo expressão destes genes durante a embriogênese do *Ae. aegypti*, o foco central deste projeto, ainda eram escassos. Neste trabalho, avaliamos a remoção dos envoltórios dos embriões de *Ae. aegypti* e, posteriormente, o perfil de expressão do gene *period* nos tempos de desenvolvimento embrionário de 5, 12 e 24 HAOs.

6.1.1 Remoção das cascas dos ovos de *Aedes aegypti*

O protocolo utilizado neste trabalho é oriundo de adaptações de estudos feitos anteriormente em outras espécies de culicídeos como *Aedes vexans* (Moretti & Larsen, 1973) e *Anopheles gambiae* (Goltsev *et al.*, 2004), além do estudo que engloba a fixação, preparação e dissecação de embriões de *Aedes aegypti* (Clemons *et al.*, 2010). Este protocolo é proveniente de diversas tentativas de estabelecimento pelos grupos da Dra. Rafaela Bruno

(LABIMI/IOC), do Dr. Gustavo Rezende (LQFPP/UENF) e do Dr. Rodrigo Nunes da Fonseca (LICM-UFRJ/Macaé), com a finalidade de romper a casca dos ovos de *Ae. aegypti*.

Estudos anteriores utilizam o NaClO como etapa única para a digestão do córion em estudos sobre a cutícula serosa (Rezende *et al.*, 2008; Goltsev *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2014), além de outros que utilizam a remoção manual do córion com agulhas de insulina e fita adesiva dupla-face conjugada a um protocolo base semelhante ao utilizado nesta pesquisa (Goltsev *et al.*, 2004; Goltsev *et al.*, 2007; Goltsev *et al.*, 2009; Clemons *et al.*, 2010).

Neste trabalho, foram estabelecidos métodos alternativos para o rompimento dos envoltórios dos embriões através de processos envolvendo choque térmico, fixação e desidratação como os realizados em Goltsev *et al.* (2004); Calvo *et al.* (2005); Goltsev *et al.* (2009), assim como a utilização do NaClO para a remoção final da camada do endocóron.

Goltsev e colaboradores (2004) desenvolveram o método de fixação e remoção de envoltórios em embriões de *Anopheles*, utilizando processos de choque térmico e desidratação, a fim de causar rupturas no endocóron, para posterior remoção manual com agulha de insulina e fita adesiva dupla-face.

Já Clemons e colaboradores (2010) também utilizaram protocolo semelhante, adaptado de Patel (1994) e relataram que o aquecimento dos embriões durante o protocolo otimiza a integridade do tecido, enquanto que o tratamento com hipoclorito de sódio e as etapas de choque térmico, denominadas passos de ruptura, auxiliam em uma boa preservação dos embriões, associada à remoção do endocóron e da cutícula serosa.

Durante a embriogênese inicial da maioria dos insetos, são produzidas as membranas extraembrionárias serosa e âmnion, que estão relacionadas ao processo de blastocinese, caracterizado pela reorientação espacial do embrião (Cobben, 1968; Panfilio, 2008). Mais especificamente, as células do blastoderma dorsal formam a serosa (Raminani & Cupp, 1975).

Em embriões de 5 HAOs, o respectivo córion não foi completamente removido, permanecendo a região dorsal com a pigmentação do córion remanescente. Isto provavelmente ocorreu devido ao momento da embriogênese, pois, entre cerca de 5 a 8 HAOs do desenvolvimento, células da serosa e do âmnion, que se originam na região dorsal do ovo (Christophers, 1960; Raminani & Cupp, 1975), ainda se encontram aderidas ao córion, uma vez que serosa e endocóron estão mais associados no início do desenvolvimento embrionário (Beckel, 1958). Isto já não ocorre em embriões mais tardios como os de 24 HAOs, pois nesse momento de desenvolvimento as membranas da serosa e âmnion já se romperam, sofrendo apoptose.

Assim, este fato explicaria a região mais escura que pôde ser observada nos embriões de 5 HAOs. Os tratamentos tiveram o intuito de remover o córion por completo, porém, devido a este momento de formação das membranas extraembrionárias, o córion foi removido de

forma parcial, ficando a região dorsal do ovo com presença de córion remanescente, como foi observado nos diferentes tempos de exposição ao NaClO.

De forma geral, os tempos de desenvolvimento de 5 e 24 HAOs obtiveram um bom funcionamento com relação ao protocolo de remoção, porém o mesmo não aconteceu no tempo de 12 HAOs. Em princípio, como o protocolo foi estabelecido para períodos iniciais como 5 HAOs, e mais tardios em 24 HAOs, os embriões de 12 HAOs como período intermediário aos previamente citados passaram por adaptações de protocolo e tempos de exposição ao hipoclorito de sódio.

Porém, em embriões de 12 HAOs, a cutícula serosa, por estar recém-formada, ainda não é madura, uma vez que este processo de maturação se completa após 20 HAOs (Rezende *et al.*, 2008). Dessa maneira, nos experimentos foi possível observar embriões bastante danificados, devido à desintegração da cutícula serosa. Assim, ao se dismantelar, expõe o embrião à ação das soluções do protocolo de remoção das cascas dos ovos, fazendo com que não se mantenham.

Desta forma, a lavagem com NaClO deve ser suficiente para digerir o córion, porém não deve ser tão prolongada e concentrada a ponto de danificar o embrião (Beckel, 1958). A utilização do hipoclorito de sódio para a digestão do córion desfaz os *crosslinkings* entre as proteínas, causando a clarificação do endocóron, a qual, conjugada ao protocolo, promoveu a tentativa da retirada desses envoltórios.

Através dos resultados obtidos nos ovos de 24 HAOs, apesar de não ter sido realizada a retirada manual do endocóron e da cutícula serosa, foi possível observar que, em alguns embriões, houve o rompimento da cutícula serosa, o que, em concordância com Clemons *et al.* (2010) representa a etapa crucial para a realização dos ensaios de hibridização *in situ*.

No entanto, a técnica de remoção manual pode mostrar-se mais laboriosa inicialmente, devido à característica delicada dos embriões, com possibilidade de danificá-los (Beckel, 1958). Ainda assim, trabalhos que utilizaram protocolo de rompimento e remoção manual dos envoltórios (Goltsev *et al.*, 2004, Goltsev *et al.*, 2007; Goltsev *et al.*, 2009; Clemons *et al.*, 2010) manipularam embriões em diferentes idades.

Com isso, a técnica manual pode ser mais vantajosa comparada ao método que inclui a digestão química da casca dos ovos utilizada no presente estudo. Desta forma, em virtude de manusear embriões em períodos cruciais do desenvolvimento, como a formação da cutícula serosa, a remoção dos envoltórios manualmente pode obter maior sucesso para estudos de expressão gênica como a hibridização *in situ*.

