



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANDRESA BORGES DE ARAUJO FONSECA

Caracterização do perfil de expressão dos genes de relógio circadiano em células da linhagem Aag2 de *Aedes aegypti* infectadas e não infectadas pelo vírus Dengue 2 (DENV2)

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

Orientadora: Dra. Rafaela Vieira Bruno

Rio de Janeiro,

2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: ANDRESA BORGES DE ARAUJO FONSECA

Orientadora: Dra. Rafaela Vieira Bruno

Aprovada em: 16/08/2019

Examinadores:

Dra. Yara Maria Traub-Cseko – Presidente da banca examinadora
FIOCRUZ/ Instituto Oswaldo Cruz

Dra. Samira Chahad-Ehlers
UFSCar/ Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Dra. Débora Ferreira Barreto
FIOCRUZ/ Instituto Oswaldo Cruz

Dra. Gabriela de Oliveira Paiva e Silva
UFRJ/ Instituto de Bioquímica Médica

Dra. Simone Morais da Costa
FIOCRUZ/ Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro, 16 de agosto de 2019

Fonseca, Andresa Borges de Araujo .

Caracterização do perfil de expressão dos genes de relógio circadiano em células da linhagem Aag2 de *Aedes aegypti* infectadas e não infectadas pelo vírus Dengue 2 (DENV2) / Andresa Borges de Araujo Fonseca. - Rio de janeiro, 2019.

xvii, 76f f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientadora: Rafaela Vieira Bruno.

Bibliografia: f. 66-75

1. Relógio circadiano. 2. Células Aag2. 3. *Aedes aegypti* . 4. Dengue. I. Título.

Dedico essa dissertação aos meus pais
Alvina Borges e Alúísio Fonseca. E ao meu
tio José Carlos Borges de Araujo (*in
memoriam*).



Laboratório de Biologia Molecular de Insetos

Instituto Oswaldo Cruz

Fundação Oswaldo Cruz

APOIO:



Instituto Nacional de
Ciência e Tecnologia em
Entomologia Molecular



A persistência é o caminho do êxito.

Charles Chaplin

ÍNDICE

I – AGRADECIMENTOS	ix
II – LISTA DE FIGURAS	xi
III – LISTA DE TABELAS	xiii
IV – LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiv
V – RESUMO	xvi
VI – ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O Relógio Circadiano	1
1.2 Bases moleculares do relógio circadiano: <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo	2
1.2.1 Primeira alça regulatória do relógio circadiano em <i>D. melanogaster</i>	4
1.2.2 Segunda e terceira alças regulatórias do relógio circadiano em <i>D. melanogaster</i>	7
1.3 Relógio circadiano em insetos não modelos	9
1.3.1 O relógio de <i>Aedes aegypti</i>	9
1.3.2 O Vírus Dengue e a modulação do relógio em <i>Aedes aegypti</i>	13
1.3.3 <i>Danaus plexippus</i>	15
1.4 Estudo do relógio circadiano em cultura de células de insetos	17
1.5 Linhagem celular Aag2 de <i>Aedes aegypti</i>	20
1.6 Justificativa	20
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Cultura de células	23
3.2 Coleta dos pontos	23
3.3 Extração e quantificação do RNA	24
3.4 Síntese de cDNA	25
3.5 Reações de PCR para avaliação da presença dos genes de relógio em células Aag2	25
3.6 Eletroforese em gel de agarose	27

3.7 Análise da expressão gênica circadiana por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	27
3.8 Infecção das células pelo DENV2	30
3.8.1 Padronização da infecção nas células pelo DENV2.....	30
3.8.2 Protocolo de infecção.....	33
3.8.3 Imunofluorescência indireta para detecção de células infectadas pelo DENV2	34
3.8.4 Citometria de fluxo para quantificar a porcentagem de células infectadas pelo DENV2.	34
3.9 Análise estatística	35
4 – RESULTADOS	36
4.1 Perfil de expressão dos genes de relógio em células Aag2 mantidas em LD12:12	37
4.2 Perfil de expressão dos genes de relógio em células Aag2 mantidas em DD.....	42
4.3 Padronização da infecção das células Aag2 pelo DENV2	45
4.4 Perfil de expressão dos genes de relógio em células infectadas pelo DENV2 em LD12:12.....	54
5 – DISCUSSÃO	58
6 – CONCLUSÕES	64
7 – PERSPECTIVAS.....	65
8 – REFERÊNCIAS.....	66
ANEXO I - Lista de tampões usados na dissertação.....	76

I – AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ser meu amparo e força, não permitindo que eu desistisse, mesmo diante de todas as dificuldades pelas quais passei durante esses dois anos. À Nossa Senhora da Conceição e Santa Teresinha do menino Jesus por toda intercessão e cuidado comigo.

A minha mãe, Alvina Borges. Palavras nunca descreverão o quanto eu sou grata por tudo que você fez e faz por mim. Muito obrigada por estar comigo em todos os momentos, principalmente nesse último ano hein! Não estaria terminando o mestrado se não fosse o seu incentivo e motivação para que eu não desistisse diante de todos os problemas pessoais pelos quais passei. Amo você!

Ao meu pai, Aluísio Fonseca, por sempre confiar em mim, e estar disposto a me ajudar no que fosse preciso para que eu concluísse o mestrado. Obrigada por todo investimento na minha educação.

Aos meus irmãos, Alexandre e Alex, por estarem sempre me botando pra cima e me apoiando quando eu mais preciso. Ah, e até mesmo me ajudando com gráficos né Alexandre? Quantas mensagens do tipo: “Não tô conseguindo configurar isso aqui, me ajuda!!” eu já não mandei... Muito obrigada pela parceria.

Aos meus familiares próximos, que estão sempre rezando e torcendo por mim e pela minha vitória. Tio Antônio, Tia Rita, minha prima-irmã Fabyulla, minha prima e madrinha querida Kamylla e Tia Creuza. Também gostaria de deixar meu agradecimento ao meu querido tio José Carlos (*in memoriam*), mas que cresci chamando de tio Cacau. Você sempre me incentivou a estudar e buscar conhecimento, porque é assim que se vence na vida. Espero que você esteja feliz me vendo terminar este ciclo. Você faz muita falta na vida da nossa família.

À minha querida orientadora, Dra. Rafaela Bruno, mas que carinhosamente chamo de Rafa. Muito obrigada por ter me aceitado no laboratório e por toda confiança depositada em mim. Eu com meu jeito desesperado de ser e você com sua tranquilidade. Acho que foi a combinação perfeita para que conseguíssemos tocar o

projeto. Admiro muito a sua competência e a profissional que você é. Fico feliz que no doutorado manteremos nossa parceria. E claro, muito obrigada por sua amizade.

À toda equipe LABIMI: Luciana, Jéssica, Duda, Aline, Robão, Lourdinha, Rayane, Gabi, Letícia, Luana e Karine. Fui tão bem acolhida quando cheguei. Obrigada a todos pelos ensinamentos, seja na bancada, ou até mesmo na discussão de artigos e apresentação de seminários.

À Dra. Ada Alves, pela colaboração estabelecida para que esse projeto fosse realizado.

À Dra. Simone Costa. Muito obrigada pela paciência em me ensinar e ajudar incansavelmente durante a realização dos experimentos com infecção. E também por ter aceitado revisar esta dissertação.

À Paolla Beatriz e aos outros membros do LABFIV por serem sempre solícitos quando eu precisava de alguma ajuda durante a realização dos meus experimentos.

À minha amiga e irmã, Thayná Brito. Como posso te agradecer por todos os momentos que você esteve comigo? Por todo carinho e amor quando eu mais precisei? Obrigada por sempre me botar pra cima, por ter ficado mais feliz que eu quando soube que eu havia passado no mestrado e agora no doutorado. Se eu estou concluindo o mestrado, com certeza você foi mais que essencial para que isso acontecesse. Obrigada, mil vezes obrigada!

Aos meus amigos: Carol, Amanda, Brenda, Ohany, Rafa, Newman, Capixaba, Trintrim, Bernardo, Baiano, João Pedro, Henrique e Yago. Talvez vocês não tenham noção do quanto foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Mas do que entender que as vezes eu não podia sair ou estar junto porque tinha que estudar, vocês estiveram e estão comigo durante uma fase muito difícil da minha vida pessoal. Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

II – LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Representação do experimento realizado por de Mairan.....	1
Figura 1.2: Representação do experimento de atividade locomotora em escuro constante dos mutantes para o gene <i>per</i> em <i>D. melanogaster</i>	3
Figura 1.3: Representação da primeira alça do relógio em <i>D. melanogaster</i>	5
Figura 1.4: A luz como sincronizador ambiental do relógio.	6
Figura 1.5: Representação da segunda e terceira alças do relógio em <i>D. melanogaster</i>	8
Figura 1.6: Expressão circadiana de genes do relógio em cabeça de fêmeas virgens dos mosquitos <i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> por PCR quantitativo em tempo real.	10
Figura 1.7: Expressão circadiana de genes do relógio em cabeça de fêmeas dos mosquitos <i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> por PCR quantitativo em tempo real.	12
Figura 1.8: Atividade locomotora de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> infectadas e não infectadas pelo DENV2..	14
Figura 1.9: Expressão dos genes de relógio em cabeças de borboletas monarcas.	15
Figura 1.10: Modelo de regulação da primeira alça do relógio proposto para <i>Danaus plexippus</i>	16
Figura 1.11: Expressão dos genes de relógio em células embrionárias DpN1..	18
Figura 1.12: O <i>knockdown</i> de <i>cry2</i> torna <i>per</i> arritmico nas células DpN1	19
Figura 3.1: Representação de uma lâmina Nunc™ Lab-Tek™	31
Figura 4.1: Avaliação da presença dos genes de relógio em células Aag2 através de RT- PCR por eletroforese em gel de agarose 2,5%.....	36
Figura 4.2: Expressão diária do gene <i>per</i> em células Aag2 por PCR quantitativo em tempo real em LD12:12.	38
Figura 4.3: Expressão diária dos genes <i>tim</i> , <i>cry1</i> , <i>cry2</i> , <i>Clk</i> e <i>cyc</i> em células Aag2 por PCR quantitativo em tempo real em LD12:12.	39

Figura 4.4: Expressão diária dos genes <i>vri</i> , <i>pdp1</i> , <i>E75</i> e <i>cwo</i> em células Aag2 por PCR quantitativo em tempo real em LD12:12.	40
Figura 4.5: Expressão circadiana dos genes <i>per</i> , <i>tim</i> , <i>cry1</i> e <i>cry2</i> por PCR quantitativo em tempo real em DD.	42
Figura 4.6: Expressão circadiana dos genes <i>vri</i> , <i>pdp1</i> , <i>Clk</i> , <i>cyc</i> , <i>E75</i> e <i>cwo</i> por PCR quantitativo em tempo real em DD.	43
Figura 4.7: 4x10 ⁴ células infectadas com a cepa 44/2 e analisadas por microscopia de fluorescência.	46
Figura 4.8: 4x10 ⁴ células infectadas com a cepa NGC e analisadas por microscopia de fluorescência..	47
Figura 4.9: 4x10 ⁴ células infectadas com a cepa BR/RJ66985/2000 e analisadas por microscopia de fluorescência	48
Figura 4.10: 3x10 ⁴ células infectadas com a cepa BR/RJ66985/2000 e analisadas por microscopia de fluorescência	51
Figura 4.11: 4x10 ⁴ células infectadas com a cepa BR/RJ66985/2000 e analisadas por microscopia de fluorescência	52
Figura 4.12: Citometria de fluxo para avaliar a porcentagem de células infectadas pelo DENV2.	53
Figura 4.13: Expressão diária dos genes <i>per</i> , <i>tim</i> , <i>cry1</i> e <i>cry2</i> em células Aag2 infectadas e não infectadas (controles negativos) pelo DENV2 por PCR quantitativo em tempo real em LD12:12.....	55
Figura 4.14: Expressão diária dos genes <i>vri</i> , <i>Pdp1</i> , <i>Clk</i> , <i>cyc</i> , <i>E75</i> e <i>cwo</i> em células Aag2 infectadas e não infectadas (controles negativos) pelo DENV2 por PCR quantitativo em tempo real em LD12:12.....	56

III – LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Concentração e volume final de cada reagente para a síntese de cDNA para cada amostra	25
Tabela 3.2: Temperatura de anelamento dos primers para cada gene de relógio na reação de PCR.....	26
Tabela 3.3: Concentração e volume final dos componentes do mix de reação de PCR para cada poço.....	26
Tabela 3.4: Concentração e volume final dos componentes do mix de reação do qPCR dos genes de relógio para cada poço....	27
Tabela 3.5: Genes e <i>primers</i> usados para análise quantitativa por PCR em Tempo Real dos genes de relógio em células Aag2....	29
Tabela 3.6: Quantidade de células plaqueadas na Nunc™ Lab-Tek™ e os respectivos volumes de vírus DENV2 cepa BR/RJ66985/2000 durante a padronização dos experimentos de infecção.....	32
Tabela 3.7: Quantidade de células repicadas nas placas de Petri e os respectivos volumes de vírus DENV2 cepa BR/RJ66985/2000 durante a padronização dos experimentos de infecção.....	33
Tabela 4.1: Análise de variância (ANOVA One-Way) da expressão diária dos genes de relógio nas células Aag2 de <i>Ae. aegypti</i> em LD12:12.....	41
Tabela 4.2: Análise de variância (ANOVA One-Way) da expressão circadiana de genes do relógio nas células Aag2 de <i>Ae. aegypti</i> em DD.....	44
Tabela 4.3: Análise de variância (ANOVA One-Way) da expressão diária dos genes de relógio nas células Aag2 de <i>Ae. aegypti</i> em LD12:12 infectadas pelo DENV2.....	57
Tabela 4.4: Análise de variância (ANOVA One-Way) da expressão diária dos genes de relógio nas células Aag2 de <i>Ae. aegypti</i> não infectadas (controles) em LD12:12.....	57

IV – LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BSA = do inglês *Bovine Serum Albumin* (Albumina Bovina Sérica).

CDC = do inglês *Centers for Disease Control*.

cDNA = do inglês *complementar Desoxiribonucleic Acid* (sequência complementar de DNA).

CK2 = proteína CASEIN KINASE 2.

Clk = gene *Clock*.

CLK = proteína CLOCK.

cry = gene *cryptochrome*.

CRY = proteína CRYPTOCHROME.

cry2 = gene *cryptochrome 2*.

CRY2 = proteína CRYPTOCHROME 2.

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

C_T = do inglês *cycle threshold*.

cwo = gene *clockwork orange*.

CWO = proteína CLOCKWORK ORANGE.

cyc = gene *cycle*.

CYC = proteína CYCLE.

DBT = proteína DOUBLETIME.

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

E75 = gene *Ecdysone-induced protein 75*.

E75 = proteína ECDYSONE-INDUCED PROTEIN 75.

E-box = *Enhancer Box*.

EDTA = do inglês *EthyleneDiamine Tetraacetic Acid* (Ácido etilenodiaminotetracético).

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

LiCl = Cloreto de Lítio.

mRNA = RNA mensageiro.

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

PBS = do inglês *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato Salino).

PCR = do inglês *polimerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase).

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

Pdp1 = gene *PAR domain protein 1*.

PDP1 = proteína PAR DOMAIN PROTEIN 1.

PDP1 ϵ/δ = isoformas ϵ e δ da proteína PAR DOMAIN PROTEIN 1.

per = gene *period*.

PER = proteína PERIOD.

qPCR = do inglês *quantitative polimerase chain reaction*. (PCR quantitativo em tempo real).

RT-PCR = do inglês *reverse transcription-polymerase chain reaction*.

S2 = Meio de cultura Schneider.

SFB = Soro fetal bovino.

SGG = proteína SHAGGY.

TCID₅₀ = do inglês *Tissue Culture Infectious Dose*.

tim = gene *timeless*.

TIM = proteína TIMELESS.

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

vri = gene *vrille*.

VRI = proteína VRILLE.

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

V – RESUMO

Aedes aegypti (Diptera:Culicidae) é um mosquito vetor de diversos patógenos causadores de doenças importantes como Zika e dengue. Aspectos do comportamento dos mosquitos têm papel importante na dinâmica das doenças transmitidas por eles e, por isso, uma área particularmente relevante é o estudo dos ritmos circadianos. Apesar da sua importância médica, pouco sabemos sobre o controle molecular dos ritmos circadianos de mosquitos. Os genes de relógio já são descritos em mosquito, porém ainda não se sabe como esses genes interagem entre si. A caracterização funcional dos genes nos indivíduos torna-se especialmente difícil devido à falta de ferramentas genéticas tais como aquelas disponíveis no modelo *Drosophila melanogaster*. A fim de entendermos como os genes de relógio funcionam, procuramos estabelecer o modelo de cultura de células para o estudo circadiano. Vimos que a linhagem celular embrionária Aag2 de *Ae. aegypti* expressa os principais genes de relógio e estudos anteriores demonstraram que esta linhagem constitui um bom modelo para estudos imunológicos por responderem de forma semelhante ao que ocorre no mosquito. Deste modo, caracterizamos o perfil de expressão circadiana dos genes de relógio na linhagem Aag2 por PCR quantitativo em tempo real em células não infectadas em diferentes fotoperíodos (claro/escuro – LD12:12 e escuro constante – DD) e em células infectadas com DENV2 em LD12:12. Dos dez genes de relógio analisados, apenas *per* apresentou um perfil de expressão cíclico nessas células, no regime de LD12:12. Já em DD, todos os genes apresentaram um perfil arritmico de expressão, sugerindo então que o *Zeitgeber* luz é um importante sincronizador ambiental do relógio para essas células. Durante a padronização da infecção pelo DENV2, vimos que a ausência de soro no meio de cultura, necessário para a realização da infecção é prejudicial, pois há uma redução no número de células da cultura. Por fim, em células infectadas com DENV2 vimos que nenhum gene apresentou um perfil de expressão cíclico, o que nos sugere que para as células Aag2 talvez seja necessária a sincronização do ciclo celular, para que haja um perfil de ciclagem, tal como ocorre em células de mamíferos quando sincronizadas.