Apesar do protocolo utilizado neste trabalho evitar o contato físico com os embriões, o montante de ovos reduz-se significativamente até a fase da hibridização *in situ*, já que, durante a realização da fase anterior, se perde praticamente a metade dos ovos. Isto demanda experimentos de postura sincronizada em larga escala para obter uma grande quantidade

deles. Além do que foi abordado, percebe-se a necessidade de otimização do referido procedimento de remoção dos envoltórios em estudos futuros.

6.2 Hibridização *in situ* para *period* no *Aedes aegypti*

Estudos do nosso grupo de pesquisa investigam como o relógio endógeno de organismos vetores como *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* influencia os ritmos biológicos, dos quais podemos citar o ritmo circadiano de atividade locomotora. Assim, são investigados mecanismos moleculares do marcapasso endógeno dos organismos, submetidos à influência de sincronizadores ambientais como luz e temperatura (Gentile *et al.*, 2009; Lima-Camara *et al.*, 2011; Gentile *et al.*, 2013; Araripe *et al.*, 2018; Farnesi *et al.*, 2018; Padilha *et al.*, 2018; Rivas *et al.*, 2018), e os denominados *Zeitgebers*, capazes de promover a sincronização do relógio biológico dos organismos (Moore-Ede *et al.*, 1982; Marques & Menna-Barreto, 1999).

Por outro lado, a embriogênese se configura como evento independente dos ciclos de claro/escuro (dia e noite) para a expressão dos genes que controlam este ritmo de desenvolvimento. O tempo de embriogênese é marcado pelas horas após a postura dos ovos e por eventos significativos do processo, tais como a extensão e retração da banda germinativa, o fechamento dorsal e a organogênese. Assim, sabe-se que o tempo de desenvolvimento marcado pelas horas, que varia entre as espécies, é estritamente dependente da temperatura. Como citado anteriormente, no *Ae. aegypti* a 25 °C, a embriogênese ocorre por volta de 77,4 HAOs, e, a 28 °C, ocorre em torno de 61,6 HAOs (Farnesi *et al.*, 2009).

Houl *et al.* (2008) enfatizam ainda que coletas de embriões de *D. melanogaster* realizadas em diferentes CTs (do inglês: *Circadian Times*, funcionamento do relógio endógeno propriamente, sem influência da luz como sincronizador ambiental) ou também representado pela sigla DD (escuro constante, extraída do inglês 'red dim light' – luz fraca vermelha), permanecem com o mesmo perfil temporal de expressão de CLK e PER, independentemente do período da coleta, indicando que são controlados pelo desenvolvimento do embrião e não pela fase do ciclo circadiano em que os ovos foram fertilizados.

Este grupo demonstra ainda, neste mesmo trabalho, que a expressão da proteína PER no cordão nervoso ventral e no cérebro dos embriões de *D. melanogaster*, nos estágios embrionários ES 12 e 14 (ES, do inglês *Embryonic Stage*), ocorrendo antes mesmo de CLK (ES 16). A ausência de imunorreatividade de CLK e a confirmação de padrão de localização idênticas de PER em mutantes de CLK (*Clk^{rk}*) indicam que *period* não é ativado por CLK/CYC nos estágios embrionários (Houl *et al.*, 2008). Um padrão de ativação semelhante,

independentemente de CLK-CYC, acontece em ovários de fêmeas da espécie, em que PER não está associado à função circadiana oscilatória (Beaver *et al.*, 2003).

A relação do presente trabalho com os estudos de Houl *et al.* (2008) se estabelece pela análise dos resultados preliminares de RT-qPCR do grupo (anexo A), durante a embriogênese de *Ae. aegypti*. Os resultados de expressão do mRNA de *period* indicam que, nas primeiras horas da embriogênese até cerca de 8 HAOs, não se observa expressão deste gene, sendo sucedidos por um grande pico de expressão em 12 HAOs. Já a expressão do mRNA de *Clock* possui um pico durante a embriogênese tardia (44 HAOs).

Este dado indicaria que *period* seria ativado por outro fator diferente de CLK/CYC, diferentemente do observado no relógio circadiano central na *D. melanogaster*, segundo Hardin (2011), assim como visto para a *D. melanogaster* em Houl *et al.* (2008). Contudo, ainda não foi possível elucidar a expressão no embrião por hibridização *in situ* no respectivo tempo para confrontar estes dados. Ainda assim, foi possível corroborar os resultados preliminares de RT-qPCR para *period* em experimentos de hibridização *in situ* nos tempos de 5 e 24 HAOs que não apresentam expressão para *period* em ambas as idades (anexo A).

A diferença de expressão de *Clk* e *period* durante a embriogênese já relatada pela detecção de seu produto PER, identificada antes da expressão de CLK (Houl *et al.*, 2008), sugere que outro fator de transcrição regule a expressão de mRNA e, conseqüentemente, a proteína PER. Um possível candidato seria o gene *single-minded (sim)*, que possui similaridade em seqüências nucleotídicas com *period* e é importante na emergência de células precursoras de SNC (Thomas *et al.*, 1987; Crews *et al.*, 1988), com função requerida em células da linha média para ativação da expressão de genes desta região (Nambu *et al.*, 1990).

Por hibridização *in situ*, observa-se expressão de *sim* em células da linha média do SNC durante seu desenvolvimento na embriogênese, no cordão nervoso ventral e MEC (do inglês *Midline Ectodermal Cells*), ocorrendo expressão em células neuronais e não neuronais (Crews *et al.*, 1988). A similaridade entre *per* e *sim* se dá pelo fato de ambos serem expressos no SNC embrionário, na linha média em desenvolvimento (*sim*), no subconjunto de células nesta região e no cordão nervoso ventral (*per*) na *D. melanogaster* (James *et al.*, 1986; Crews *et al.*, 1988; Houl *et al.*, 2008).

Mutantes de *sim* apresentam falhas nas divisões celulares e defeitos na formação de precursores das células nervosas, demonstrando a função primordial do gene *sim* em eventos de desenvolvimento de células da linha média (Nambu *et al.*, 1991), uma vez que, sem este gene, não há correta e adequada ativação importante de genes para o SNC. Isto corrobora com a ideia de que *single-minded* possa ser o regulador e ativador de *period* na embriogênese, já que, pelos resultados preliminares de RT-qPCR, o pico de expressão de *period* (12 HAOs) ocorre anteriormente ao de *Clock* (44 HAOs).

O gene *sim* é membro constituinte da família de fatores de transcrição (bHLH), do domínio bHLH-PAS, mesmo domínio de ligação proteína-proteína de PERIOD, sendo um dos primeiros genes da tríade descoberta neste grupo, PER-ARNT-SIM (Nambu *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1999). Além disso, *sim* possui detecção bem antes da transcrição de *per* (James *et al.*, 1986; Bargiello *et al.*, 1987; Crews *et al.*, 1988), o que reforça ainda mais a hipótese de que *per* pode estar sendo regulado por outros fatores de transcrição, no lugar de *Clk*, durante o desenvolvimento embrionário.

Experimentos de *Northern blot* não identificaram mRNA de *period* em embriões de *D. melanogaster*, de 0 HAO a 6 HAOs, porém sua expressão aumenta gradativamente a partir deste ponto até 18 HAOs (James *et al.*, 1986). Este dado pode ser consistente com os resultados preliminares de RT-qPCR de *period* em *Ae. aegypti*, que indicam que entre 0 HAO e 8 HAOs, que compreendem as horas iniciais de desenvolvimento, não há expressão deste gene, confirmado pela hibridização *in situ* em embriões de 5 HAOs, idade incluída neste período.

Futuros experimentos de hibridização *in situ* e imunofluorescência em embriões tardios, após a organogênese, auxiliarão no processo de compreender a localização de expressão dos genes de relógio como *period* durante o desenvolvimento embrionário, objeto de estudo deste trabalho. Estudos configuram-se necessários para elucidar o perfil de expressão espaço-temporal durante a embriogênese do *Aedes aegypti*.

7- CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível estabelecer um protocolo de sucesso para remoção das cascas dos ovos de *Aedes aegypti*, nos tempos de 5 e 24 HAOs, devido a alterações como o ajuste do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio para a digestão das cascas.

Através de experimentos de hibridização *in situ*, foi possível corroborar os resultados preliminares de RT-qPCR que demonstram que não há expressão de *period* em embriões de *Ae. aegypti* de 5 e 24 HAOs de desenvolvimento.

Por último, foi constatada a necessidade de maiores estudos a fim de otimizar o protocolo de remoção das cascas dos ovos de 12 HAOs,

Vemos, a partir das conclusões acima, as seguintes perspectivas teórico-práticas:

- ✓ Realização de novos testes e ajustes como alternativas de retirada dos envoltórios para posterior realização da hibridização *in situ*.
- ✓ Caracterização da expressão de *period* por hibridização *in situ*, seguindo os resultados preliminares de RT-qPCR que apontam pico de expressão em 12 HAOs.
- ✓ Perfil de expressão de *period* ao longo da embriogênese de *Aedes aegypti*.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allada R., White N. E.; So W. V.; Hall J. C.; 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.
- Andersen, S. O. (2012). Cuticular Sclerotization and Tanning. **Insect Molecular Biology and Biochemistry**, 167–192. doi:10.1016/b978-0-12-384747-8.10006-6
- Araripe, L. O; Bezerra, J. R. A.; Rivas, G. B. S.; Bruno, R. V. Locomotor activity in males of *Aedes aegypti* can shift in response to females presence. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 254, 2018.
- Araujo, J. F.; Marques, N. Cronobiologia: Uma Multidisciplinariedade Necessária. **Margem (PUCSP)**, São Paulo, v. 15, n.1, p. 97-112, 2002.
- Bae, K.; Lee C.; Sidote D.; Chuang K. Y.; Ederly I. (1998) Circadian regulation of a *Drosophila* homolog of the mammalian *Clock* gene: PER and TIM function as positive regulators. **Mol Cell Biol** 18:6142-6151.
- Bae, K.; Lee, C.; Hardin, P. E.; Ederly, I. (2000). dCLOCK is present in limiting amounts and likely mediates daily interactions between the dCLOCK-CYC transcription factor and the PERTIM complex. **J. Neurosci.** 20, 1746–1753.
- Bate M., Arias A. M. **The Development of *Drosophila melanogaster***. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1544 p. 1993.
- Bargiello, T. A.; Saez, L.; Baylies, M. K.; Gasic, G.; Young, M. W.; Spray, D. C. (1987). The *Drosophila* clock gene *per* affects intercellular junctional communication. **Nature** 328, 686-691.
- Beament, J. John Hull Grundy lecture. Eggs - the neglected insects. **J Royal Army Medical Corps** 135: 49-56, 1989.
- Beaver, L. M.; Rush B. L.; Gvakharia B. O.; Giebultowicz J. M. Noncircadian regulation and function of clock genes *period* and *timeless* in oogenesis of *Drosophila melanogaster*. **J Biol Rhythms** 2003, 18(6):463-472.
- Beckel, W. E. Investigation of permeability, diapause, and hatching in the eggs of the mosquito *Aedes hexodontus*. Dyar. **Can J Zool** 1958, 36:541-54.
- Boothroyd C. E.; Young M. W. 2008. The in(put)s and out(put)s of the *Drosophila* circadian clock. *Anais da New York Academy of Sciences*. v. 1129. p. 350-357.
- Bruno, R. V.; Lima-Camara, Tamara N.; Peixoto A. A. Ritmos Biológicos em Insetos Vetores e seu Controle Molecular. In: Silva-Neto MAC; Winter C; Termignoni C. (Org.). **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. 2012. Cap. 10.
- Calvo, E.; Walter, M.; Adelman, Z. N.; Jimenez, A.; Onal, S.; Marinotti, O.; James, A. A. Nanos (nos) genes of the vector mosquitoes, *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. **Insect Biochem Mol Biol** 2005. 35:789–798.
- Carson F. L.; Martins, J. H.; Lynn, J. A. 1973. Formalin fixation for electron microscopy. **Am J Clin Pathol** 59: 365-373.

Chahad-Ehlers, S.; Gentile, C.; Lima, J. B. P.; Peixoto, A. A.; Bruno, R. V. Analysis of cycle Gene Expression in *Aedes aegypti* Brains by *In Situ* Hybridization. **Plos One**, v. 8, p. e52559, 2013.

Christophers, S. 1960. ***Aedes aegypti* (L) The Yellow Fever Mosquito**. Its Life History, Bionomics and Structure, Cambridge at the University Press, Cambridge.

Clements, A. N. **The biology of mosquitoes**. Development, nutrition and reproduction. London: Chapman and Hall; 1992.

Clemons, A.; Haugen, M.; Flannery, E.; Kast, K.; Jacowski, C.; Severson, D.; DumanScheel, M. Fixation and preparation of developing tissues from *Aedes aegypti*. **Cold Spring Harb. Protoc.** 2010

Cobben, R.H., 1968. Evolutionary trends in Heteroptera, Part 1, **Eggs, Architecture of the Shell, Gross Embryology and Eclosion**. Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen.