VI – ABSTRACT

Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) is a mosquito vector of several pathogens that cause important diseases such as Zika and dengue. Aspects of mosquitoes behavior play an important role in the dynamics of the diseases transmitted by them. Therefore, a particularly relevant area is the study of the circadian rhythms. Despite their medical importance, we don't know much about the molecular control of circadian rhythms of mosquitoes. Clock genes are already described in the mosquito, but it is not yet known how these genes interact with each other. Functional characterization of genes in individuals is especially difficult because of the lack of genetic tools such as those available in the *Drosophila melanogaster* model. In order to understand how clock genes work, we sought to establish the cell culture model for the circadian study. We have seen that the embryonic cell line Aag-2 of *Ae. aegypti* expresses the major clock genes, and previous studies have shown that this cell lineage is a good model for immunological studies because they respond in a similar way to what occurs in the mosquito. Thus, we characterized the circadian expression profile of the clock genes in the Aag-2 lineage by quantitative real-time PCR in uninfected cells in different photoperiods (light/dark - LD12:12 and constant darkness - DD) and in infected cells with DENV2 in LD12:12. Of the ten clock genes analyzed, only *per* showed a cyclic expression profile in these cells in the LD12:12 photoperiod. In DD all the genes presented an arrhythmic expression profile, suggesting then that the *Zeitgeber* light is an important environmental clock synchronizer for these cells. During standardization of infection by DENV2, we have seen that the absence of serum in the culture medium required to perform the infection is detrimental as there is a reduction in the number of cells in the culture. Finally, in cells infected with DENV2, we observed that no gene had a cyclic expression profile, suggesting that for Aag2 cells, cell cycle synchronization may be necessary to occur a cycling profile, as it does in mammalian cells when synchronized.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Relógio Circadiano

A partir do surgimento da vida na Terra, os seres vivos foram submetidos a ciclos diários de luz e temperatura, devido ao movimento de rotação que o planeta faz em torno do seu próprio eixo. Deste modo, os organismos desenvolveram oscilações diárias na sua fisiologia e comportamento com um período de aproximadamente 24 horas, denominados de “ritmos circadianos” (do latim *circa* = cerca e *diem* = dia) (Moore-Ede *et al*, 1982; Marques & Menna-Barreto, 2003).

Estudiosos desde a antiguidade já sugeriam a importância desses ritmos. Entretanto, em 1729 o astrônomo francês Jean Jacques d'Ortois de Mairan observou o primeiro indício do caráter endógeno do ritmo circadiano ao analisar o comportamento da planta *Mimosa pudica* (“dormideira”). Ele viu que esta planta abria suas folhas durante o dia e fechava durante noite. Assim, de Mairan submeteu essa planta à ausência completa de luz e observou que, mesmo sem o estímulo luminoso, a *Mimosa pudica* mantinha o mesmo comportamento, indicando então que havia uma ritmicidade endógena de abertura e fechamento das folhas, independente do estímulo ambiental (Moore-Ede *et al*, 1982; Marques & Menna-Barreto, 2003) (Figura1.1).



Figura 1.1: Representação do experimento realizado por de Mairan. Espécimes de *Mimosa pudica* foram mantidas em luz natural e em escuro completo (dentro das caixas). Ele observou que, mesmo sem a luz, as plantas continuavam abrindo as suas folhas durante o dia subjetivo e as fechando durante a noite subjetiva (Fonte: Amoretty *et al*, 2013).

A ritmicidade que persiste mesmo na ausência de indicadores ambientais - sendo chamada de “persistência em livre – curso” - foi considerada a primeira propriedade do relógio circadiano (Moore-Ede *et al*, 1982; Marques e Menna-Barreto, 2003; revisado em Bruno *et al*, 2012).

Entretanto, a sincronização do relógio endógeno é feita através de fatores ambientais externos (como por exemplo, luz e temperatura). Esta condição é chamada de “arrastamento” do relógio, sendo caracterizada como a segunda propriedade do relógio circadiano (Moore-Ede *et al*, 1982; Pittendrigh, 1993). Os indicadores ambientais que promovem a sincronização do relógio, foram chamados de *Zeitgebers* (do alemão: “doador de tempo”), tendo como principal função, ajustar o ritmo em livre-curso e manter o período do ritmo em exatas 24 horas (Moore-Ede *et al*, 1982; Marques e Menna-Barreto, 2003; revisado em Bruno *et al*, 2012).

A terceira e última propriedade do relógio circadiano foi estabelecida através das contribuições do pesquisador Colin Pittendrigh nas décadas de 50 e 60 utilizando a mosca *Drosophila pseudoobscura*. Ele observou que o período de eclosão desta mosca, que geralmente ocorre pela manhã em condições normais, não era alterado em escuro constante mesmo quando a temperatura era diminuída em 10°C (Pittendrigh, 1954). Esta propriedade ficou conhecida como “termo compensação”, ou seja, o período em livre curso do relógio circadiano permanece uniforme mesmo em diferentes temperaturas constantes, dentro da faixa que é permissiva para a fisiologia de cada espécie (Moore-Ede *et al*, 1982; Johnson *et al*, 2003; revisado em Bruno *et al*, 2012).

1.2 Bases moleculares do relógio circadiano: *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

Em 1971, Ronald Konopka e Seymour Benzer descreveram o primeiro gene envolvido no ritmo circadiano, *period* (*per*). Através de mutagênese química, eles geraram três linhagens de *Drosophila melanogaster* mutantes, que tinham padrões diferentes daqueles observados em moscas não mutagenizadas nos ritmos de eclosão e atividade locomotora. Ao mapear as mutações, eles observaram que todas

elas eram no mesmo *locus* gênico, dando a este gene o nome de *period*. Quando submetidas em regime de escuro constante, as moscas *per^{Short}* (*per^S*) apresentaram um período de 19h, ao contrário da mosca selvagem que apresenta um período de ~24h. Já os mutantes *per^{Long}* (*per^L*) apresentaram um período de ~29h. E os mutantes *per⁰¹* eram arrítmicos (Figura 1.2) (Konopka & Benzer, 1971; Saunders, 2002).

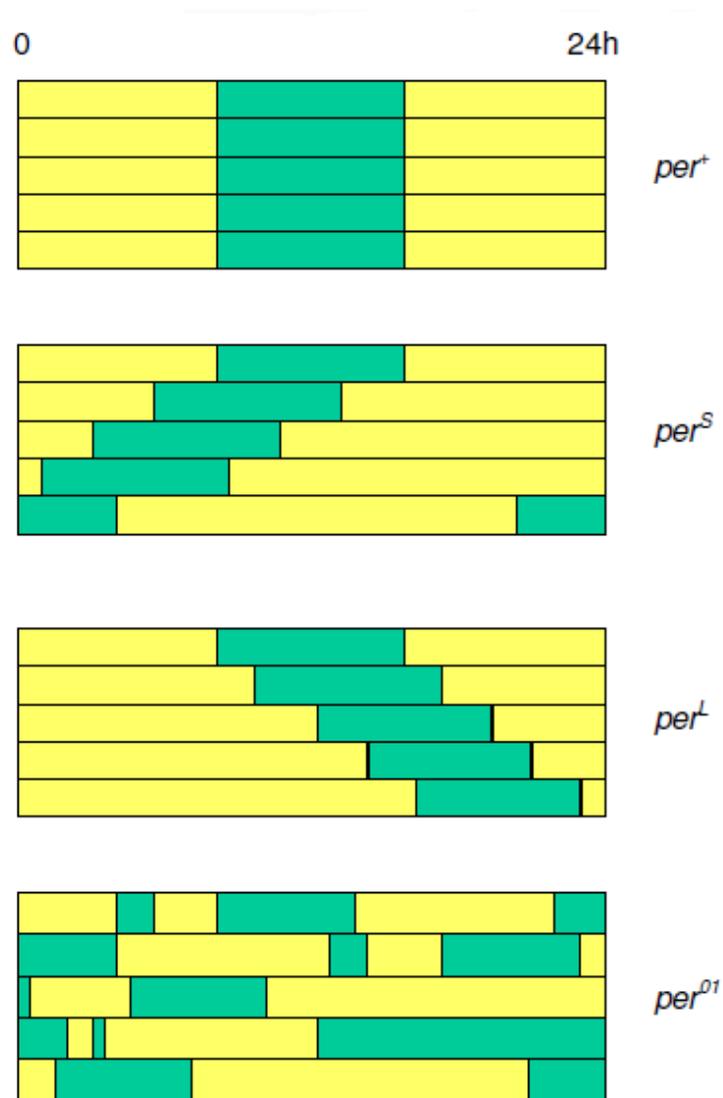


Figura 1.2 Representação do experimento de atividade locomotora em escuro constante dos mutantes para o gene *per* em *D. melanogaster* (*per⁺*): as moscas que possuem o alelo selvagem apresentam um período endógeno de ~24h; (*per^S*): moscas que possuem um período endógeno de 19 horas; (*per^L*): moscas que apresentam um período de 29 horas; (*per⁰¹*): são arrítmicos, ou seja, não possuem um período definido. No gráfico, as barras horizontais retratam períodos de 24h em vários dias. A cor amarela representa o horário de repouso, e a cor verde, o horário de atividade (Fonte: Konopka & Benzer, 1971, e adaptada por Rivas, 2010).

Entretanto, a contribuição de *per* no relógio só foi esclarecida cerca de 12 anos mais tarde, quando o gene foi clonado e isolado pela equipe de Michael Rosbash, Jeffrey Hall e Michael Young (Bargiello & Young, 1984; Reddy *et al*, 1984; Zehring *et al*, 1984). Os três cientistas, em 2017, foram laureados com o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia por suas descobertas sobre o relógio circadiano.

Desta data até hoje, outros importantes genes envolvidos no relógio circadiano de *D. melanogaster* foram descritos e caracterizados molecularmente, como *timeless* (*tim*) (Sehgal *et al*, 1994), *Clock* (*Clk*) (Allada *et al*, 1998), *cycle* (*cyc*), (Rutila *et al*, 1998), *cryptochrome* (*cry*) (Stanewsky *et al*, 1998), *vri* (*vri*) (Glossop *et al*, 2003), *PAR domain protein 1 ε* e *δ* (*Pdp1 ε/δ*) (Cyrán *et al*, 2003; Zheng *et al*, 2009) e *clockwork orange* (*cwo*) (Kadener *et al*, 2007; Lim *et al*, 2007; Matsumoto *et al*, 2007), mostrando que o relógio central deste inseto, quando sincronizado pela luz, é controlado por diversos genes interligados em 3 alças regulatórias de retroalimentação negativa que se interconectam (revisado em Boothroyd & Young 2008; Zhang & Kay 2011). Mais recentemente, o gene *Ecdysone-induced protein 75* (*E75*) também foi descrito como um gene que participa do controle molecular do relógio circadiano em *D. melanogaster* (Kumar *et al*, 2014).

1.2.1 Primeira alça regulatória do relógio circadiano em *D. melanogaster*

Na primeira alça regulatória do relógio, os fatores de transcrição CLOCK (CLK) e CYCLE (CYC) formam um heterodímero e se ligam as regiões E-Box (CACGTG) dos genes *period* (*per*) e *timeless* (*tim*) promovendo a transcrição desses genes. As proteínas PERIOD (PER) e TIMELESS (TIM) se acumulam no citoplasma cerca de 6 a 8 horas após o pico de expressão dos seus respectivos mRNAs. Essa diferença que ocorre entre o acúmulo dos mRNAs e das proteínas se dá pela fosforilação de PER pela quinase DOUBLETIME (DBT) que a marca para degradação via proteassoma. Entretanto, quando as concentrações de TIM aumentam no citoplasma, PER se estabiliza através da associação a TIM, e devido a ação da fosfatase PP2A (PROTEIN PHOSPHATASE 2A) (Sathyanarayanan *et al*, 2004), que remove os fosfatos de PER

anteriormente adicionados por DBT, formando o heterodímero PER-TIM (Price *et al*, 1998, Kloss *et al*, 2001, revisado em Hardin, 2011).

DBT associa-se a PER-TIM, formando o complexo PER-TIM-DBT (Kloss *et al*, 2001). As quinases CASEÍNA QUINASE 2 (CK2) e SHAGGY (SGG) fosforilam PER e TIM respectivamente, e isto faz com que este complexo seja translocado para o núcleo, se ligue a CLK, fosforilando esta proteína através de DBT, e, conseqüentemente reprimindo a ligação de CLK-CYC às regiões promotoras dos genes *per* e *tim* (Yu *et al*, 2006, revisões em Allada & Chung, 2010 e Hardin, 2011) (Figura 1.3).

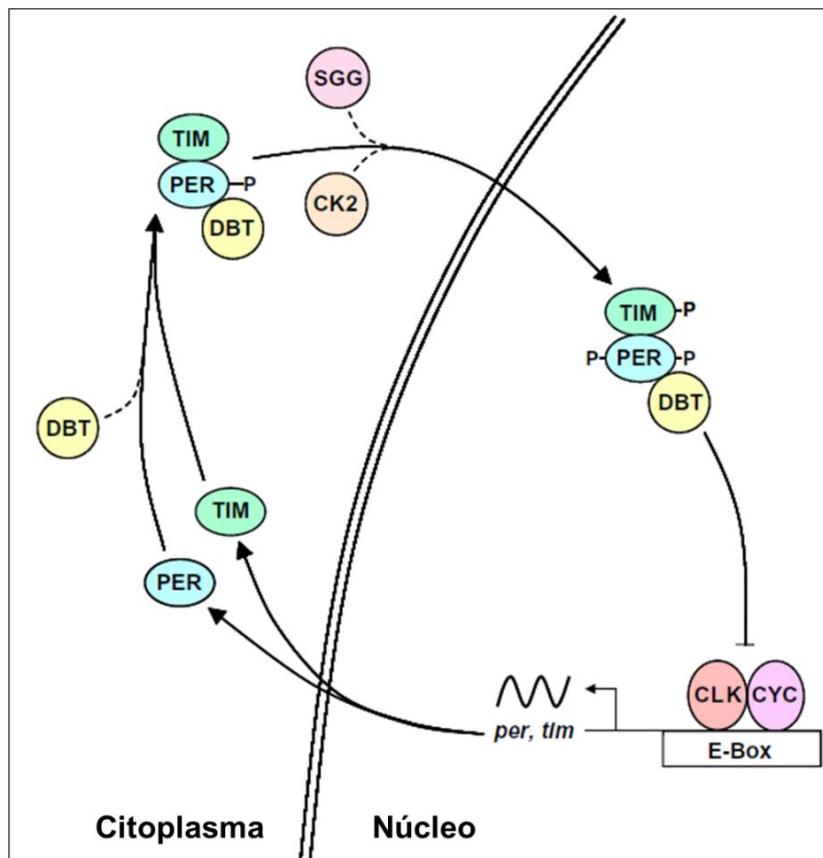


Figura 1.3 Representação da primeira alça do relógio em *D. melanogaster* Resumidamente, os fatores de transcrição CLK-CYC se ligam as regiões E-BOX dos genes *per* e *tim* e promovem a transcrição desses genes. Suas proteínas formam um complexo juntamente com DBT e após sofrerem modificações pós-traducionais mediadas por quinases e fosfatases, entram no núcleo e reprimem a sua própria transcrição; A linha dupla representa o envelope nuclear; linha sinusoidal, a expressão do RNA mensageiro; setas, o fluxo de etapas; linhas pontilhadas, momentos em que as proteínas são fosforiladas; linhas com barras (bloqueadas), repressão transcricional; P, sítios de fosforilação (Fonte: Modificado de Hardin, 2011).

Entretanto, o relógio circadiano é sincronizado por fatores ambientais externos, como por exemplo, a luz. Na presença de luz, a flavoproteína CRYPTOCHROME (CRY) muda a sua conformação, se tornando ativa, permitindo sua ligação a TIM, o que resulta na degradação desta última via proteassoma (Figura 1.4). Deste modo, também há a diminuição de PER, já que ela se torna instável devido aos baixos níveis de TIM. Sem a repressão exercida por PER-TIM-DBT, CLK-CYC ativa novamente a transcrição de *per* e *tim*, reiniciando um novo ciclo no relógio (Emery *et al*, 1998, Stanewsky, 2003, revisado em Hardin, 2011).

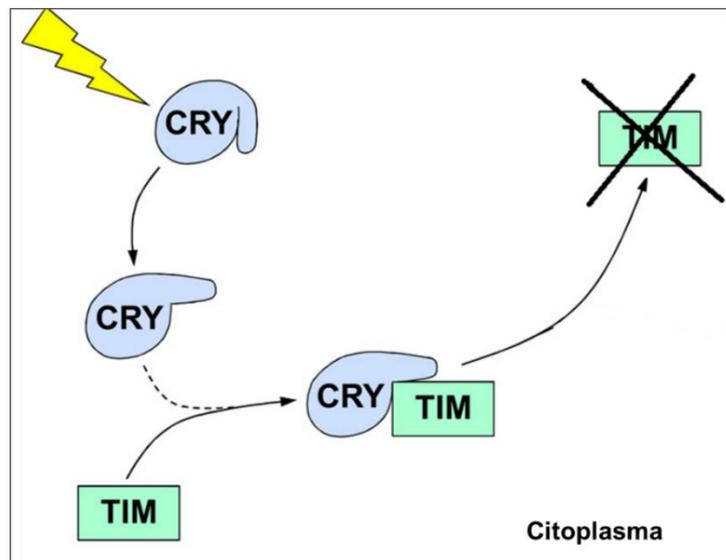


Figura 1.4: A luz como sincronizador ambiental do relógio. Na presença de luz, CRY se torna ativa e recruta TIM para degradação via proteassoma, reiniciando o ciclo no relógio (Fonte: Modificado de Hardin, 2011).

1.2.2 Segunda e terceira alças regulatórias do relógio circadiano em *D. melanogaster*

Na segunda alça do relógio, o heterodímero CLK-CYC ativa a transcrição dos genes *vrille* (*vri*) e *PAR domain protein ε* (*PDP1ε*). O controle transcricional de *Clk* é realizado por VRI e PDP1ε. VRI atua como um repressor de *Clk*, PDP1ε atua como um ativador transcricional (Cyran *et al*, 2003) (Figura 1.5).

A proteína VRI se acumula no mesmo momento que o seu transcrito, e quando seus níveis aumentam, VRI se liga ao sítio V/P box (VRI/PDP1 box) presente na região promotora de *Clk*, promovendo sua repressão (Cyran *et al*, 2003, Glossop *et al*, 2003, revisado em Hardin, 2011). Entretanto PDP1ε acumula-se no citoplasma cerca de 4 horas mais tarde que VRI, possivelmente devido às diferenças de meia-vida dos transcritos. Deste modo, PDP1ε se liga ao sítio V/P box promovendo a transcrição de *Clk*. Acredita-se que a diferença de fase entre VRI e PDP1ε seja responsável pela modulação cíclica de *Clk* (Benito *et al*, 2007, Zheng *et al*, 2009).