Consoli R. A.; Lourenço-de-Oliveira R. 1994. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro.

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

Crews, S.T.; Thomas, J.B.; Goodman, C.S. 1988. The *Drosophila single-minded* gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the *per* gene product. **Cell** 52: 143– 151.

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

Davis G.K.; Patel N. H. 2002. Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation. **Ann Rev Entomol** 47: 669-99.

De Meillon, B.; W.W. Wirth. 1979. Sub-Saharan Ceratopogonidae (Diptera) II. Ceratopogonidae taken on flowers of avocado, *Persea americana*, in South Africa. *Ibid.*:187-189.

Dupont-Rouzeyrol M.; Caro V.; Guillaumot L.; Vazeille M.; D'Ortenzio E.; Thiberge J. M.; Baroux N.; Gourinat A. C.; Grandadam M.; Failloux A. B. 2012. Chikungunya virus and the mosquito vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific Region). **Vector Borne Zoonotic Dis** 12: 1036-41.

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

Farnesi, Luana. **Culicídeos vetores: diferenças e semelhanças fisiológicas e estruturais relacionadas ao processo de resistência dos ovos à dessecação**. 2014. 128 p. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/13047/1/luana_ferreira_ioc_dout_2014.pdf. Acesso em: 16 jan. 2018

Farnesi, L. C.; Barbosa, C. S.; Araripe, L. O.; Bruno, R. V. The influence of a light and dark cycle on the egg laying activity of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, p. 1-6, 2018.

Farnesi, L. C.; Martins, A. J.; Valle, D.; Rezende, G. L. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 124-126, 2009.

Farnesi, L. C.; Menna-Barreto, R. F. S.; Martins, A. J.; Valle, D.; Rezende, G. L. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: connection with distinct levels of resistance to desiccation. **Journal of Insect Physiology**, v. 83, p. 2-10, 2015.

Farnesi, L. C.; Vargas, H. C. M.; Valle, D.; Rezende, G. L. Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, p. e0006063, 2017.

Fonseca, R. N.; Gomes, H.; Araujo, H. M. Capítulo 2: Aspectos Morfofuncionais da Embriologia dos Artrópodes. In: **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. (Org.). <http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arthrolivro-1>, 2012. Cap. 2.

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

Gentile, C.; Rivas, G. B. S.; Meireles-Filho, A. C. A.; Lima, J. B. P.; Peixoto, A. A. Circadian Expression of Clock Genes in Two Mosquito Disease Vectors: *cry2* Is Different. **Journal of Biological Rhythms**, v. 24, p. 444-451, 2009.

Gentile C.; Rivas G. B. d S.; Lima J. B.; Bruno R. V.; Peixoto A. A. Circadian clock of *Aedes aegypti*: effects of blood-feeding, insemination and RNA interference. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2013;108:80–7.

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

Goltsev, Y.; Hsiong, W.; Lanzaro, G.; Levine, M. 2004. Different combinations of gap repressor for common stripes in *Anopheles* and *Drosophila* embryos. **Dev. Biol.** 275, 435–446.

Goltsev, Y.; Fuse, N.; Frasch, M.; Zinzen, R. P.; Lanzaro, G.; Levine, M. (2007). Evolution of the dorsal-ventral patterning network in the mosquito, *Anopheles gambiae*. **Development** 134, 2415-2424.

Goltsev, Y.; Rezende, G. L.; Vranizan, K.; Lanzaro, G.; Valle, D.; Levine, M. Developmental and evolutionary basis for drought tolerance of the *Anopheles gambiae* embryo. **Developmental Biology** (Print), v. 330, p. 462-470, 2009.

Grimaldi, D. E.; Engel, M. S. 2005. **Evolution of the insects**. Cambridge University Press.

Halberg, F. (1969). Chronobiology. **Annual Review of Physiology**, 31(1), 675–726. doi:10.1146/annurev.ph.31.030169.003331

Hamner K. C.; Finn J. C.; Sirohi G. S.; Hoshizaki T.; Carpenter B. H. (1962) The biological clock at the south pole. **Nature** 195:476-480.

Han, Q.; Li, G.; Li, J. 2000. Purification and characterization of chorion peroxidase from *Aedes aegypti* eggs. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 378, 107–115.

- Hao, H.; Allen, D. L.; Hardin, P. E. (1997). A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. **Mol. Cell. Biol.** 17, 3687–3693.
- Haugen, M.; Tomchaney, M.; Kast, K.; Flannery, E.; Clemons, A.; Jacowski, C.; Simanton Holland, W.; Le, C.; Severson, D.; Duman-Scheel, M. 2010. Whole-mount *in situ* hybridization for analysis of gene expression during *Aedes aegypti* development. **Cold Spring Harb Protoc.** <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot5509>.
- Hardin, P.E. 2011. Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. **Adv Genet.** 74, 141-73.
- Hinton, H. E. 1968. Observations on the biology and taxonomy of the egg of *Anopheles* mosquitoes. **Bull Entomol Res** 57: 495-508.
- Hood, S.; Amir, S. (2018) Biological Clocks and Rhythms of Anger and Aggression. **Front. Behav. Neurosci.** 12:4. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00004.
- Hopkins T. L.; Kramer K. J. (1992) Insect cuticle sclerotization. **Annu Ver Entomol** 37:273–302
- Houl J. H.; Ng F.; Taylor P.; Hardin P. E. (2008) CLOCK expression identifies developing circadian oscillator neurons in the brains of *Drosophila* embryos. **BMC Neurosci** 9:119.
- James A. A.; Ewer J.; Reddy P.; Hall J. C.; Rosbash M. Embryonic expression. of the period clock gene in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. **Embo J** 1986, 5(9):2313-2320.
- Johnson, C.H.; Elliott, J.A.; Foster, R. Entrainment of circadian programs. (2003) **Chronobiol Int.** 20,741-774.
- Jupp P. G.; McIntosh B. M.; Dos Santos I.; DeMoor P. 1981. Laboratory vector studies on six mosquito and one tick species with chikungunya virus. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 75:15-9.
- Kadener, S.; Stoleru, D.; McDonald, M.; Nawathean, P.; Rosbash, M. (2007) *Clockwork Orange* is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. **Genes Dev.** 21, 1675–1686.
- Kimelman, D.; Martin, B. L. Anterior-posterior patterning in early development: three strategies. Wiley interdisciplinary reviews. **Developmental biology**, v. 1, n. 2, p. 253–266, Apr. 2012.
- Kim, E. Y.; Ko, H. W.; Yu, W.; Hardin, P. E.; Edery, I. (2007). A DOUBLETIME kinase binding domain on the *Drosophila* PERIOD protein is essential for its hyperphosphorylation, transcriptional repression, and circadian clock function. **Mol. Cell. Biol.** 27, 5014–5028.
- Kloss B.; Price J.L.; Saez L.; Blau J.; Rothenfluh A.; Wesley C.S.; 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.; 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.; Benzer, S. (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 68,2112-2116.
- Lee, C.; Bae, K.; Edery, I. (1998) The *Drosophila* CLOCK protein undergoes daily rhythms in abundance, phosphorylation, and interactions with the PER-TIM complex. **Neuron** 21:857-867.

- Lee, C.; Bae, K.; Edery, I. (1999). PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a *Drosophila* CLOCK-CYC/dBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: A basis for circadian transcription. **Mol. Cell. Biol.** 19, 5316–5325.
- Leite G. L. D.; Nascimento, A. F. . Pragas de produtos armazenados. 2008. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - Tele-curso para o Projeto Telecentros para o Estado de Minas Gerais). Disponível em: https://halley.adm-serv.ufmg.br/ica/wp-content/uploads/2017/06/Pragas_de_produtos_armazenados.pdf. Acesso em: 22out.2018.
- Li, J.; Christensen B. M. 1993. Involvement of l-tyrosine and phenol oxidase in the tanning of *Aedes aegypti* eggs. *Insect Bioch Mol Biol* 23: 739-748.
- Li, J. 1994. Egg chorion tanning in *Aedes aegypti* mosquito. **Comp Biochem Physiol** 109A: 835-843.
- Li, J.; Hodgeman, B. A.; Christensen, B. M. Involvement of peroxidase in chorion hardening in *Aedes aegypti*. **Insect Biochem Mol Biol** 1996;26:309–317.
- Li, J. S.; Li, J. 2006. Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect Bioch Mol Biol** 36: 954-964.
- Lim, C.; Chung, B.Y.; Pitman, J.L.; McGill, J.J.; Pradhan, S.; Lee, J.; Keegan, K.P.; Choe, J.; 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.; Peixoto, A. A . Dengue Infection Increases the Locomotor Activity of *Aedes aegypti* Females. **Plos One**, v. 6, p. e17690, 2011.
- Liu, P. Z.; Kaufman, T. C. Short and long germ segmentation: unanswered questions in the evolution of a developmental mode. **Evolution & Development**, v. 7, n. 6, p. 629–646, Dec. 2005.
- Maciel-de-Freitas R.; Aguiar R.; Bruno R. V.; Guimaraes M. C.; Lourenco-de-Oliveira R.; Sorgine M. H.; Struchiner C. J.; Valle D.; O'Neill S. L.; Moreira L. A. 2012. Why do we need alternative tools to control mosquito-borne diseases in Latin America? **Mem Inst Oswaldo Cruz** 107: 828-9.
- Marques, N.; Menna-Barreto, L. (1999) **Cronobiologia: princípios e aplicações**, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Martinek, S.; Inonog, S.; Manoukian, A. S.; 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.; Houli, J.; Uno, K.D.; Kasukawa, T.; Dauwalder, B.; Itoh, T.Q.; Takahashi, K.; Ueda, R.; Hardin, P.E.; Tanimura, T.; 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.
- Miranda, J. E.; Rodrigues, S. M. M.; Albuquerque, F. A.; Silva, C. A. D.; Almeida, R. P.; Ramalho, F. S. **Guia de Identificação de Pragas do Algodoeiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2015
- Monnerat A. T.; Soares M. J.; Lima J. B. P.; Rosa-Freitas M. G.; Valle D. 1999. *Anopheles albitalis* eggs: ultrastructural analysis of chorion layers after permeabilization. **J Insect Physiol** 45: 915-922.
- Monnerat, A.T., Machado, M.P., Vale, B.S., Soares, M.J., Lima, J.B., Lenzi, H.L., Valle, D., 2002. *Anopheles albitalis* embryogenesis: morphological identification of major events. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 97, 589-596.

- Moore-Ede, M. C.; Sulzman F. M.; Fuller, C. A. (1982) The clocks that time us: physiology of the circadian timing system. **Harvard University Press**, Cambridge, England.
- Moretti, L.; Larsen, J. 1973. Embryology, Bionomics and Embryology of the Inland Floodwater Mosquito *Aedes vexans*. University of Illinois Press, Urbana.
- Moura, L. N. de; Silva, M. L. . Fundamentos evolutivos da ritmicidade biológica. In: Grauben Assis, Regina Brito e William Lee Martin. (Org.). **Estudos do Comportamento II**. Belém: EDUFPA, 2010, v. II, p. 157-176.
- Naidoo, N.; Song, W.; Hunter-Ensor, M.; Sehgal, A. (1999) A role for the proteasome in the light response of the *timeless* clock protein. **Science**. 285, 1737–1741.
- Nambu, J.R.; Franks, R.G.; Hu, S.; Crews, S.T. (1990). The *single-minded* gene of *Drosophila* is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells. **Cell** 63,63–75.
- Nambu, J. R.; Lewis, J. O.; Wharton, K. A.; Jr.; Crews, S.T. (1991). The *Drosophila single-minded* gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. **Cell** 67, 1157–1167.
- Nelson M. J. 1986. ***Aedes aegypti*: biologia y ecologia**. Organización Panamericana de la Salud, Washington, DC.
- Padilha, K. P.; Resck, M. E. B.; Cunha, O. A. T. DA; Teles-de-Freitas, R.; Campos, S. S.; Sorgine, M. H. F.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Farnesi, L. C.; Bruno, R. V. Zika infection decreases *Aedes aegypti* locomotor activity but does not influence egg production or viability. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, p. 1-6, 2018.
- Panfilio, K.A., 2008. Extraembryonic development in insects and the acrobatics of blastokinesis. **Dev. Biol.** 313, 471–491.
- Patel NH. Imaging neuronal subsets and other cell types in whole-mount *Drosophila* embryos and larvae using antibody probes. **Methods Cell Biol** 1994;44:445–487.
- Peschel N.; Chen K. F.; Szabo G.; Stanewsky R. 2009. Light-dependent interactions between the *Drosophila* circadian clock factors *cryptochrome*, *jetlag*, and *timeless*. **Curr Biol**. 19,241-7.
- Pittendrigh, C.S. (1993) Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. **Annual review of physiology**. 55,16-54.
- Price, J. L.; Blau, J.; Rothenfluh, A.; Abodeely, M.; Kloss, B.; Young, M.W. (1998) *doubletime* is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. **Cell**. 94, 83-95.
- 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.
- Raminani L. N.; Cupp E. W. 1975. Early embryology of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **International J Insect Morphol and Embryol** 4: 517-528.
- Raminani L. N.; Cupp E. W. 1978. Embryology of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae): organogenesis. **Int J Insect Morphol & Embryol** 7: 273-296.