Contudo, CLK não apresenta variação cíclica. Porém a fosforilação desta proteína ocorre de maneira circadiana. Quando CLK está hiperfosforilado, está ocorrendo a máxima repressão de *per* e *tim*, sugerindo então, que CLK seja mais ativo quando hipofosforilado (Kim & Edery, 2006; revisado em Amoretty *et al*, 2013). Já *cyc* apresenta um perfil constitutivo tanto em seu transcrito, como em sua proteína (Rutila *et al*, 1998).

A terceira alça do relógio envolve a transcrição do gene *clockwork orange* (*cwo*). O heterodímero CLK-CYC se liga a região E-Box do gene *cwo* e promove a sua transcrição. Este gene vem sendo implicado como um repressor transcricional do relógio, pois o seu produto parece se ligar a sítios E-boxes de outros genes, o que por competição acabaria por inibir CLK-CYC (Kadener *et al*, 2007; Lim *et al*, 2007; Matsumoto *et al*, 2007) (Figura 1.5).

Por fim, o gene *Ecdysone-induced protein 75* (*E75*) parece atuar no controle molecular do relógio circadiano em *D. melanogaster*. Moscas silenciadas para *E75* apresentam um padrão de atividade locomotora arritmico (Jaumouillé *et al*, 2015) e, embora não se tenha elucidado completamente o papel do *E75*, é sugerido que sua

1.3 Relógio circadiano em insetos não modelos

1.3.1 O relógio de *Aedes aegypti*

Os mosquitos *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) são vetores de uma série de patógenos que causam doenças importantes, tais como a Zika e dengue (Ruckert *et al*, 2017). Originário do continente africano, este mosquito é encontrado em domicílio humano e peridomicílio. Atualmente ocorre em áreas tropicais e subtropicais com concentrações no Brasil (onde está presente em todos os estados) e sudeste da Ásia (Braga e Valle, 2007, Kraemer *et al*, 2015).

Aspectos do comportamento de insetos vetores tem um papel importante na dinâmica de transmissão de doenças. Contudo, ainda não está elucidado como ocorre o controle molecular dos ritmos de atividade e alimentação apresentados por mosquitos (Clements 1999; Saunders 2002; Klowden & Zwiebel 2004).

Em mosquitos, Gentile e colaboradores (2009) descreveram o padrão de expressão do RNA mensageiro dos sete principais genes da primeira e segunda alças regulatórias do relógio em *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, em ciclos de claro e escuro, ao longo de 24 horas. Em ambas espécies pode-se observar, de maneira geral, um perfil de expressão semelhante ao que é visto em *Drosophila melanogaster*. Os genes *period* e *timeless* têm seu pico de expressão na escotofase (fase escura) e em antifase com os picos dos genes *Clock* e *cycle*. Este último, por sua vez apresenta padrão de expressão cíclico, ao contrário do que é visto para *D. melanogaster*. Os genes *vrille* e *Pdp1* apresentam seus picos de expressão em fases distintas, o que sugere uma competição entre os dois genes pelos mesmos sítios de regulação, tal como em *D. melanogaster* (Figura 1.6).

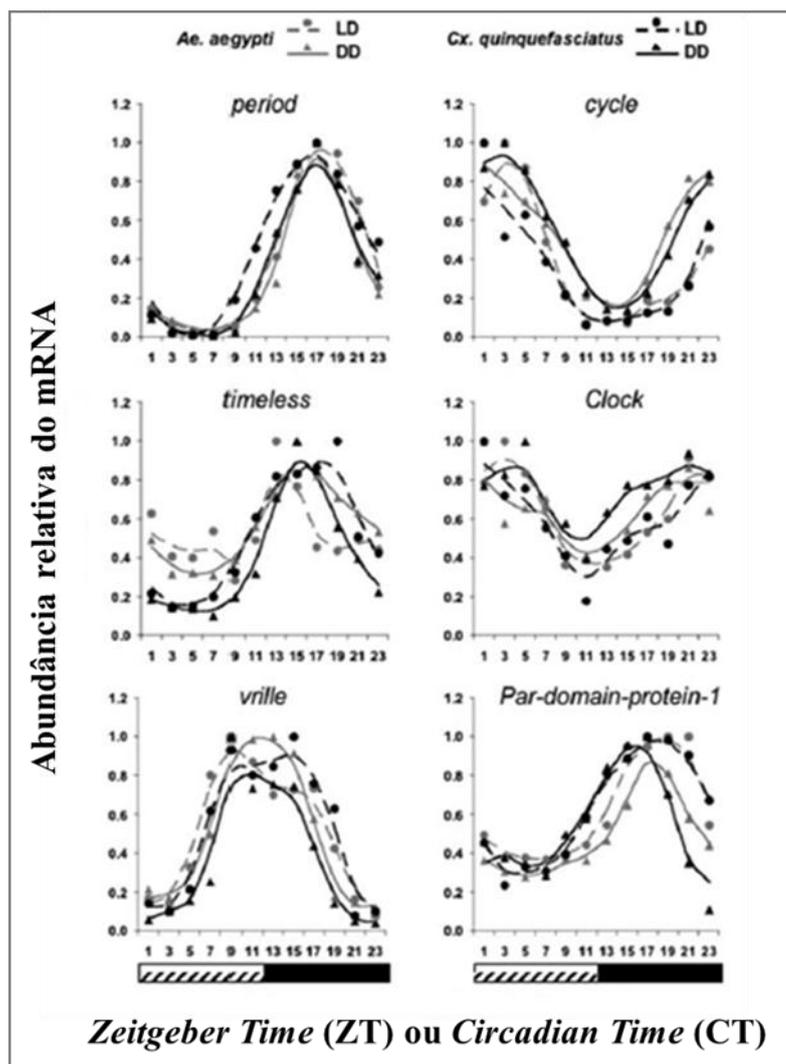


Figura 1.6 Expressão circadiana de genes do relógio em cabeça de fêmeas virgens dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* avaliada por PCR quantitativo em tempo real. Os gráficos mostram a expressão dos genes *per*, *cyc*, *tim*, *Clk*, *vri* e *Pdp1* em regimes de claro/escuro (LD, linhas tracejadas) e escuro constante (DD, linhas contínuas). As linhas cinzas representam a expressão dos genes em *Ae. aegypti* e as pretas, em *Cx. quinquefasciatus*. O eixo y indica a abundância relativa do RNAm e o eixo x, o ZT (*Zeitgeber* luz) em LD e o CT (*Circadian Time*, o tempo circadiano, em DD). Já a barra branca indica a fase clara em LD, a barra hachurada representa o dia subjetivo em DD (fase em que a luz estaria acesa em um regime claro/escuro) e barra preta indica a fase escura em LD e a noite subjetiva em DD. Os pontos representam LD e os triângulos, DD (Fonte: modificado de Gentile et al, 2009).

Entretanto, uma diferença observada com relação ao relógio de *D. melanogaster* é que, em mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex* existem duas formas do gene *cryptochrome*: uma semelhante ao fotoreceptor (*cry1*) de *Drosophila* e outra (*cry2*), que é ortóloga ao repressor transcricional encontrado em vertebrados (Yuan *et al*, 2007) e ausente na mosca de frutas.

A expressão do gene *cry1* apresenta-se constitutiva, mas a expressão de *cry2*, ao contrário do que é visto para *Cx. quinquefasciatus*, apresenta um padrão bimodal em *Ae. aegypti*, ou seja, dois picos de expressão gênica. No entanto, ainda não sabemos qual a importância destes dois picos na regulação do relógio circadiano. Especula-se que as diferenças observadas na expressão de *cry2* entre estas duas espécies poderiam contribuir para os distintos padrões de atividade observados em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* (Figura 1.7) (Gentile *et al*, 2009).

Recentemente, um estudo realizado com mosquitos *Ae. aegypti* (insetos diurnos) e *Anopheles coluzzi* (insetos noturnos) mostrou diferenças no acúmulo da proteína PER no cérebro de fêmeas dessas duas espécies. Embora PER seja expressa nos neurônios laterais dos dois insetos, foi visto que em *Ae. aegypti*, PER também é expresso nos neurônios medianos-anteriores, enquanto que em *An. Coluzzi*, esta proteína é expressa nos *pars intercerebralis* (neurônios que *Ae. aegypti* não possui), indicando que há diferenças no circuito neuronal circadiano de mosquitos diurnos e noturnos (Baik *et al*, 2019).

Além disso, foi observado que PER apresenta um perfil de expressão cíclico, com seu pico de expressão em momentos diferentes para as duas espécies. Enquanto PER tem um acúmulo nos neurônios laterais no fim da noite/início do dia em *Ae. aegypti*, em *An. coluzzi* os níveis da proteína PER atingem o pico no fim do dia/início da noite nesse mesmo grupo neuronal, indicando mais uma vez uma regulação circadiana distinta entre insetos diurnos X noturnos. E embora não seja possível estabelecer uma correlação direta, é sugerido também o papel desta proteína na modulação do padrão de atividade em diferentes momentos do dia nestes dois insetos (Baik *et al*, 2019).

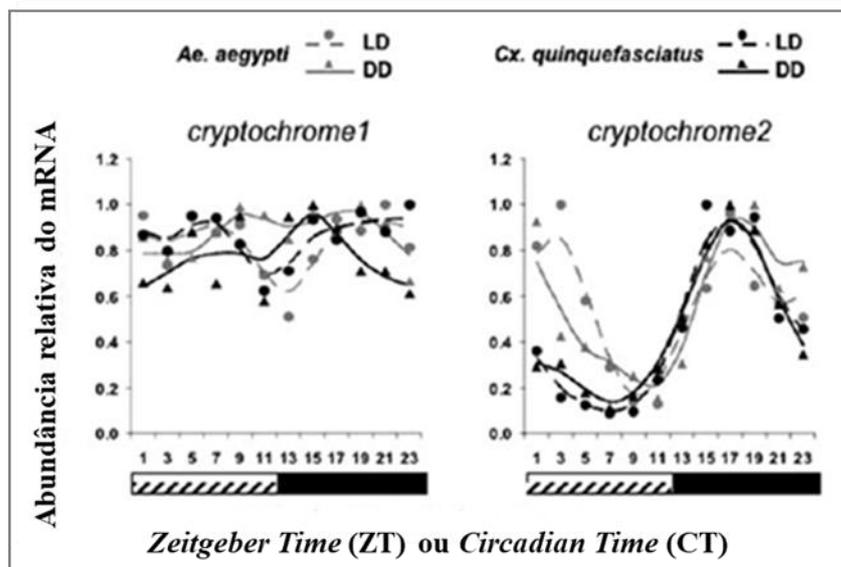


Figura 1.7: Expressão circadiana de genes do relógio em cabeça de fêmeas dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* avaliada por PCR quantitativo em tempo real. Os gráficos mostram a expressão dos genes *cryptochrome 1* e *2* em regimes de claro/escuro (LD, linhas tracejadas) e escuro constante (DD, linhas contínuas). As linhas cinzas representam a expressão dos genes em *Ae. aegypti* e as pretas, em *Cx. quinquefasciatus*. O eixo y indica a abundância relativa do RNAm e o eixo x, o ZT (*Zeitgeber* luz) em LD e o CT (*Circadian Time*, o tempo circadiano) em DD. Já a barra branca indica a fase clara em LD, a parte hachurada representa o dia subjetivo em DD (fase em que a luz estaria acesa em um regime claro/escuro) e barra preta indica a fase escura em LD e a noite subjetiva em DD. Os pontos representam LD e os triângulos DD (Fonte: Modificado de Gentile *et al*, 2009).

1.3.2 O Vírus Dengue e a modulação do relógio em *Aedes aegypti*

Dentre as arboviroses de grande importância médica transmitida pelo *Ae.aegypti*, está a Dengue (DENV). Pertencente ao gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae*, o DENV é um vírus envelopado, de RNA senso positivo e de cadeia simples. Compreende quatro sorotipos (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4) antigenicamente distintos, que diferem um do outro em 25-40% em nível de aminoácidos (Byk & Gamarnik, 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde, a doença causada por este arbovírus é endêmica em mais de 100 países (WHO, 2016), e acomete cerca de 400 milhões de pessoas por ano (CDC, 2019). O Brasil atualmente, apresenta o maior número de pessoas infectadas pelo DENV nas Américas onde há circulação dos quatro sorotipos. (Ramos-Castañeda *et al*, 2017).

Já foi visto pelo nosso grupo que fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas pelo DENV2 e mantidas em LD12:12 têm um aumento no padrão da sua atividade locomotora quando comparadas com mosquitos controles, sugerindo que a infecção por esse vírus poderia ter um papel na modulação deste comportamento no mosquito. Uma vez que o relógio circadiano regula os ritmos de atividade em insetos (Saunders, 2002) é possível que o relógio circadiano possa atuar na dinâmica da transmissão de doenças (Figura 1.8) (Lima-Camara & Bruno, *et al*, 2011).

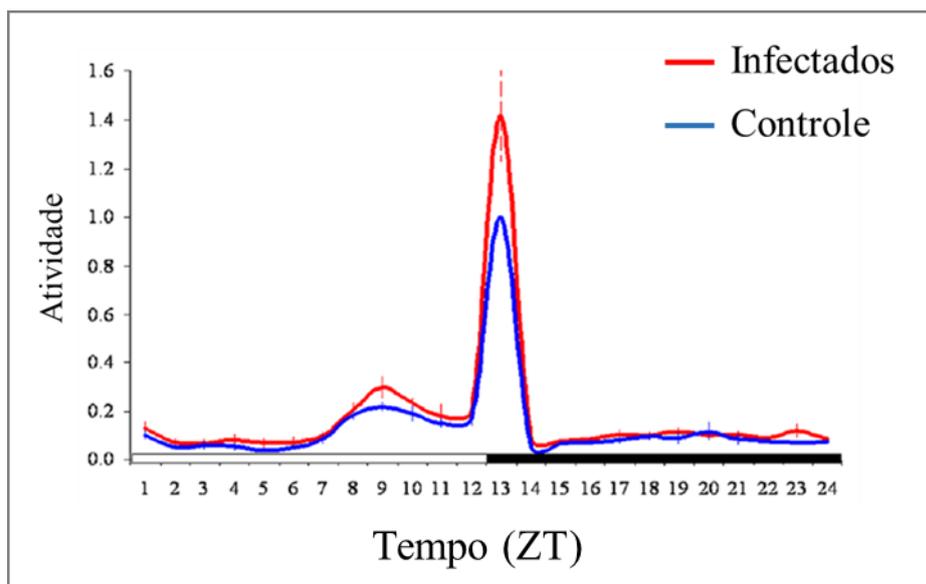


Figura 1.8: Atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas e não infectadas pelo DENV2. As fêmeas infectadas (em vermelho) apresentam um aumento significativo de atividade quando comparadas as fêmeas não infectadas (em azul). O eixo y representa a atividade locomotora dessas fêmeas ao longo de 24 horas. O eixo x representa o *Zeitgeber* luz, onde a barra branca significa as 12 horas de claro e a barra preta as 12 horas de escuro. Sendo o ZT1, uma hora após o acender das luzes e o ZT13, uma hora após o apagar das luzes. (Fonte: modificado de Lima-Camara & Bruno *et al*, 2011).

1.3.3 *Danaus plexippus*

Em 2008, Zhu e colaboradores estabeleceram o perfil de expressão de genes de relógio em cabeças de borboletas monarcas (*Danaus plexippus*) em 12 horas de claro e 12 horas de escuro e em escuro constante. Assim como em mosquitos, as borboletas monarcas possuem as duas formas do gene *cryptochrome* (Yuan *et al*, 2007). Foi observado que, nos dois regimes, *per* e *tim* apresentam um perfil de expressão cíclico nessas borboletas, enquanto que *cry1* e *cry2* são arrítmicos (Figura 1.9) (Zhu *et al*, 2008).

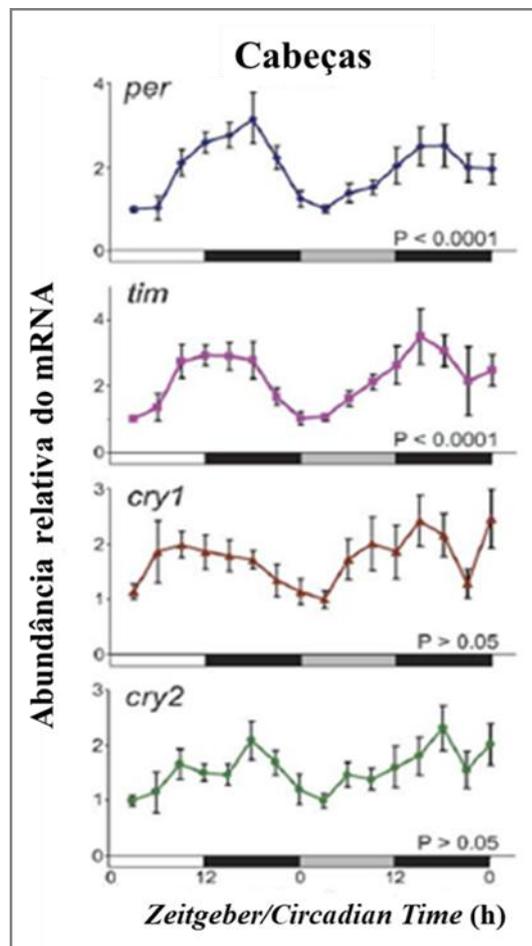


Figura 1.9: Expressão dos genes de relógio em cabeças de borboletas monarcas. Os gráficos mostram a expressão dos genes *per*, *tim*, *cry1* e *cry2* em 12 horas de claro e 12 horas de escuro (LD) e em escuro constante (DD). O eixo y indica a abundância relativa de RNAm e o eixo x, o ZT (*Zeitgeber* luz) ou CT, o tempo circadiano em DD. As barras brancas/pretas representam 12 horas de claro/12 horas de escuro e as barras cinzas/pretas representam o dia a e noite subjetiva, respectivamente, em DD (Fonte: Modificado de Zhu *et al*, 2008).

Entretanto, é proposto que CRY2 tenha um papel essencial na repressão do relógio neste inseto. CLK-CYC se ligariam às regiões regulatórias dos genes *per*, *tim* e *cry2* e promoveriam a transcrição desses genes. No citoplasma, as proteínas PER, TIM e CRY2 ou somente PER e CRY2 formariam complexos, entrariam no núcleo e reprimiriam a sua própria transcrição. E tal como em *D. melanogaster*, CRY1 estaria responsável por se ligar a TIM e promover a degradação desta proteína via proteassoma, e CK2, DBT e PROTEÍNA FOSFATASE 2A (PP2A) estariam envolvidas nas modificações pós traducionais de PER e TIM. Porém, os genes responsáveis pela degradação de CRY2 ainda são desconhecidos (Figura 1.10) (Zhu *et al*, 2008, revisões em Reppert *et al*, 2016, Niepoth *et al*, 2017).

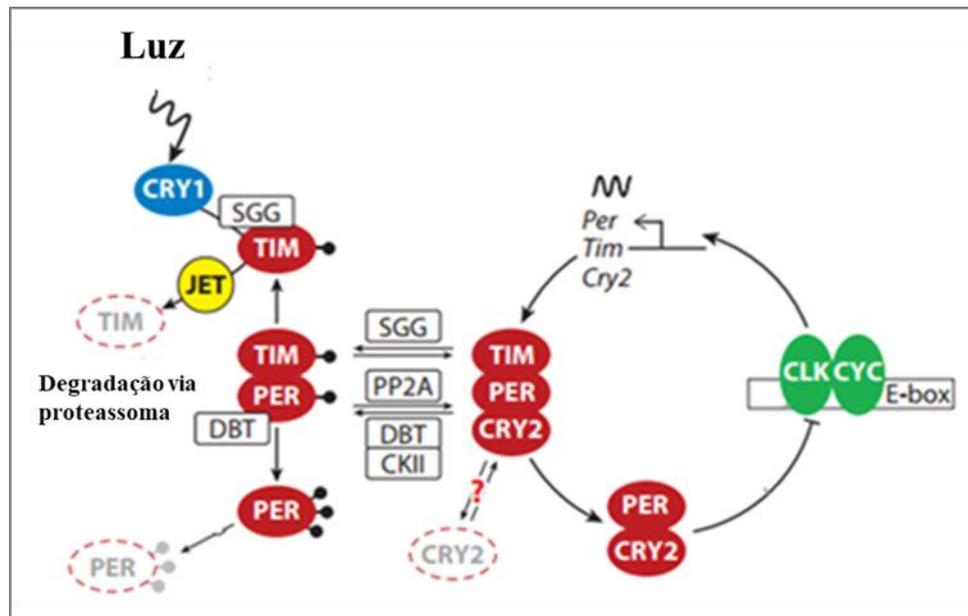


Figura 1.10: Modelo de regulação da primeira alça do relógio proposto para *Danaus plexippus*. CLK-CYC promovem a transcrição de *per*, *tim* e *cry2*. TIM, PER e CRY2 ou PER e CRY2 formam complexos e reprimem a sua própria transcrição. Em contrapartida, na presença de luz, CRY1 promove a degradação de TIM via proteassoma sinalizada através de SGG e JETLAG (JET). CK2, DBT e PP2A estão envolvidas nas modificações pós traducionais de PER e TIM; A alça de retroalimentação negativa é representada pelas setas grossas que estão em círculo. A linha com barra (bloqueada) representa repressão da transcrição; Linha sinusoidal, o RNA mensageiro; Em vermelho, as proteínas, e os círculos tracejados em vermelho representam a degradação dessas proteínas. O ponto de interrogação em vermelho representa o desconhecimento sobre os genes responsáveis pela degradação de CRY2 (Fonte: Modificado de Reppert *et al*, 2016).

1.4 Estudo do relógio circadiano em cultura de células de insetos

O modelo de regulação do relógio em borboletas monarcas foi proposto graças ao estudo molecular da expressão gênica circadiana em células embrionárias provenientes da própria borboleta. O estudo com as células da linhagem DpN1 se mostrou indispensável para explorar o mecanismo do relógio circadiano neste inseto (revisado em Reppert, 2016).

Em paralelo ao estabelecimento do perfil de expressão na cabeça de borboletas monarcas, Zhu e colaboradores (2008), também descreveram o perfil de expressão dos genes *per*, *tim*, *cry1* e *cry2* em células DpN1. Em LD, *per*, *tim* e *cry2* apresentaram um perfil de expressão cíclico nessas células, enquanto *cry1* se mostrou arritmico. Quando submetidas a escuro constante, todos os genes apresentaram um perfil de expressão arritmico nessas células (Figura 1.11) (Zhu *et al*, 2008).

Estabelecer o perfil de expressão gênica circadiana nessas células foi essencial para especular como era o mecanismo da primeira alça de regulação do relógio neste inseto. Como citado anteriormente, borboletas monarcas expressam um segundo tipo do gene *cryptochrome* - *cry2*, que codifica uma proteína vertebrado – *like*, cujo papel é de repressor transcricional. Para analisar a função de *cry2* nas borboletas monarcas, os autores utilizaram as células DpN1, silenciaram esse gene por RNA de interferência e monitoraram os níveis do transcrito de *per* por 24h em LD. Com o *knockdown* de *cry2*, os níveis do RNA de *per* se mantiveram altos e sem oscilação durante as 24h, diferentemente do controle (células silenciadas para o gene que codifica a proteína GFP – do inglês *green fluorescent protein*), em que *per* apresentava um perfil de expressão cíclico nessas células. Este resultado foi importante para confirmar que *cry2* tinha um papel de repressor transcricional do relógio nas células DpN1 (Figura 1.12) (Zhu *et al*, 2008).

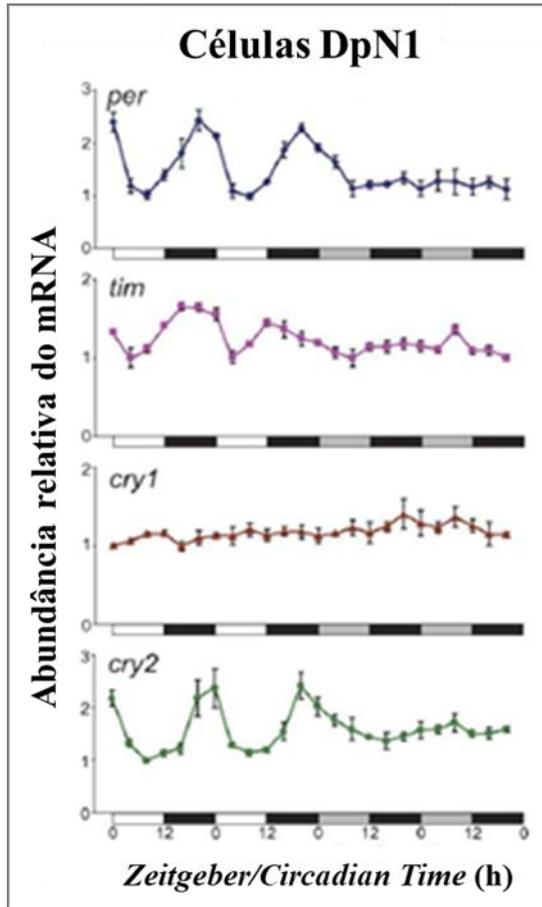


Figura 1.11: Expressão dos genes de relógio em células embrionárias DpN1. Os gráficos mostram a expressão dos genes *per*, *tim*, *cry1* e *cry2* em 12 horas de claro e 12 horas de escuro (LD) e em escuro constante (DD). O eixo y indica a abundância relativa de RNAm e o eixo x, o ZT (*Zeitgeber* luz) ou CT, o tempo circadiano em DD. As barras brancas/pretas representam 12 horas de claro/12 horas de escuro e as barras cinzas/pretas representam o dia a e noite subjetiva, respectivamente, em DD. (Fonte: Modificado de Zhu *et al*, 2008).

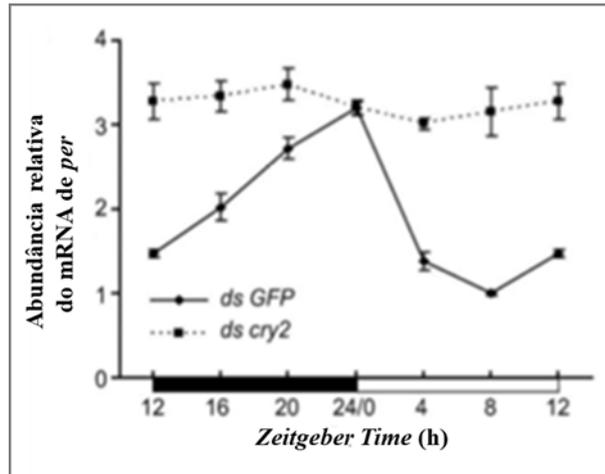


Figura 1.12: O *knockdown* de *cry2* torna *per* arritmico nas células DpN1. O eixo y representa a expressão relativa do RNAm de *per* e o eixo x, o ZT (LD12:12). O dsRNA para GFP serviu como controle do experimento (Fonte: Modificado de Zhu et al, 2008).

Assim como as células DpN1 de *Danaus plexippus*, as células S2 de *Drosophila melanogaster* que não expressam genes canônicos do relógio circadiano, como por exemplo *Clk* e *cyc*, são bastante utilizadas para o aprofundamento no entendimento do relógio circadiano neste inseto (Nawathean *et al*, 2005, Ozturk *et al*, 2011, Rey *et al*, 2018).

Foi visto para essas células, inclusive que, mesmo na ausência de importantes genes do relógio, muitos transcritos e proteínas, especialmente, do metabolismo celular, são expressos de modo cíclico, sem a contribuição de qualquer regulador circadiano conhecido, sugerindo então, uma reconsideração dos modelos existentes do mecanismo de relógio em *Drosophila* (Rey *et al*, 2018).

Deste modo, o uso de linhagens celulares é uma alternativa para o estudo acerca do relógio circadiano, principalmente em organismos não modelo.

1.5 Linhagem celular Aag2 de *Aedes aegypti*

As células Aag2 de *Ae. aegypti* foram originalmente isoladas por Peleg (1968) a partir de ovos coletados em diferentes fases do desenvolvimento embrionário. Entretanto, somente na década de 90, estas células foram estabelecidas como linhagem celular, por Lan e Fallon (1990).

As células Aag2 são aderentes, e apresentam na cultura diferentes morfologias, podendo ser mais comum a forma fibroblastóide. As diferenças morfológicas apresentadas por essas células podem ocorrer devido a presença de uma grande diversidade de tipos celulares (Walker *et al*, 2014, Fredericks *et al*, 2019). Esta linhagem celular tem sido utilizada principalmente para estudos acerca do sistema imune do mosquito *Ae. aegypti* (Sim & Dimopoulos, 2011, Barletta *et al*, 2012, Fu *et al*, 2015, Whitfield *et al*, 2017). Também já foi visto que as respostas imunes induzidas nessas células por bactérias, fungos e vírus são semelhantes ao que ocorre no mosquito *Ae. aegypti*, o que torna essas células um bom modelo para estudo de infecção por arbovírus, por exemplo (Barletta *et al*, 2012).

1.6 Justificativa

Estudar se e como o vírus poderia modular o relógio no mosquito *Ae.aegypti* não é uma tarefa fácil, uma vez que ensaios funcionais para estudo do relógio circadiano em mosquitos, como por exemplo silenciamento por RNA de interferência, não obtiveram sucesso. Em fêmeas de *An. gambiae*, Das e Dimopoulos (2008) silenciaram os genes *per*, *tim*, *Clk* e *cyc* e observaram se haveria alguma diferença na busca pela alimentação sanguínea. Após o silenciamento desses genes, não foi observado nenhuma diferença significativa na porcentagem de mosquitos alimentados com sangue quando comparados aos controles. Já Gentile e colaboradores (2013) silenciaram o gene *tim* em cabeça de fêmeas de *Ae. aegypti* e, ao comparar a atividade locomotora desses mosquitos com os controles, eles observaram que quatro dias após a infecção a atividade locomotora dos mosquitos diminuiu de forma significativa. Entretanto, o fenótipo de ritmicidade se recuperou no quinto dia (Das e Dimopoulos, 2008, Gentile *et al*, 2013). Deste modo, uma alternativa

encontrada pelo nosso grupo foi a tentativa de estabelecer um modelo para estudos do relógio circadiano em cultura de células, utilizando a linhagem celular Aag2.

Neste trabalho, além de estabelecermos o perfil de expressão dos genes de relógio nesta linhagem, também infectamos as células Aag2 com DENV2, a fim de obtermos informações iniciais de como poderia ocorrer a interação entre o relógio e a infecção pelo vírus dengue neste sistema de cultura de células.

2. OBJETIVOS

O objetivo desta dissertação foi estabelecer o perfil de expressão circadiana dos dez principais genes de relógio (*period*, *timeless*, *Clock*, *cycle*, *vrille*, *pdp1*, *cry1*, *cry2*, *cwo* e *E75*):

- 1 - Em células da linhagem Aag2 em diferentes fotoperíodos (LD12:12 e DD) em temperatura constante;
- 2 - Em células Aag2 infectadas com DENV2 em LD12:12, em temperatura constante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

As células Aag2 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Marcos Sorgine, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sendo mantidas em estufa de cultura Orion 502 (Fanem) à temperatura de 28°C, em meio de Cultura Schneider (S2) (Life Technologies), com L-glutamina e 10% de soro fetal bovino (Life Technologies). A passagem das células foi realizada a cada 3-4 dias, em uma diluição de 1:5, em garrafas de 25cm².

3.2 Coleta dos pontos

Para a coleta dos pontos, as células da cultura foram repicadas em placas de 87mm de diâmetro em meio S2 e 10% de soro fetal bovino, em diluições apropriadas para cada experimento. Para o estabelecimento do perfil de expressão dos genes de relógio ao longo de 24h, usamos a diluição de 1:3 (em ensaios sem infecção) ou uma concentração de 24×10^5 células/10mL (em ensaios com infecção viral). As células foram colocadas em incubadora B.O.D - do inglês *Bio-Oxygen Demand* - (Forlab – EletroLab) sem CO₂, no fotoperíodo desejado: LD12:12 – 12 horas de luz seguidas de 12 horas de escuro ou DD – escuro constante, à temperatura de 28°C.

Após 3 dias ou 4 dias no regime desejado, as placas foram coletadas, a cada 4 horas ao longo de 24 horas, sendo os pontos coletados: ZT1, ZT5, ZT9, ZT13, ZT17 e ZT21 (LD) e CT1, CT5, CT9, CT13, CT17 e CT21 (DD).

A cada ponto coletado, as placas foram colocadas em isopor com gelo por 10 minutos para que a atividade metabólica celular fosse estagnada. O meio de cultura foi desprezado, as células lavadas com 2mL de PBS (do inglês *Phosphate Buffered Saline*) 1X (Anexo I) gelado e então raspadas e homogeneizadas em presença de 1 mL de TRIzol (Thermo Fisher). Em seguida, foi realizada a extração do RNA destas células.

3.3 Extração e quantificação do RNA

A extração do RNA total das células foi realizada com TRIzol, seguindo o protocolo baseado em Gentile e colaboradores (2009), que é feito em duas etapas:

Na primeira etapa, foram adicionados à solução de células em TRIzol, 200µL de clorofórmio por tubo, para que houvesse a separação das fases da solução. Após a transferência da fase aquosa para novos tubos, foram adicionados 500µL de Isopropanol 100% (Sigma-Aldrich), para uma concentração final de 60% por tubo, para que o RNA fosse precipitado. Em seguida, o *pellet* foi lavado com 500µL de Etanol 70% (Sigma-Aldrich). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* incubado por 30 minutos a temperatura ambiente para secar. Após este tempo, o *pellet* foi dissolvido em 100µL de água deionizada e então aquecido a 60°C por 10 minutos.

Na segunda etapa, ocorreu a purificação do material com Cloreto de Lítio (LiCl), para que contaminantes, como restos de fenol provenientes do TRIzol, pudessem ser retirados das amostras, a fim de não provocar uma inibição no processo de síntese de cDNA. Deste modo, foi adicionado aos tubos LiCl 7,5M para uma concentração final de 2,5M e incubação por pelo menos 30 minutos a -20°C. Em seguida, o *pellet* foi novamente lavado com Etanol 70% e então o material ressuspendido em água deionizada.

A quantificação do RNA total das células foi realizada com o aparelho *Qubit Fluorometric Quantitation* (Life Technologies), utilizando o Kit *Qubit RNA HS Assay Kit* (Life Technologies), conforme instrução do fabricante. Em todos os experimentos, o RNA total foi diluído a uma concentração final de 10 ng/µL, para que então pudesse ser feita a síntese de cDNA.

3.4 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada seguindo o protocolo de Gentile e colaboradores (2009), utilizando o kit *TaqMan Reverse Transcriptase* (Thermo Fischer), com os reagentes nas concentrações listadas na tabela a seguir:

Tabela 3.1: Concentração e volume final de cada reagente para a síntese de cDNA para cada amostra.

Reagentes	Volume
Buffer (10x)	1,00µL
MgCL ₂ (25 mM)	2,20µL
dNTP (25 mM/cada)	2,00µL
oligo dT (50 µL)	0,50µL
Inibidor de RNase (20U/µL)	0,20µL
Transcriptase reversa (50U/µL)	0,25µL
RNA total (10 ng/µL)	3,85µL
Total	10µL

A transcrição reversa foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), utilizando a seguinte programação: 25°C por 10 minutos, 48°C por 1 hora e 95°C por 5 minutos. Após a síntese, o cDNA foi diluído 10X para se obter um volume final de 100µL.

3.5 Reações de PCR para avaliação da presença dos genes de relógio em células Aag2

Em um primeiro momento, por não haver dados de expressão dos genes de relógio em células da linhagem Aag2, foram realizadas reações de RT-PCR a partir de RNA extraído de células coletadas em apenas dois diferentes pontos do dia (ZT5 e ZT17) (subitem 3.3 e 3.4).

Após a transcrição reversa do cDNA, utilizamos os *primers* citados na tabela 3.5 e a enzima *Go Taq Green Master Mix* (Promega) para amplificar os genes expressos nos tempos supracitados. As reações ocorreram no termociclador ProFlex

PCR System (Applied Biosystems), com a seguinte programação: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, X°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. X°C é a temperatura de anelamento para cada *primer* específico para os genes de relógio na reação de PCR, e as temperaturas estão descritas na tabela 3.2. As amostras amplificadas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (subitem 3.6). Na tabela 3.3, estão listados os reagentes utilizados na PCR.

Tabela 3.2: Temperatura de anelamento dos *primers* para cada gene na reação de PCR.