Rezende G. L.; Martins A. J.; Gentile C.; Farnesi L. C.; Pelajo-Machado M.; Peixoto A. A.; Valle D. 2008. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. **BMC Dev Biol** 8: 82.

Rivas, G. B. S. Genética molecular dos ritmos circadianos em insetos vetores. **Revista da Biologia**, v. 9, p. 19-25, 2012.

Rivas, G. B. S.; Freitas, R. T.; Pavan, M. G.; Lima, J. B. P.; Peixoto, A. A.; Bruno, R. V. Effects of light and temperature on daily activity and clock gene expression in two mosquito disease vectors. **Journal of Biological Rhythms**, v. 33, p. 272-288, 2018.

Rocha, M. C. L. S. A. **Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento**. 1. ed. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2012. v. 1. 88p.

Ruppert, E. E.; Fox, R.S.; Barnes, R.D. 2005. **Zoologia dos Invertebrados**. 7ª ed. Editora Roca, São Paulo. 1145 p.

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

Santos, R. C. dos. **Estabelecimento do método de hibridização *in situ* para embriões de *Aedes aegypti***. 2018. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Produtos Bioativos e Biociências., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, 2018.

Saunders D. S. (2002) **Insect Clocks**. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science.

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

Silva, A. B.; Brito, J. M. Controle biológico de insetos-pragas e suas perspectivas para o futuro. **Agropecuária Técnica (UFPB)**, v. 36, p. 248-258, 2015.

Slifer, E. H. Removing the shell from living grasshopper eggs. **Science**, 102, 282 (1945).

Snodgrass, R. E. (1935) **Principles of Insect Morphology**, 4th edn, McGraw-Hill Book Company, New York and London.

Soria, S.; P.G. Bystrak. 1975. A new species of *Forcipomyia* (Diptera, Ceratopogonidae) described in all stages, with an account of its role as a cacao pollinator. **Revista Theobroma (Brasil)** 5(2): 3-11.

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

Stanewsky, R.; Kaneko, M.; Emery, P.; Beretta, B.; Wager-Smith, K.; Kay, S.A.; Rosbash, M.; 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.

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

Teles-de-Freitas, Rayane. **A influência dos ciclos de temperatura na sincronização do relógio circadiano e amplitude de atividade do mosquito *Aedes aegypti***. 2015. 94 f. Dissertação

(Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/12911/1/rayane_freitas_ioc_mest_2015.pdf>. Acesso em: 30 set. 2017.

Thomas J. B.; Crews S.T.; Goodman C.S. Molecular genetics of the *single-minded* locus: a gene involved in the development of the *Drosophila* nervous system. **Cell**. 1987; 52.

Trpis, M. 1970. A new bleaching and decalcifying method for general use in zoology. **Can. J. Zool** 48: 892-893.

Valle D.; Monnerat A. T.; Soares, M. J.; Rosa-Freitas M. G.; Pelajo-Machado M., Vale B. S.; Lenzi H. L.; Galler R.; Lima J. B. P. 1999. Mosquito embryos and eggs: polarity and terminology of chorionic layers. **J Insect Physiol** 45: 701-708.

Vargas, H. C. M.; Farnesi, L. C.; Martins, A. J.; Valle, D.; Rezende, G. L. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 62, p. S0022-1910(14)0, 2014.

Vital, W.; Rezende, G.; Abreu, L.; Moraes, J.; Lemos, F. J. A.; Vaz, I.; Logullo, C. Germ band retraction as a landmark in glucose metabolism during *Aedes aegypti* embryogenesis. **BMC Developmental Biology** (Online), v. 10, p. 25, 2010.

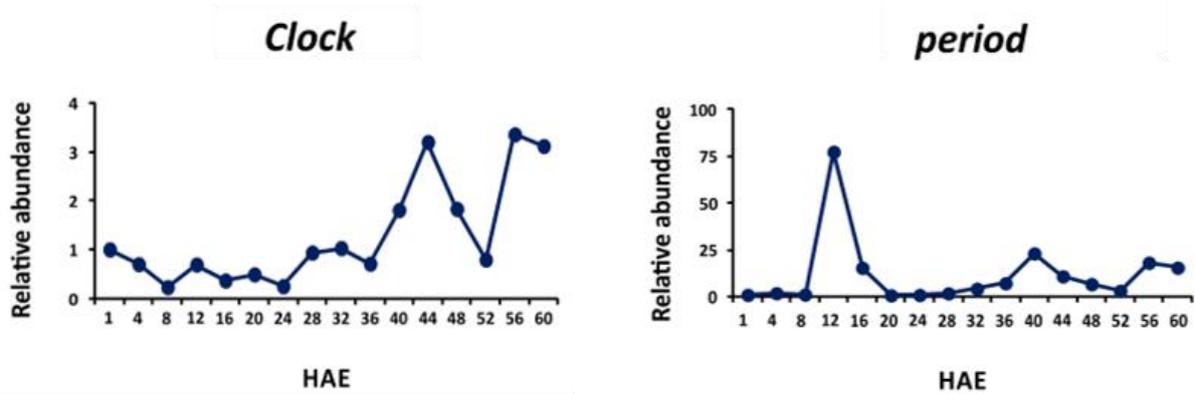
Yu, W.; Zheng, H.; Hou, J. H.; Dauwalder, B.; Hardin, P. E. (2006). PER-dependent rhythms in CLK phosphorylation and E-box binding regulate circadian transcription. **Genes Dev**. 20, 723–733.

Wirth, W.W.; W.T. Waugh. 1976. Five new Neotropical *Dasyhelea* midges (Diptera: Ceratopogonidae) associated with culture of Cocoa. **Studia Entomologica** 19:223-236.

Wigglesworth, V. B. (1950) **The principles of Insect Physiology**, 4th edn, Methuen, London.

Wolpert, L.; Tickle, C. 2011. **Principles of development**, Oxford University Press, Oxford New York.

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

ANEXO A – Resultados preliminares de RT-qPCR de *clock* e *period*

Expressão gênica de abundância relativa dos genes de relógio *period* e *Clock* em *Aedes aegypti*, evidenciando a expressão cronológica ao longo do desenvolvimento embrionário do mosquito, realizado a 28°C, em ciclos de claro e escuro 12:12h. Fonte: Dados não publicados do LABIMI/IOC. Autoria: Rafaela Vieira Bruno.