Genes	Temperatura de anelamento dos <i>primers</i>
<i>tim/Clock</i>	50°C
<i>per/vri/cyc/Pdp1</i>	52°C
<i>cry1/cry2/E75/cwo</i>	55°C

Tabela 3.3: Concentração e volume final dos componentes do mix de reação de PCR para cada poço.

Reagentes	Volume
Go taq Master Mix (2x)	12,5µL
oligo 5' (10µM)	2,5µL
oligo 3' (10µM)	2,5µL
cDNA	2,5µL
H ₂ O Milli-Q	5,0µL
Total	25µL

3.6 Eletroforese em gel de agarose

Foram usados 7 μ L do volume da reação de RT-PCR na eletroforese em gel de agarose 2,5%, diluído em TAE 1X (do inglês *Tris-acetate-EDTA*). Para visualização, o corante o *GelRed* foi utilizado, sendo diluído 10000x diretamente em agarose, seguindo as especificações do fabricante (Biotium). As amostras foram submetidas a 80 Volts por aproximadamente 1 hora e foram avaliadas em transiluminador, no comprimento de onda de 302nm. O marcador de peso molecular utilizado foi o de 100bp (Promega).

3.7 Análise da expressão gênica circadiana por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Para a análise da expressão dos dez genes de relógio em células infectadas e não infectadas, foram realizadas reações de PCR quantitativo em tempo real no termociclador *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) utilizando o kit *Power SYBR® Green PCR Master Mix* da Applied Biosystems, utilizando o mix de reação listado na tabela a seguir:

Tabela 3.4: Concentração e volume final dos componentes do mix de reação de qPCR para cada poço.

Reagentes	Volume
Power SYBR Green PCR Master Mix	7,50 μ L
oligo 5' (10 μ M)	0,75 μ L
oligo 3' (10 μ M)	0,75 μ L
H ₂ O Milli-Q	2,00 μ L
cDNA	4 μ L*
Total	15μL

* Para a análise dos genes *Clk* e *cyc* na reação de qPCR, o mix de reação em cada poço continha 6 μ L de cDNA e não foi utilizada H₂O Milli-Q, totalizando 15 μ L de volume final da mesma maneira.

Com exceção dos *primers* para os genes *Clock*, *clockwork orange* e *E75*, os *primers* utilizados foram os mesmos descritos por Gentile e colaboradores (2009) (Tabela 3.5).

Para a amplificação de cada gene, foram realizadas três réplicas técnicas de cada amostra de cDNA. As amostras foram submetidas às seguintes condições de termociclagem: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos e uma curva de dissociação para analisar a presença de contaminantes ou a formação de dímeros. A curva de dissociação (*melting curve*) tinha a seguinte programação: 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos, mais etapas crescentes de temperatura onde foram feitas as leituras de fluorescência (a cada 0,3°C) de 60°C até 95°C.

Os valores de C_T das três réplicas de cada cDNA e gene foram transformados em valores médios. As réplicas que apresentaram valores muito diferentes (*outliers*) dos valores críticos de Grubbs, foram excluídas da análise (Sokal & Rohlf, 1995). O método utilizado para a quantificação foi o “Método do C_T Comparativo” (*Comparative C_T Method*; Método $2^{-\Delta\Delta C_T}$) (Livak & Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001). As etapas de cálculo foram realizadas com base nos manuais da Applied Biosystems (1997, 2004). O gene *rp49* foi usado como normalizador endógeno (Gentile e colaboradores, 2005).

Tabela 3.5: Genes e *primers* usados para análise quantitativa por PCR em Tempo Real dos genes de relógio em células Aag2. Na tabela constam os genes, e nomes e sequências dos pares de *primers* correspondente a cada gene (*forward* em cima e *reverse* embaixo).

Gene	Nome	Sequência (5'----3')
<i>rp49</i>	5aeexpRP	GCTATGACAAGCTTGCCCCCA
	3aeaquaRP1b	TCATCAGCACCTCCAGCTC
<i>per</i>	5aeexpper3	CGTTGAAAAGTCTCAATCAACCT
	3aegyper3	GCTGAGTGAAAGCTTCGCCG
<i>tim</i>	5aegytim7	ATCGAACAACCTTTGGGAGC
	3aeexptim3	CGATCCCGTAAAACCTGTATG
<i>Clk</i>	5aeexpclkrvb1	TCTCCGGACTCGTCAACCGG
	3aegyclkrvb1	TGCGCTGGAGTTAGCACGACG
<i>cyc</i>	5aegy cyc1a	CCGACCAGGAGCTGAAAATG
	3aeexpcyc1	GACCTAGCAAATCACCTGTG
<i>cry1</i>	5aeexpcry1	GCCGACGCTCTATGTCCACG
	3aecry1	CGATCATCGGTGCCGGATAGTC
<i>cry2</i>	5aeexpcry2	ACTTGCCGGTGCTGAAGAACT
	3aecry2	CGATGATACACTTGGCCGTGCG
<i>vri</i>	5aevri1	AACGGTTCGCCAATTAACGG
	3aeexpvri	AGCAAGGCACTGTGTGCAGG
<i>Pdp1</i>	5aedp1	ACAACATGGCGGCCAAGC
	3aeexppdp1	CTCGGTGCAGGTTTCATGTTCTC
<i>cwo</i>	5aecwo01	CGTCTAGGCAAGATCCGCTATCA
	3aecwo01	CCAGGCAGGAGTTCATCCGAT
<i>E75</i>	5aeE7501	CCTACTTTGGCATGTCCACTGAA
	3aeE7501	GGTGAACCTTATCGTCCTGGGTCA

3.8 Infecção das células pelo DENV2

3.8.1 Padronização da infecção nas células pelo DENV2

Para a infecção das células Aag2 com o DENV2, foi realizada uma série de ensaios de padronização, onde inicialmente se testou três vírus da dengue sorotipo 2, em diferentes concentrações: Nova Guiné C (NGC) (vírus neuroadaptado a camundongo); 44/2 e BR/RJ66985/2000 (vírus obtido de paciente, não adaptado), cedidos pela Dra. Ada Alves (IOC-Fiocruz). Os testes de padronização foram feitos primeiramente em lâminas Nunc™ Lab-Tek™ (Thermo Fisher) de oito poços (Figura 3.1) e posteriormente em placas de petri de 87mm de diâmetro, onde os experimentos foram realizados após esta padronização.

Em um primeiro momento, para avaliar qual cepa viral seria capaz de infectar as células Aag2 e não lisá-las, 4×10^4 células foram plaqueadas em três poços da lâmina Lab-Tek, utilizando, para as três cepas virais, três volumes de diluição dos vírus: 40µL, 100µL e 200µL. Como controle negativo, utilizamos células não infectadas. Esse teste foi feito independentemente da MOI (do inglês, *Multiplicity Of Infection*) pois os valores da concentração de PFU (do inglês *Plaque-Forming Unit*) das amostras Nova Guiné C (3650 PFU/mL) e 44/2 (250.800 PFU/mL) foram estabelecidos em experimentos com células de mamífero (linhagem Vero – células de rim de macaco verde africano) e eram de grandezas muito diferentes. Além disso, a cepa BR/RJ66985/2000 (10^{12} TCID₅₀/mL) não causa lise em células Vero, não sendo possível estabelecer sua concentração em PFU. Dessa forma, a unidade utilizada para medir a concentração desta amostra viral foi TCID₅₀ (do inglês *Tissue Culture Infectious Dose*).



Figura 3.1: Representação de uma lâmina Nunc™ Lab-Tek™ utilizada nos experimentos de padronização da infecção pelo DENV2. A depender do ensaio realizado, cada poço tinha uma concentração de células e vírus a serem testadas. Os dois últimos poços sempre eram controles negativos da infecção. Foto: Thermo Fisher.

No dia seguinte ao plaqueamento, a infecção foi realizada conforme descrito no subitem 3.8.2, e três dias após a infecção, as lâminas foram processadas para imunofluorescência (subitem 3.8.3). A partir dos resultados da padronização (ver seção Resultados, subitem 4.3), optamos por utilizar a cepa BR/RJ66985/2000.

Escolhida a cepa viral, foram realizados novos experimentos utilizando as lâminas Nunc™ Lab-Tek™ e, desta vez as placas de Petri, para determinar qual seria a melhor concentração de vírus e células para a realização dos experimentos. Consideramos que a placa de Petri tem uma área aproximadamente 65 vezes maior que a Lab-Tek para esta estimativa.

As concentrações de células Aag2 e os volumes do vírus BR/RJ66985/2000 utilizados nas lâminas Lab-Tek e nas placas de Petri para este experimento de padronização estão listados nas tabelas 3.6 e 3.7. Para as análises da infecção em placa de Petri, por citometria de fluxo, utilizamos somente a menor concentração viral de cada experimento. Essas avaliações foram realizadas em duas etapas: primeiramente com as amostras celulares menos concentradas e, de acordo com o resultado da imunofluorescência, infectamos uma concentração maior de células.

Três dias após a infecção (subitem 3.8.2) as amostras nas lâminas Lab-Tek foram processadas para imunofluorescência (subitem 3.8.3) e as amostras nas placas

de Petri, para citometria de fluxo (subitem 3.8.4). A partir dos resultados obtidos nesses experimentos (ver seção Resultados, subitem 4.3) decidimos utilizar a quantidade de 24×10^5 células nas placas e 65 μ L de vírus, o que corresponde a concentração viral de $6,5 \times 10^{10}$ TCID₅₀/10mL para a realização dos experimentos de quantificação dos genes de relógio em células infectadas.

Após a infecção, as placas foram mantidas em incubadoras por três dias na concentração desejada e então coletadas de 4 em 4 horas, para a análise da expressão gênica circadiana. Entretanto, em muitas amostras a quantidade de RNA para cada ponto coletado era insuficiente.

Assim, aumentamos um dia a permanência dessas células na incubadora, passando de três dias para quatro dias após a infecção para realização das coletas, dando tempo dessas células se multiplicarem por mais um dia, para que tivéssemos material suficiente para a realização dos ensaios moleculares de análise da expressão gênica circadiana.

Tabela 3.6: Quantidade de células plaqueadas na Nunc™ Lab-Tek™ e os respectivos volumes de vírus DENV2 cepa BR/RJ66985/2000 durante a padronização dos experimentos de infecção.

Quantidade de células	Volume de vírus utilizado em cada poço na Lab-Tek
10^4	10 μ L/5 μ L/2 μ L
2×10^4	10 μ L/5 μ L/2 μ L
3×10^4	2 μ L/1 μ L/0,5 μ L
4×10^4	2 μ L/1 μ L/0,5 μ L

Tabela 3.7: Quantidade de células repicadas nas placas de Petri e os respectivos volumes de vírus DENV2 cepa BR/RJ66985/2000 durante a padronização dos experimentos de infecção.

Quantidade de células	Volume de vírus utilizado nas placas de Petri
6x10 ⁵	130µL
12x10 ⁵	130µL
18x10 ⁵	65µL
24x10 ⁵	65µL

Importante destacar que, toda a padronização do protocolo de infecção dessas células pelo DENV2 foi realizada em colaboração com o Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais, chefiado pela Dra. Ada Maria de Barcelos Alves.

3.8.2 Protocolo de infecção

O protocolo de infecção para Nunc™ Lab-Tek™ e para as placas de Petri foi realizado da seguinte forma: No dia anterior a infecção, as células foram plaqueadas na concentração desejada (concentrações descritas no subitem 3.8.1) em meio de cultura Schneider contendo 10% de soro fetal bovino e incubadas à 28°C, em estufa de cultura (lâminas Lab-Tek) ou em incubadoras Forlab (placas de Petri).

Vinte e quatro horas após o plaqueamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X para a retirada do soro fetal bovino – a fim de que não houvesse interferência do soro na infecção pelo vírus - e das células que não tivessem aderidas. Em seguida, as células foram incubadas apenas com meio de cultura Schneider (200µL para as lâminas Lab-Tek e 4mL para as placas de Petri) e o vírus - ou simplesmente meio de cultura Schneider sem soro, para as células controles - com agitação a cada 15 minutos até completar 1 hora. Dado o tempo de adsorção, o meio com o vírus foi descartado e as células foram incubadas com meio de cultura Schneider + 10% de soro fetal bovino à 28°C, por 3 (padronização) ou 4 dias (para

realização das curvas experimentais), sob regime LD12:12, para a realização dos experimentos.

3.8.3 Imunofluorescência indireta para detecção de células infectadas pelo DENV2

Três dias após a infecção, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e então fixadas em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,2M (pH 7,4) por 20 minutos, à temperatura ambiente e permeabilizadas com tampão de permeabilização (Anexo I) por 10 minutos, também a temperatura ambiente. Em seguida, foi realizado o bloqueio com tampão de bloqueio (Anexo I), por 15 minutos.

Para a detecção da proteína do envelope (E) do DENV2, foi utilizado anticorpo específico 3H5 (monoclonal anti-domínio III da proteína E) em uma diluição de 1:1000 em tampão de diluição (Anexo I), seguido da incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a FITC (Southern Biotech) em uma diluição de 1:100, em tampão de diluição. Ao final do preparo das lâminas, as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência modelo Nikon Eclipse 50i.

3.8.4 Citometria de fluxo para quantificar a porcentagem de células infectadas pelo DENV2.

Três dias (durante a padronização da infecção) ou 4 dias (para a realização das curvas experimentais) após a infecção, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X, coletadas utilizando tripsina 1X sem EDTA (Life Technologies), fixadas em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,2M e armazenadas em 1 mL de PBS 1X contendo penicilina-estreptomicina (100 U/mL-100µg/mL - Thermo Fisher), a 4°C até o momento do uso.

Para o processamento das amostras para a citometria de fluxo, 2×10^6 células Aag2 foram distribuídas em cada poço de uma placa de 96 poços com fundo V (Costar). As células foram incubadas com tampão de permeabilização/bloqueio

(Anexo I) por 30 minutos em gelo. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo específico 3H5 (1:1000) por 1h em gelo, e posteriormente incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à Alexa Fluor 488 (Southern Biotech) (1:500) por 1h, em gelo. As células foram suspensas em tampão de FACS (Anexo I), em tubos próprios para leitura.

A leitura da citometria foi realizada na Plataforma de Citometria – Fiocruz, no Citômetro de Fluxo – FACSAria (Becton & Dickinson Biosciences) e a análise dos dados foi realizada no programa *Summit V4.3 Build 2445*.

Em todas as três curvas experimentais, foram processadas duas placas de Petri para citometria (uma placa controle e uma placa infectada) para avaliação da porcentagem de células infectadas pelo DENV2 em cada curva.

3.9 Análise estatística

Para análise estatística dos dados de expressão gênica, foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0 com o teste ANOVA (One Way), onde foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

4 – RESULTADOS

Por não haver dados de expressão dos genes de relógio em células da linhagem Aag2 descritos na literatura, realizamos reações de RT-PCR utilizando cDNA dessas células sintetizados em dois diferentes pontos do dia (ZT5 e ZT17). Esses dois pontos foram escolhidos porquê de acordo com Gentile e colaboradores (2009), são nestes dois momentos que a maior parte dos genes de relógio apresentam seu pico de expressão em mosquitos *Ae. aegypti*.

Como pode-se observar na figura 4.1, os principais genes do relógio descritos em *Ae. aegypti* - *period*, *timeless*, *vri*, *cryptochrome 2*, *clockwork orange*, *E75* (prováveis repressores transcricionais), *Clock*, *cycle*, *Par domain protein 1* (prováveis ativadores transcricionais) e *cryptochrome 1* (fotorreceptor) – são expressos em ambos os ZTs. Os tamanhos das bandas esperadas variaram de 80pb (*cwo*) a 200 pb (*tim*). Como controle negativo da PCR, foram utilizados para cada gene, mix de reação sem cDNA.

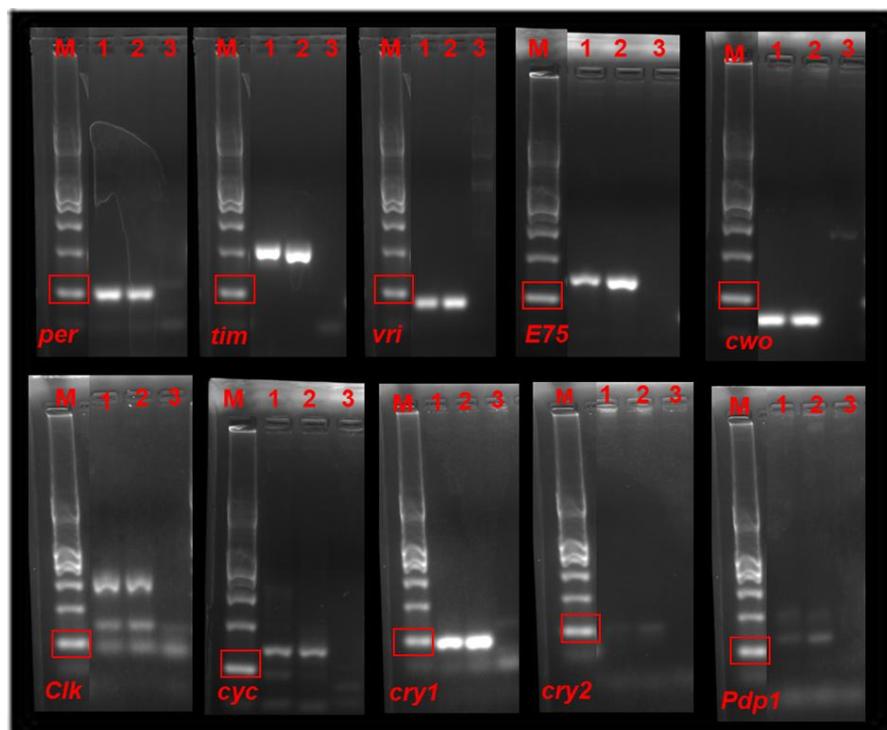


Figura 4.1: Avaliação da presença dos genes de relógio em células Aag2 através de RT- PCR por eletroforese em gel de agarose 2,5%. M: marcador de peso molecular (100pb - Promega). 1: Amostras coletadas no ZT5; 2: Amostras coletadas no ZT17; 3: Controle negativo da PCR. As bandas de 100pb estão indicadas na figura pelos retângulos vermelhos.

Uma vez que os genes de relógio estavam expressos nessas células, fomos investigar se a expressão destes genes apresentava um perfil circadiano. Realizamos então ensaios de PCR quantitativo em tempo real em dois fotoperíodos distintos: LD12:12 e DD.

Para a coleta dos pontos, as células foram submetidas ao regime desejado por 3 dias e após este período foram coletadas em intervalos de 4 em 4 horas, até completar 24 horas, sendo os pontos coletados: ZT1, ZT5, ZT9, ZT13, ZT17 e ZT21 (no regime LD12:12) e CT1, CT5, CT9, CT13, CT17 e CT21 (em regime DD). Em ambos regimes, os dez genes canônicos do relógio circadiano foram analisados. A cada ponto coletado, as placas foram colocadas em isopor com gelo por 10 minutos para que sua atividade metabólica fosse estagnada e então seguiu-se a análise molecular para realização da reação de PCR quantitativo em tempo real.

4.1 Perfil de expressão dos genes de relógio em células Aag2 mantidas em LD12:12

Para a análise da expressão gênica diária no regime de LD12:12, os experimentos foram realizados em quatro réplicas biológicas. Dos dez genes analisados, apenas *period* apresentou expressão cíclica, com pico de expressão no ZT1 (Figura 4.2, Tabela 4.1). Já os outros nove genes analisados não apresentaram expressão cíclica nessas células (Figuras 4.3 e 4.4, Tabela 4.1), isto é, são arrítmicos, embora pareçam estar amplamente expressos nas células Aag2. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $P < 0,05$.

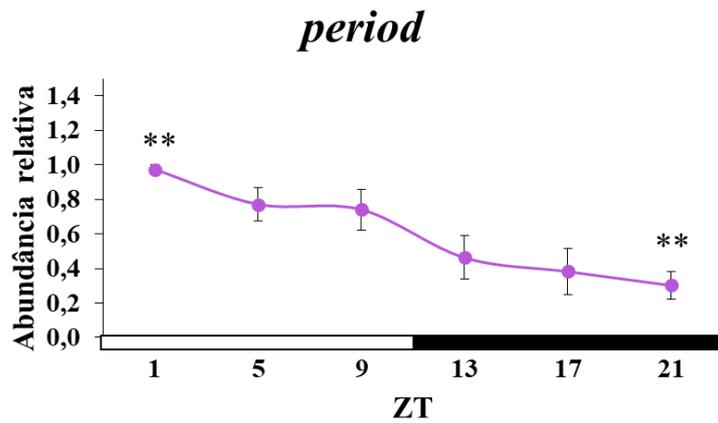


Figura 4.2: Expressão diária dos genes de relógio em células Aag2 avaliada por PCR quantitativo em tempo real. O gráfico mostra a expressão de *period* nessas células em ciclos de 12 horas de claro e 12 horas de escuro (LD12:12). O eixo y indica a abundância relativa de RNAm e o eixo x, o Zeitgeber (ZT), onde a barra branca representa a fase clara do regime claro/escuro e a barra preta, a fase escura. O ZT1 representa uma hora após o acender das luzes e o ZT13, uma hora após o apagar das luzes. As barras verticais representam o erro padrão. O gráfico foi obtido através da média de quatro experimentos independentes. A análise de dados foi realizada utilizando o teste paramétrico ANOVA One Way. Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significativas (** $p < 0,01$).

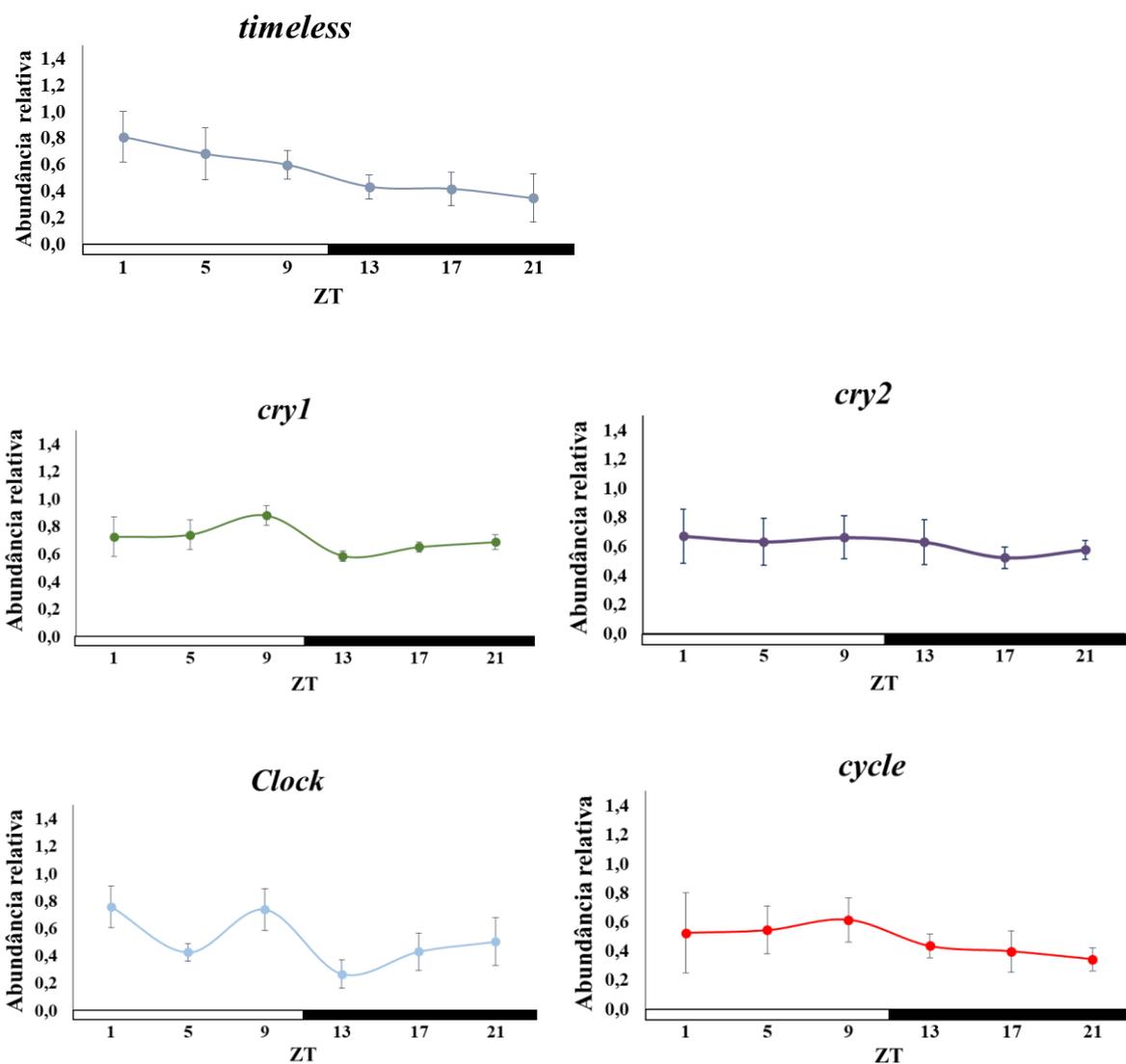


Figura 4.3: Expressão diária dos genes de relógio em células Aag2, avaliada por PCR quantitativo em tempo real. O gráfico mostra a expressão de *tim*, *cry1*, *cry2*, *Clk* e *cyc* nessas células em ciclos de 12 horas de claro e 12 horas de escuro (LD12:12). O eixo y indica a abundância relativa de RNAm e o eixo x o Zeitgeber (ZT), onde a barra branca representa a fase clara do regime claro/escuro e a barra preta, a fase escura. O ZT1 representa uma hora após o acender das luzes e o ZT13, uma hora após o apagar das luzes. As barras verticais representam o erro padrão. Os gráficos foram obtidos através da média de quatro experimentos independentes. A análise de dados foi realizada utilizando o teste paramétrico ANOVA One Way.

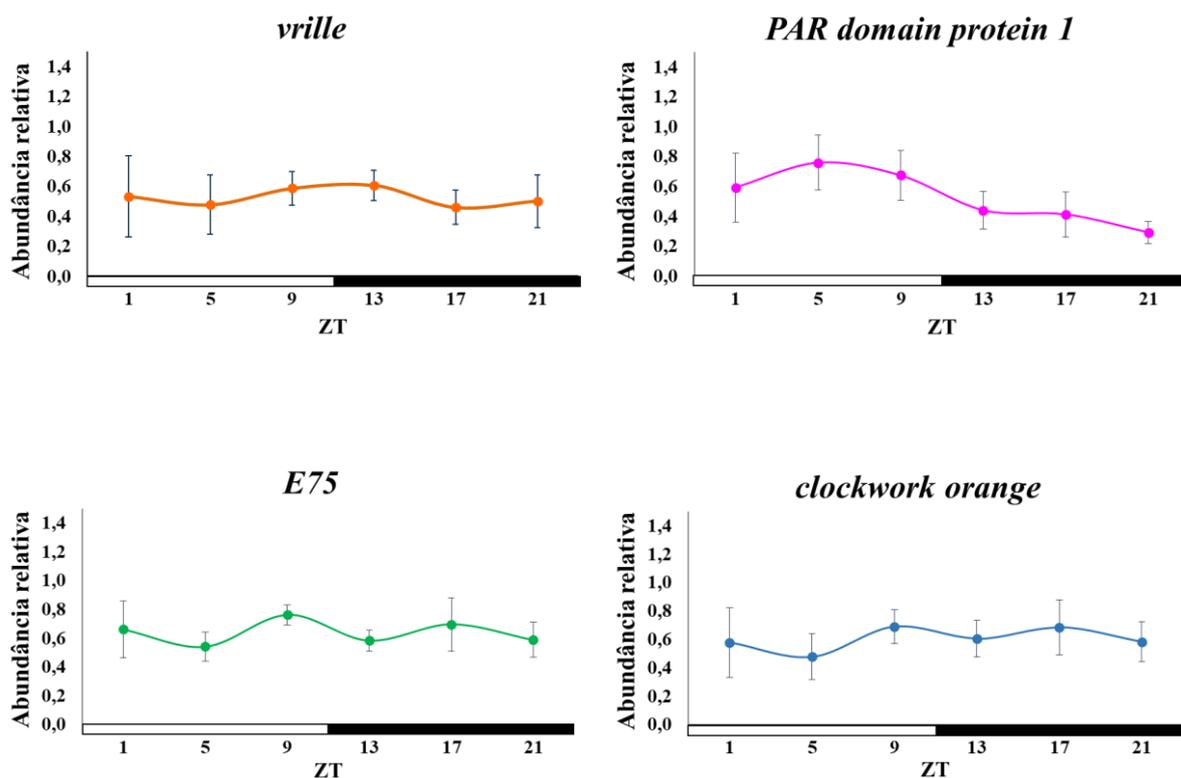


Figura 4.4: Expressão diária dos genes de relógio em células Aag2 avaliada por PCR quantitativo em tempo real. O gráfico mostra a expressão de *vri*, *pdp1*, *E75* e *cwo* nessas células em ciclos de 12 horas de claro e 12 horas de escuro (LD12:12). O eixo y indica a abundância relativa de RNAm e o eixo x o Zeitgeber (ZT), onde a barra branca representa a fase clara do regime claro/escuro e a barra preta, a fase escura. O ZT1 representa uma hora após o acender das luzes e o ZT13, uma hora após o apagar das luzes. As barras verticais representam o erro padrão. Os gráficos foram obtidos através da média de quatro experimentos independentes. A análise de dados foi realizada utilizando o teste paramétrico ANOVA One Way.

Tabela 4.1 – Análise de variância (ANOVA One-Way) da expressão diária dos genes de relógio nas células Aag2 de *Ae. aegypti* em LD12:12.

Gene	F	P
<i>per</i>	$F_{5,24} = 4.674$	0.0066
<i>tim</i>	$F_{5,24} = 1.027$	0.4315(NS)
<i>Clk</i>	$F_{5,24} = 2.063$	0.1178(NS)
<i>cyc</i>	$F_{5,24} = 0.6804$	0.6440(NS)
<i>vri</i>	$F_{5,24} = 0.5379$	0.7451(NS)
<i>Pdp1</i>	$F_{5,24} = 0.7137$	0.6212(NS)
<i>cry1</i>	$F_{5,24} = 1.002$	0.4445(NS)
<i>cry2</i>	$F_{5,24} = 0.6942$	0.9961 (NS)
<i>cwo</i>	$F_{5,24} = 0.3985$	0.8434(NS)
<i>E75</i>	$F_{5,24} = 0.3183$	0.8955(NS)

NS= não significativo (arritmico)

4.2 Perfil de expressão dos genes de relógio em células Aag2 mantidas em DD

Para investigarmos o perfil de expressão circadiano na ausência de sincronizador ambiental (isto é, com células mantidas em escuro constante), realizamos três experimentos independentes onde, todos os dez genes analisados apresentaram um perfil de expressão arritmico (Figuras 4.5 e 4.6, Tabela 4.2). Até mesmo o gene *per*, que em LD12:12 apresentou expressão cíclica, perdeu o seu perfil de ciclagem quando as células foram submetidas a escuro constante. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $P < 0,05$.

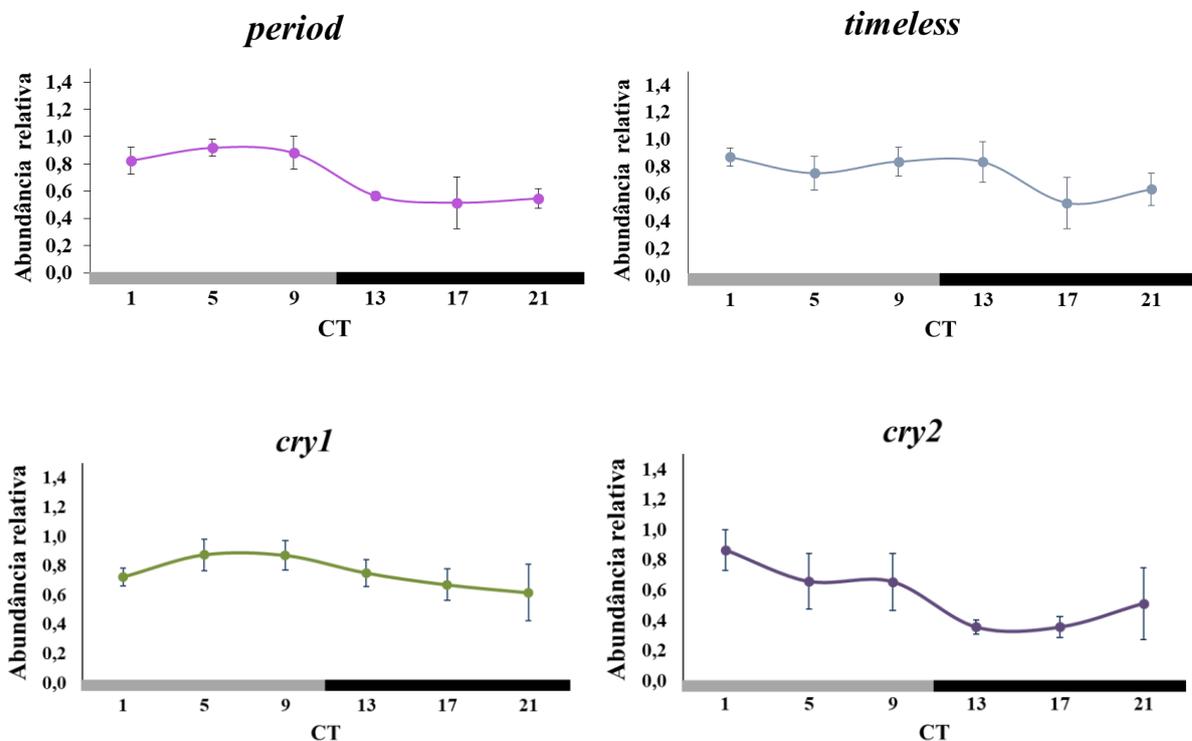


Figura 4.5: Expressão circadiana dos genes de relógio em células Aag2 avaliada por PCR quantitativo em tempo real. O gráfico mostra a expressão de *per*, *tim*, *cry1* e *cry2* nessas células em escuro constante (DD). O eixo y indica a abundância relativa de RNAm e o eixo x, o CT (do inglês *Circadian Time*), onde o CT1 representa a primeira hora do dia subjetivo e o CT13 representa a primeira hora da noite subjetiva. A barra cinza representa o dia subjetivo e a barra preta, a noite subjetiva. As barras verticais representam o erro padrão. Os gráficos foram obtidos através da média de três experimentos independentes. A análise de dados foi realizada utilizando o teste paramétrico ANOVA One Way.