ANEXO B – Protocolo das soluções utilizadas**Millonig**

100 ml Formaldeído a 37% - C_F [3,7%]
800 ml H₂O milli-Q
18,6 g Fosfato de Sódio Monobásico (NaH₂PO₄) - [155mM]
4,2 g Hidróxido de Sódio (NaOH) - [105mM]
H₂O Milli-Q avolumar para 1 litro

TRPIS

0,335 g Clorito de Sódio (NaClO₂) - [3,7mM]
8,7 ml de Ácido Acético Glacial
H₂O milli-Q quantidade suficiente para 100 ml

SSC 20x

17,53g Cloreto de Sódio (NaCl) - [3M]
8,82g Citrato de sódio - [0,3M]
H₂O milli-Q quantidade suficiente para 100 ml

Solução de Hibridização com DNA Esperma de Salmão – Hyb Buffer (5 ml)

2,5 ml Formamida 100% - C_F [50%]
1,25 ml SSC 20x - C_F [5x]
1,0 µl DNA Esperma de salmão - C_F [100 µg/ml]
125 µl Heparina - C_F [50 µg/ml]
50 µl Tween-20 - C_F [1%]
Completar com H₂O milli-Q quantidade suficiente para 5 ml

Staining buffer (Tampão-AP)

TRIS 1M – 1ml [100 mM]
MgCl₂ 1M – 500 µl [50 mM]
NaCl 3M - 320µl [960 mM]
Tween-20 a 20% - 100µl [1%]
H₂O milli-Q quantidade suficiente para 10ml

PBS (Phosphate Buffered Saline) – 1X

800 ml de H₂O milli-Q
8g de NaCl - [137 mM]
0,2g de KCl - [2,7 mM]
1,44g de Na₂HPO₄ - [10 mM]
0,24g de KH₂PO₄ - [2 mM]
Avolumar solução para 1 litro

PBST (Phosphate Buffered Saline + 0,05% Tween-20): 50 µl de Tween-20 puro para 100ml
PBS 1X

PBST (Phosphate Buffered Saline + 0,1% Tween-20): 100 µl de Tween-20 puro para 100ml
PBS 1X

ANEXO C – Protocolo para remoção das cascas dos ovos de *Aedes aegypti*
(12 HAOs)

1. Oviposição sincronizada durante 45 minutos
2. Coleta dos ovos (entre 11-12 horas)
3. Adicionar 1 ml de Trpis por 10 minutos.
4. Lavar os embriões 3x com H₂O Milli-Q, com spin entre as lavagens (utilizamos as curtas centrifugações em baixa rotação – 4800 rpm)
5. Adicionar mistura de 500 µl de PBS 1x + formaldeído 9% e 500 µl heptano a -80°C, vortexar por 1 minuto e deixar sob agitação por 1 hora.
6. Retirar a fase inferior (aquosa) e adicionar 700 µl de metanol resfriado a -80°C. Vortexar por 1 minuto.
7. Retirar toda a solução e lavar 3x com metanol.
8. Reidratar os embriões em PBS 1x + Metanol (1:1) e depois 100% PBS 1x
9. Retirar o PBS 1x e adicionar 1 ml de Millonig e deixar fixando por 20 minutos sob agitação.
10. Retirar o fixador e lavar os embriões 3x com PBS 1x
11. Lavar os embriões com hipoclorito de sódio 50% (v/v) diluído em H₂O Milli-Q por 2 minutos e 40 segundos.
12. Lavar 3x com PBST 1x (0,05% Tween-20) com spin (centrifugação em baixa rotação – 4800 rpm)
13. Armazenar em geladeira em PBS 1x.

ANEXO D – Protocolo para remoção das cascas dos ovos de *Aedes aegypti*
(24 HAOs)

1. Oviposição sincronizada durante 45 minutos
2. Coleta dos ovos (entre 23-24 horas)
3. Adicionar 1 ml de Trpis por 5 minutos.
4. Lavar os embriões 3x com H₂O Milli-Q, com spin entre as lavagens (utilizamos as curtas centrifugações em baixa rotação – 4800 rpm)
5. Adicionar mistura de 500 µl de PBS 1x + formaldeído 9% e 500 µl heptano a temperatura ambiente (25°C), e deixar sob agitação por 1 hora.
6. Retirar a fase inferior (aquosa) e adicionar 500 µl de H₂O Milli-Q fervente. Vortexar por 1 minuto.
7. Retirar a fase inferior (aquosa) e adicionar 700 µl de metanol resfriado a -80°C. Vortexar por 1 minuto.
8. Retirar toda a solução e lavar 3x com metanol.
9. Reidratar os embriões em PBS 1x + Metanol (1:1) e depois 100% PBS 1x
10. Retirar o PBS 1x e adicionar 1 ml de Millonig e deixar fixando por 20 minutos sob agitação.
11. Retirar o fixador e lavar os embriões 3x com PBS 1x
12. Lavar os embriões com hipoclorito de sódio 50% (v/v) diluído em H₂O Milli-Q por 1 minuto e 20 segundos.
13. Lavar 3x com PBST 1x (0,05% Tween-20) com spin (centrifugação em baixa rotação – 4800 rpm)
14. Armazenar em geladeira em PBS 1x.

ANEXO E – Testes de Hibridização *in situ* realizados

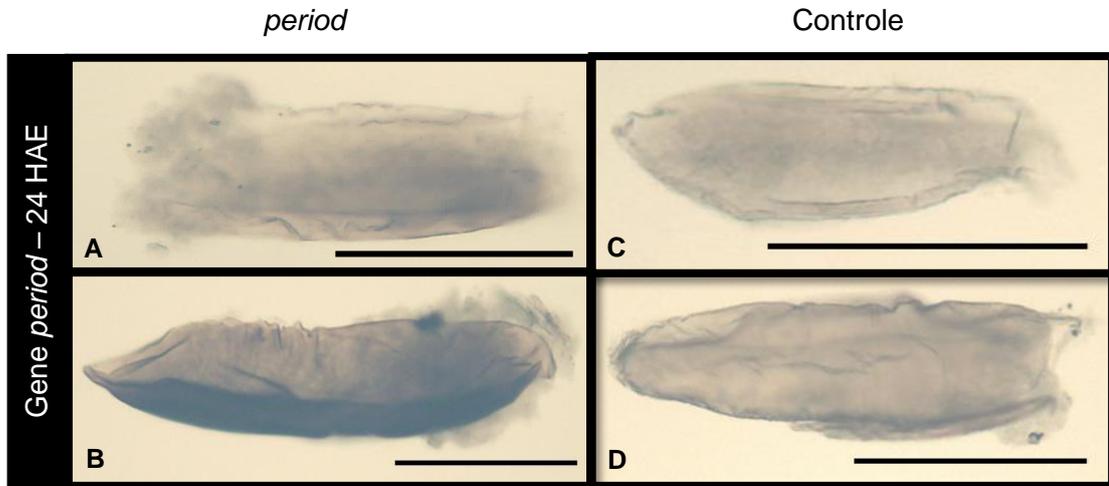


Figura I: Hibridização *in situ* para *period* em embriões 24 HAOs no protocolo de remoção das cascas dos ovos antes dos ajustes, com 1 minuto e 20 segundos de exposição em 50% NaClO (v/v), mostrando grande parte do córion ainda remanescente (A, B, D), e com extrusão do conteúdo, sem marcação para *period* (A-B). Sonda controle (C-D). Barra de escala: 500µm. Aumento de 100x.