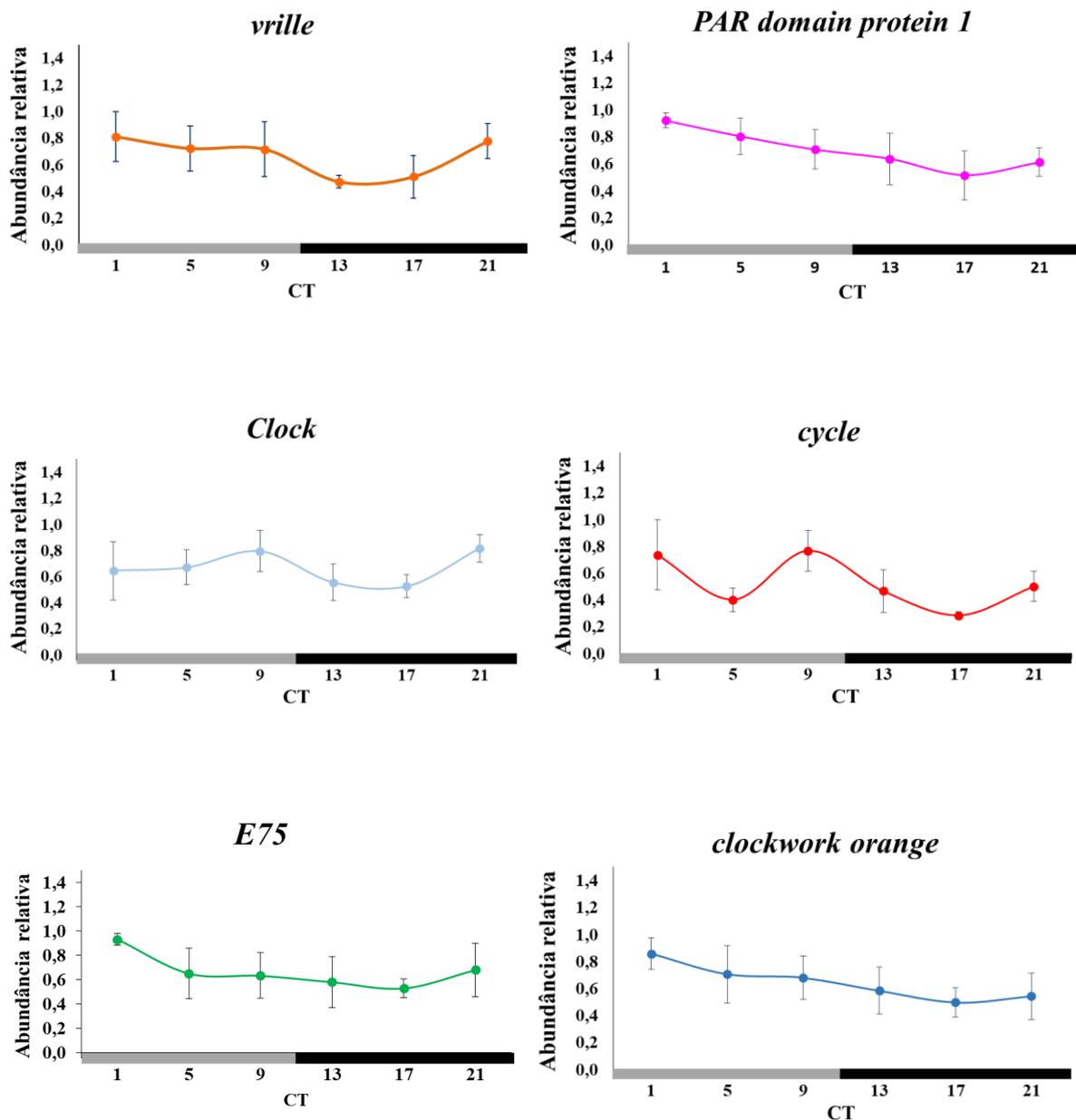


Figura 4.6: Expressão circadiana dos genes de relógio em células Aag2, avaliada por PCR quantitativo em tempo real. O gráfico mostra a expressão de *vri*, *pdp1*, *Clk*, *cyc*, *E75* e *cwo* nessas células em escuro constante (DD). O eixo y indica a abundância relativa de RNAm e o eixo x o CT (do inglês *Circadian Time*), onde o CT1 representa a primeira hora do dia subjetivo e o CT13 representa a primeira hora da noite subjetiva. A barra cinza representa o dia subjetivo e a barra preta, a noite subjetiva. As barras verticais representam o erro padrão. Os gráficos foram obtidos através da média de três experimentos independentes. A análise de dados foi realizada utilizando o teste paramétrico ANOVA One Way.

Tabela 4.2 – Análise de variância (ANOVA One-Way) da expressão circadiana de genes do relógio nas células Aag2 de *Ae. aegypti* em DD.

Gene	F	P
<i>per</i>	$F_{5,18} = 2.641$	0.0781(NS)
<i>tim</i>	$F_{5,18} = 1.371$	0.3017(NS)
<i>Clk</i>	$F_{5,18} = 0.5636$	0.7264(NS)
<i>cyc</i>	$F_{5,18} = 1.057$	0.4299(NS)
<i>vri</i>	$F_{5,18} = 0.7233$	0.6188(NS)
<i>Pdp1</i>	$F_{5,18} = 1.140$	0.3918(NS)
<i>cry1</i>	$F_{5,18} = 0.9444$	0.4874(NS)
<i>cry2</i>	$F_{5,18} = 1.544$	0.2485(NS)
<i>cwo</i>	$F_{5,18} = 0.5627$	0.7270(NS)
<i>E75</i>	$F_{5,18} = 0.5146$	0.7606(NS)

NS= não significativo (arritmico)

4.3 Padronização da infecção das células Aag2 pelo DENV2

Para decidirmos qual seria a melhor cepa viral para utilizarmos, capaz de infectar a linhagem Aag2, sem levar à lise celular, repicamos em três lâminas Nunc™ Lab-Tek™ 4×10^4 células e as infectamos com os vírus dengue sorotipo 2: NGC, 44/2, e BR/RJ66985/2000. Usamos 40µL, 100µL e 200µL de cada amostra.

No dia seguinte ao plaqueamento, observamos que as células haviam se multiplicado em excesso, o que para a infecção, não é o indicado, pois as células permaneceriam 3 dias em cultura. Entretanto, nós infectamos as células com os volumes de diluição supracitados, e após três dias, processamos as amostras para imunofluorescência.

Dos três vírus, o NGC e o BR/RJ66985/2000 infectaram uma quantidade maior de células, mesmo na menor diluição viral, quando comparamos à cepa 44/2 (Figuras 4.7 – 4.9). Como ambos os vírus infectaram de forma eficiente as células, optamos por utilizar a cepa BR/RJ66985/2000, cujo vírus foi isolado de um paciente com dengue no Rio de Janeiro no ano 2000 e não passou por neuroadaptação a camundongo (Salomão *et al.*, 2018).

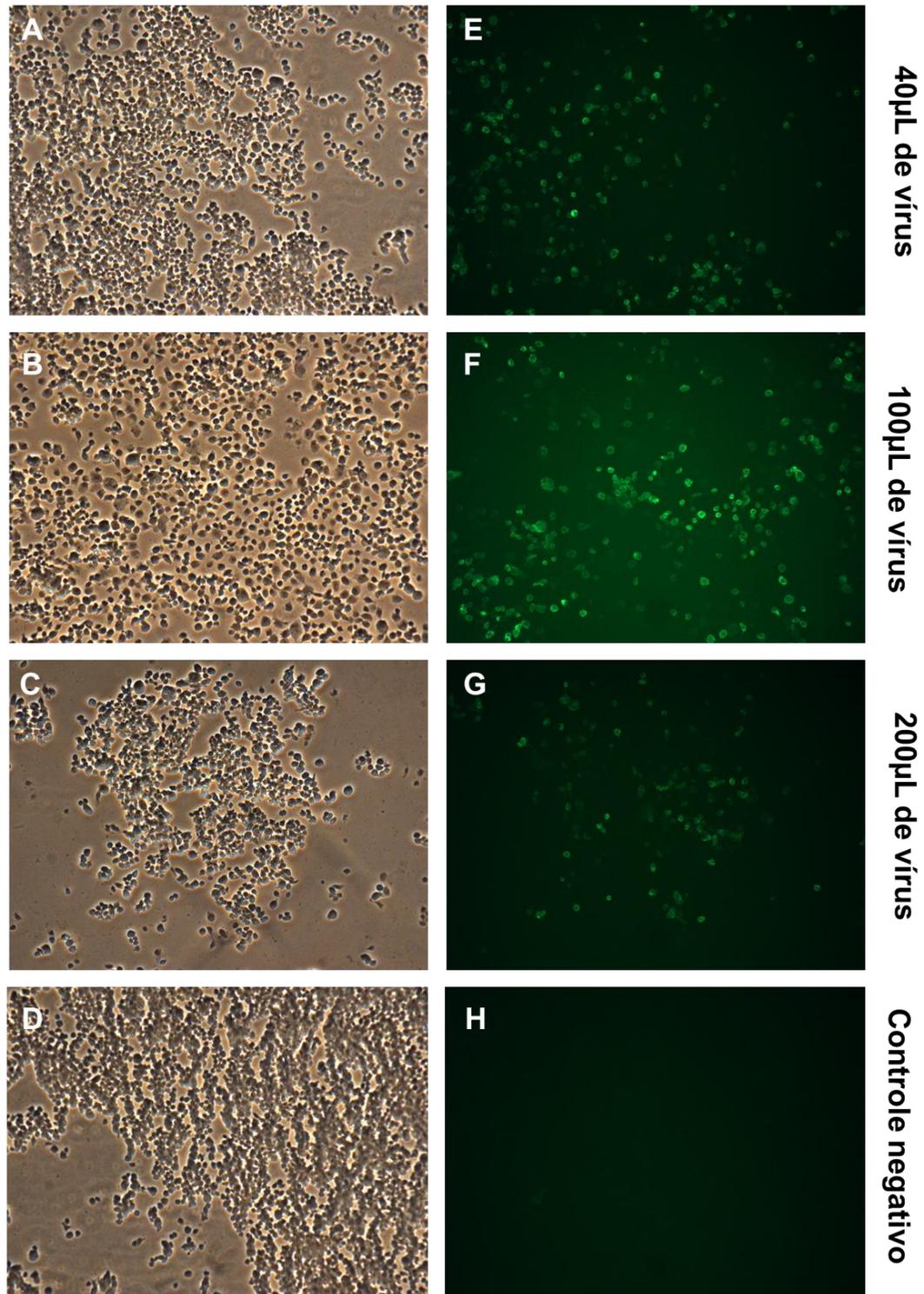


Figura 4.7: Células Aag2 (4×10^4) infectadas com a cepa 44/2 e analisadas por microscopia de fluorescência. Foram plaqueadas 4×10^4 células por poço da Lab-Tek, e um dia após o plaqueamento as células foram infectadas por 1h com DENV2 (cepa 44/2) em diferentes diluições. A-D: Contraste de fase. E-H: imunofluorescência para a detecção da proteína E do envelope viral do DENV utilizando anticorpo específico 3H5. D e H: células não infectadas. Aumento de 200X.

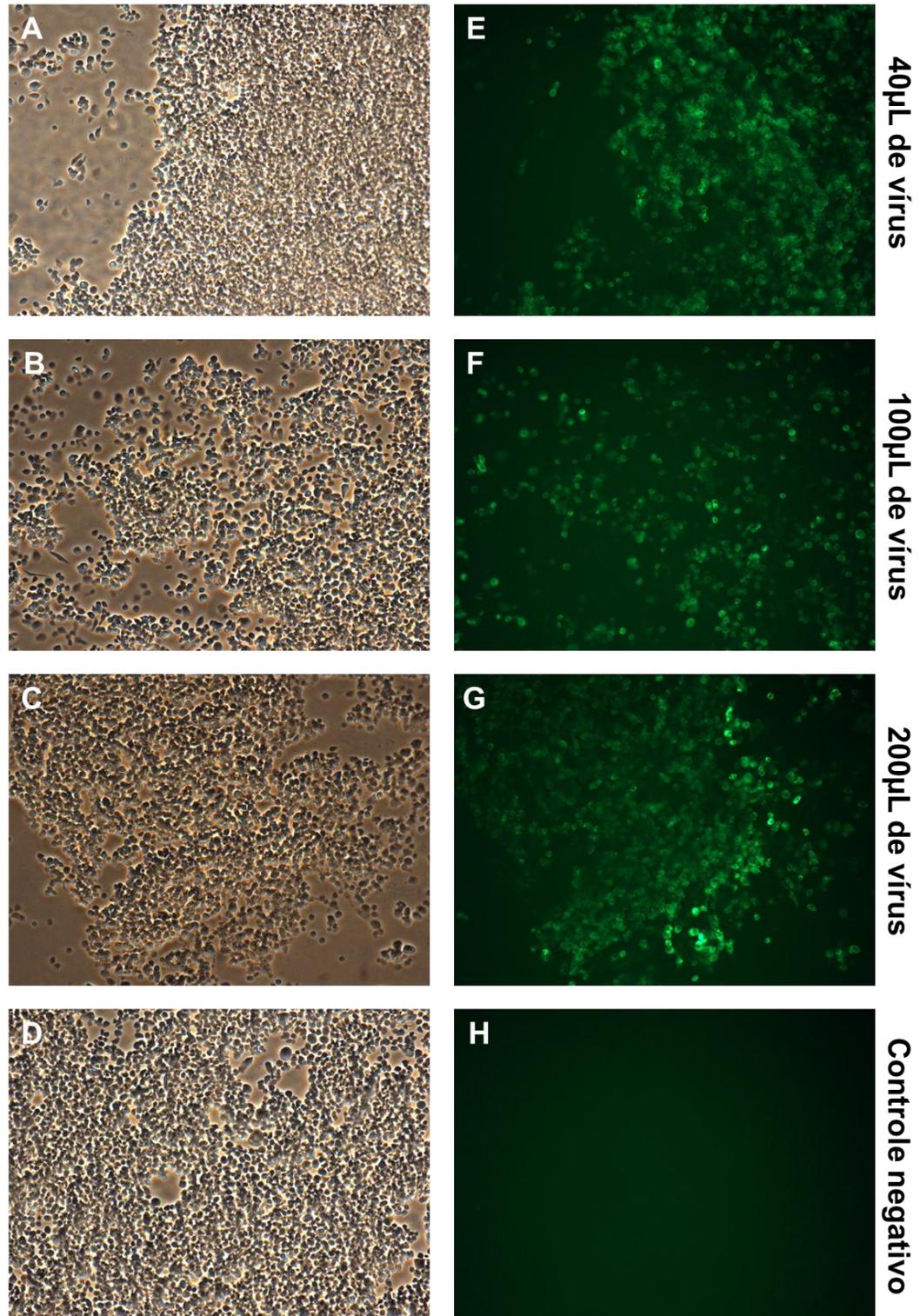


Figura 4.8: Células (4×10^4) infectadas com a cepa NGC e analisadas por microscopia de fluorescência. Foram plaqueadas 4×10^4 células por poço da Lab-Tek, e um dia após o plaqueamento as células foram infectadas por 1h com DENV2 (cepa NGC) em diferentes diluições. A-D: Contraste de fase. E-H: imunofluorescência para a detecção da proteína E do envelope viral do DENV utilizando anticorpo específico 3H5. D e H: células não infectadas. Aumento de 200X.

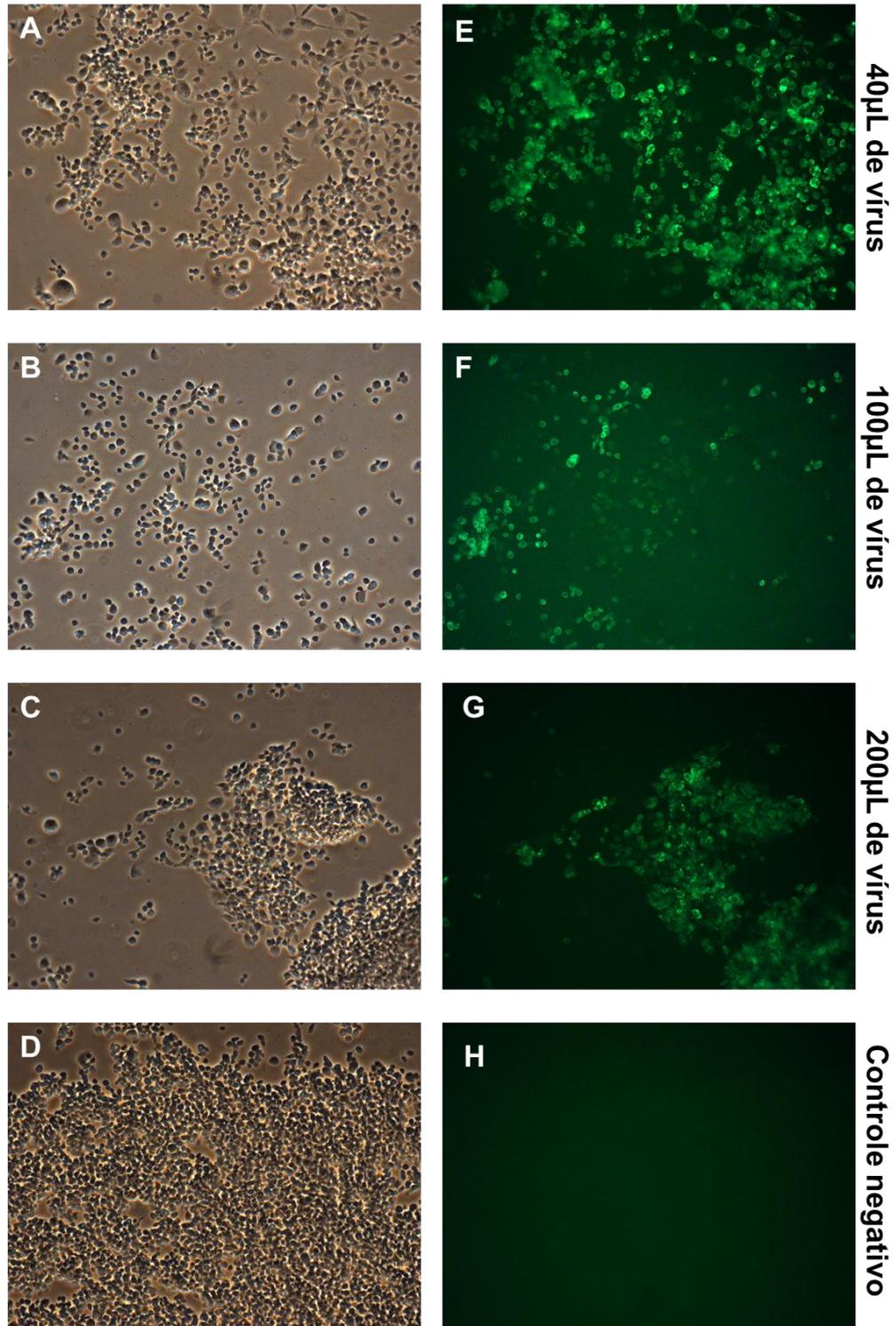


Figura 4.9: Células (4×10^4) infectadas com a cepa BR/RJ66985/2000 e analisadas por microscopia de fluorescência. Foram plaqueadas 4×10^4 células por poço da lâmina Lab-Tek, e um dia após o plaqueamento as células foram infectadas por 1h com DENV2 (cepa BR/RJ66985/2000) em diferentes diluições. A-D: Contraste de fase. E-H: imunofluorescência para a detecção da proteína E do envelope viral do DENV utilizando anticorpo específico 3H5. D e H: células não infectadas. Aumento de 200X.

Após a escolha da cepa viral a ser utilizada, nós realizamos novos experimentos para determinar a diluição do vírus e concentração de células a serem utilizadas nos experimentos.

Repetimos os experimentos nas lâminas Lab-Tek utilizando 10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 e 4×10^4 células por poço, e volumes menores do vírus BR/RJ66985/2000, conforme descritos na tabela 3.6 (seção 3.8.1). Inicialmente, avaliamos concentrações celulares menores que a utilizada anteriormente (10^4 e 2×10^4), entretanto ocorreu muita morte celular após 3 dias de infecção, não sendo possível processar as lâminas para imunofluorescência. Dessa forma, aumentamos a quantidade de células (3×10^4 e 4×10^4) e reduzimos a concentração viral.

Três dias após a infecção as lâminas foram coletadas para imunofluorescência, e em todas as concentrações virais analisadas, o vírus BR/RJ66985/2000 foi capaz de infectar grande parte das células (figuras 4.10 e 4.11).