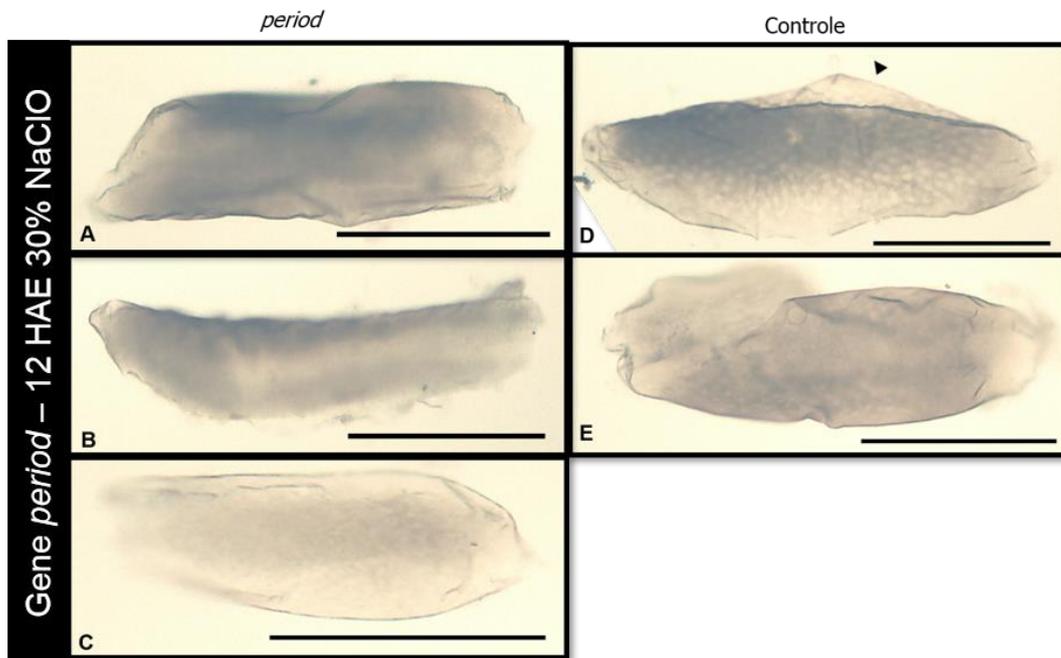


Figura II: Hibridização *in situ* para *period* em embriões de 12 HAOs, com 1 minuto e 20 segundos de exposição em 30% NaClO (v/v), mostrando grande parte remanescente da casca dos ovos (A,B,D,E) que não foi removida com sucesso, não sendo possível observar expressão de *period* nesta idade (A-C). Sonda controle (D-E). Barra de escala: 500µm. Aumento de 100x.

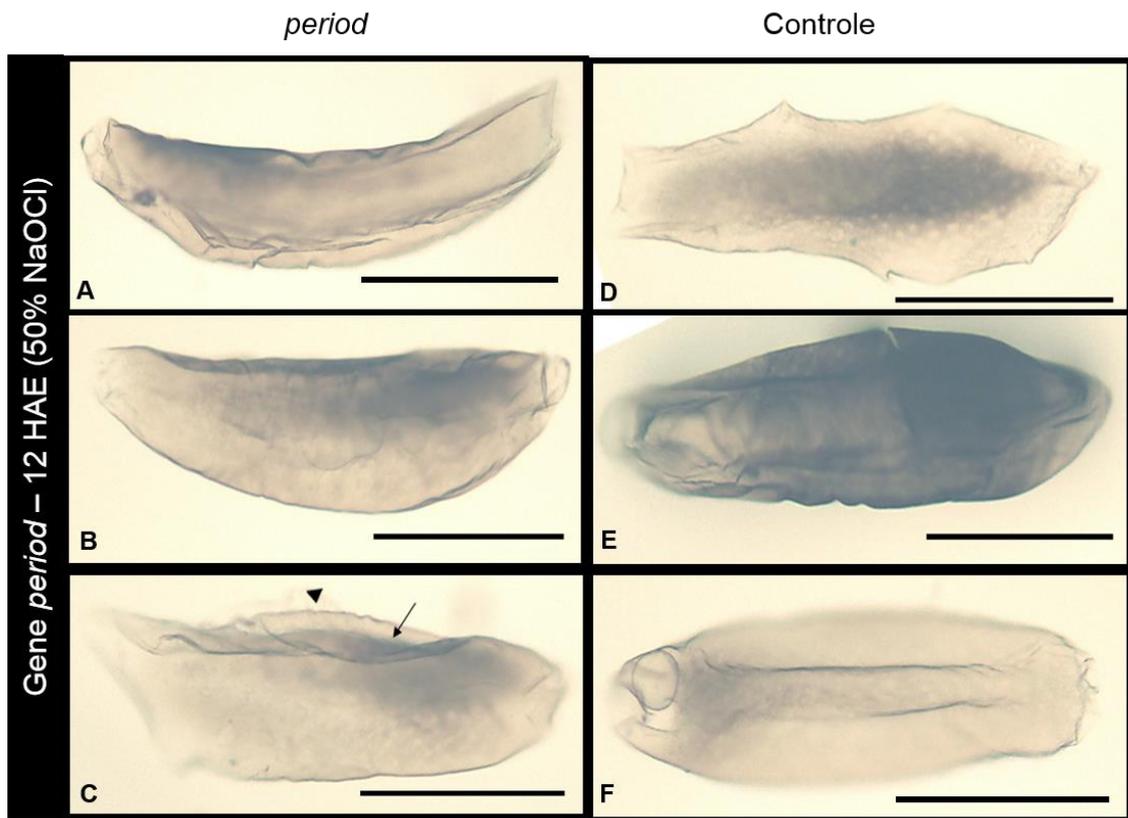


Figura III: Hibridização in situ para *period* em embriões 12 HAOs com 1 minuto e 20 segundos de exposição em 50% NaClO (v/v), mostrando grande parte do córion ainda remanescente (A, B, E), sem sucesso para marcação para *period* (A-C). Sonda controle (D-F). Barra de escala: 500 μ m. Aumento de 100x.