Já para as placas, palqueamos 6×10^5 , 12×10^5 , 18×10^5 e 24×10^5 , e utilizamos os volumes de diluição para os vírus equivalentes aos da Lab-tek, descritos na tabela 3.7 (seção 3.8.1).

As células contidas nas placas foram coletadas e processadas para citometria de fluxo (Figura 4.12). Pode-se observar que utilizando $130 \mu\text{L}$ ou $65 \mu\text{L}$ de vírus, a porcentagem de células infectadas foi praticamente a mesma para quase todas as concentrações celulares avaliadas. Curiosamente, nas placas onde foram repicadas 12×10^5 células, somente 18,9% das células foram infectadas (Figura 4.12).

Diante desses resultados, resolvemos repicar 24×10^5 células/10mL nas placas e $65 \mu\text{L}$ de vírus, o que corresponde a concentração viral de $6,5 \times 10^{10}$ TCID₅₀/10 mL para a realização dos experimentos. Porém, tivemos dificuldades em quantificar o RNA após a coleta das placas, uma vez que ao decorrer dos experimentos percebemos que a ausência de soro a que as células foram submetidas durante o protocolo de infecção era danoso. Aparentemente esse choque de soro fazia com que a divisão celular fosse consideravelmente diminuída ou até mesmo parecia ocasionar morte celular. Assim aumentamos um dia dessas células na incubadora, coletando-as

quatro dias após a infecção, justamente para que essas células tivessem um dia a mais para se dividirem.

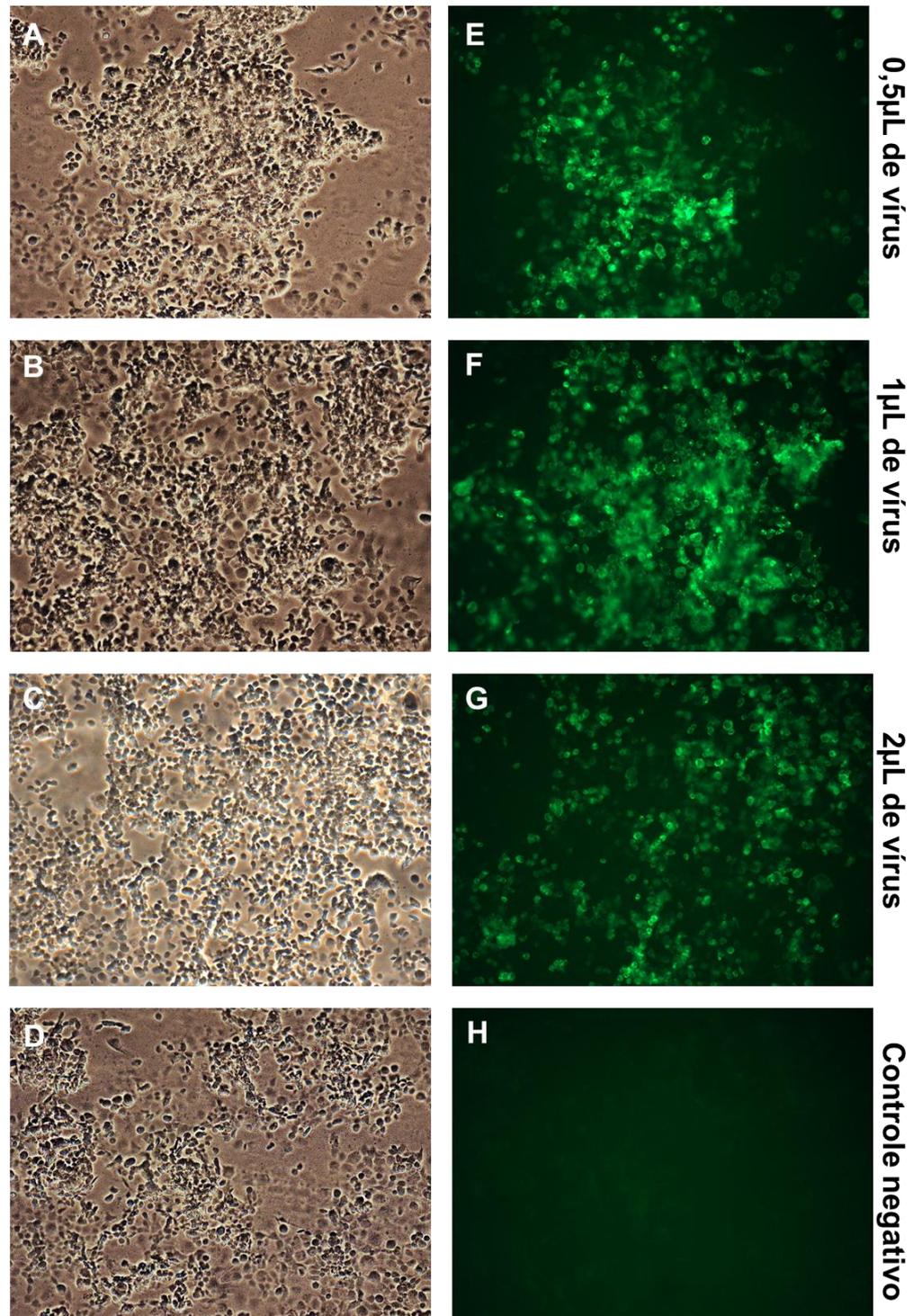


Figura 4.10: Células (3×10^4) infectadas com a cepa BR/RJ66985/2000 e analisadas por microscopia de fluorescência. Foram plaqueadas 3×10^4 células por poço da lâmina Lab-Tek, e um dia após o plaqueamento as células foram infectadas por 1h com DENV2 (cepa BR/RJ66985/2000) em diferentes diluições. A-D: Contraste de fase. E-H: imunofluorescência para a detecção da proteína E do envelope viral do DENV utilizando anticorpo específico 3H5. D e H: células não infectadas. Aumento de 200X.

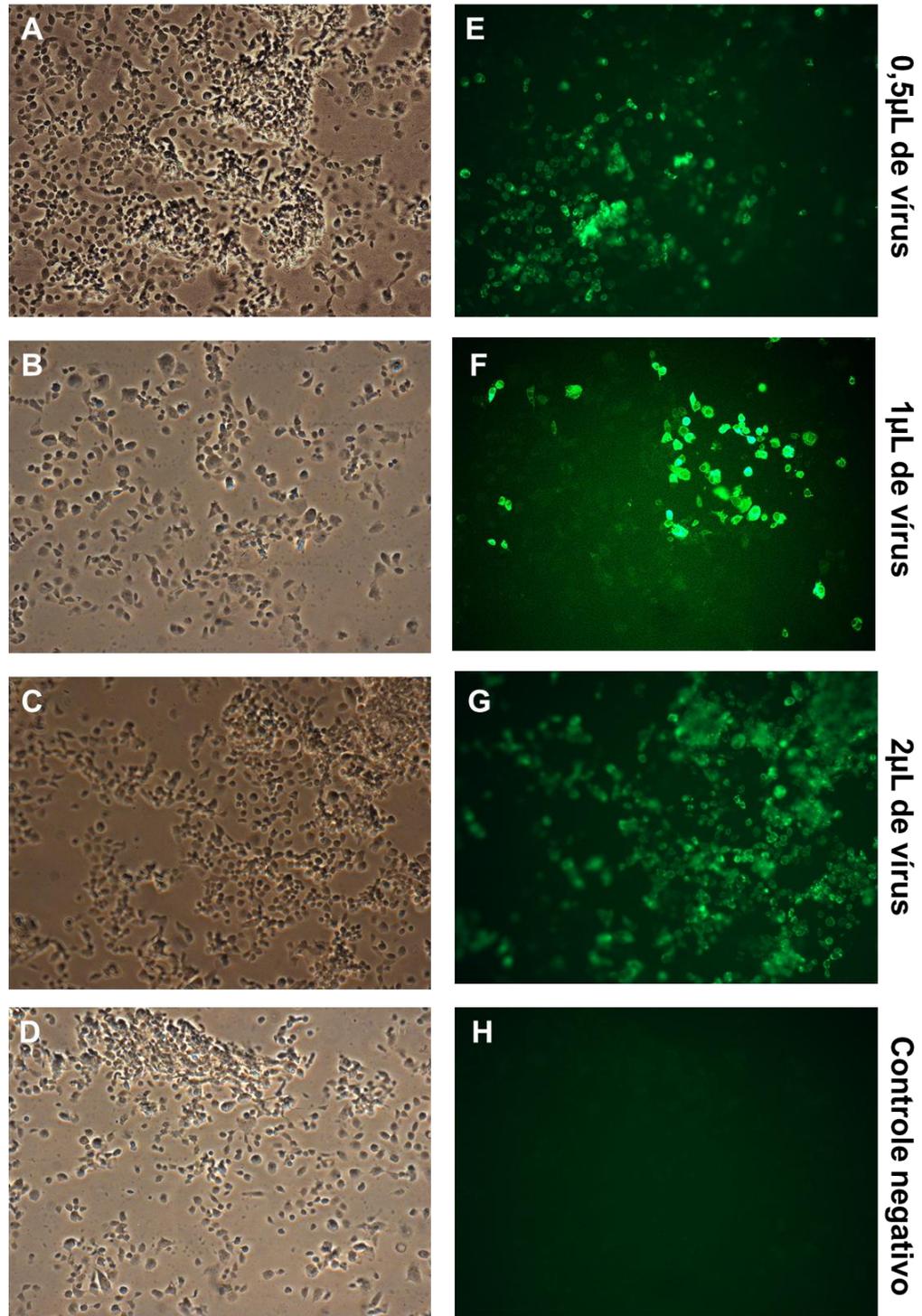


Figura 4.11: Células (4×10^4) infectadas com a cepa BR/RJ66985/2000 e analisadas por microscopia de fluorescência. Foram plaqueadas 4×10^4 células por poço da Lab-Tek, e um dia após o plaqueamento as células foram infectadas por 1h com DENV2 (cepa BR/RJ66985/2000) em diferentes diluições. A-D: Contraste de fase. E-H: imunofluorescência para a detecção da proteína E do envelope viral do DENV utilizando anticorpo específico 3H5. D e H: células não infectadas. Aumento de 200X.

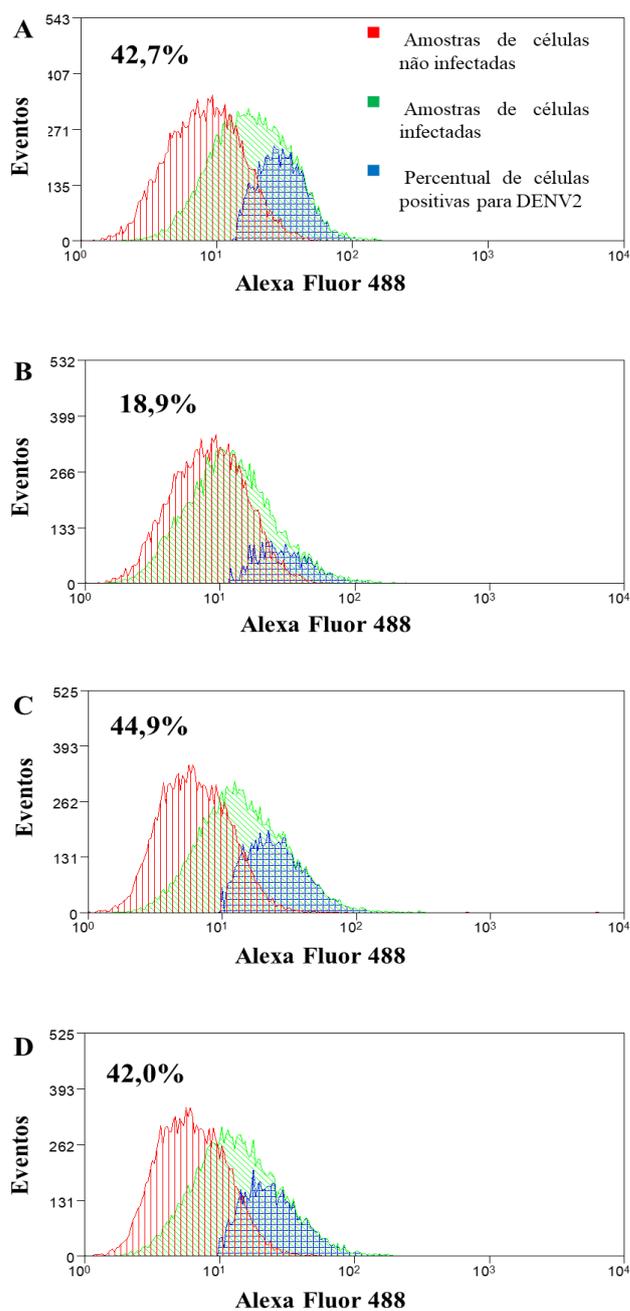


Figura 4.12: Citometria de fluxo para avaliar a porcentagem de células Aag2 infectadas pelo DENV2 BR/RJ66985/2000. Os gráficos representam diferentes concentrações de células Aag2 infectadas por duas diferentes diluições de vírus: A - 6×10^5 células/10mL (130 μ L de vírus); B - 12×10^5 células/10mL (130 μ L de vírus); C - 18×10^5 células/10mL (65 μ L de vírus); D - 24×10^5 células/10mL (65 μ L de vírus). O número em preto informa a porcentagem das células da cultura que são positivas para a presença do vírus BR/RJ66985/2000. A região em vermelho representa o total de células não infectadas. Em verde, amostra de células infectadas. A região azul representa as células positivas para DENV2 dentro das amostras infectadas (verde). No eixo y, o número de eventos, e no eixo x, a fluorescência emitida.

4.4 Perfil de expressão dos genes de relógio em células infectadas pelo DENV2 em LD12:12

Após a padronização da infecção das células Aag2, foram realizados três experimentos independentes para análise do perfil de expressão dos genes de relógio nestas células, infectadas e não infectadas pelo DENV2, no fotoperíodo de 12 horas de claro, seguidos de 12 horas de escuro (LD12:12).

Dos dez genes analisados (*per*, *tim*, *cry1*, *cry2*, *vri*, *Pdp1*, *Clk*, *cyc*, *E75* e *cwo*), nenhum apresentou um perfil de expressão cíclico, nas células infectadas pelo DENV2 (Figuras 4.13, 4.14, Tabelas 4.3 e 4.4). Entretanto nas células controles do experimento (não infectadas), os genes de relógio também não apresentaram um perfil cíclico.

Como controle da infecção dessas células pelo DENV2, a cada experimento independente realizado, foi avaliada a porcentagem de células infectadas pelo vírus BR/RJ66985/2000, por citometria de fluxo. O percentual de células infectadas foi 25,6%, 26,4% e 35,7%, nas curvas experimentais 1, 2 e 3 respectivamente.

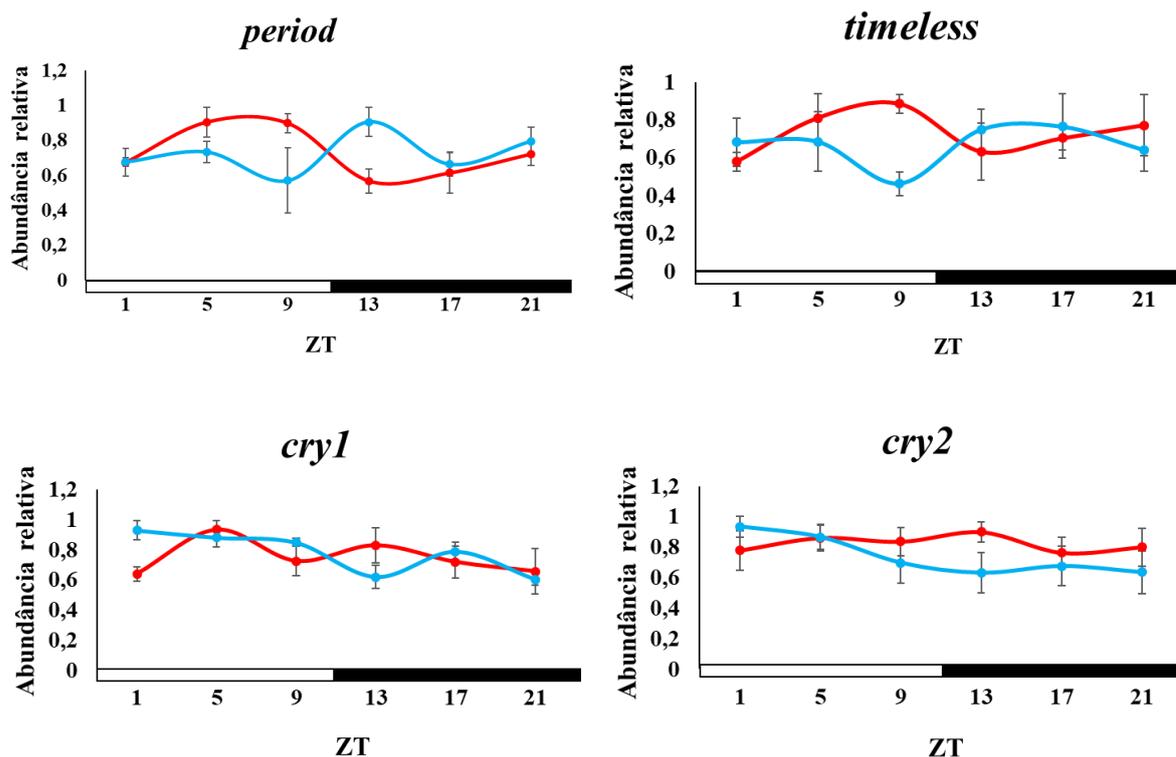


Figura 4.13: Expressão diária dos genes de relógio em células Aag2 infectadas e não infectadas pelo DENV2 avaliada por PCR quantitativo em tempo real. O gráfico mostra a expressão de *per*, *tim*, *cry1* e *cry2* nessas células em 12 horas de claro e 12 horas de escuro (LD12:12). O eixo y indica a abundância relativa de RNAm e o eixo x, o Zeitgeber (ZT), onde a barra branca representa a fase clara do regime claro/escuro e a barra preta, a fase escura. O ZT1 representa uma hora após o acender das luzes e o ZT13, uma hora após o apagar das luzes. As linhas em vermelho representam a expressão dos genes de relógio em células infectadas pelo DENV2, e em azul, células não infectadas (controles negativos do experimento). As barras verticais representam o erro padrão. Os gráficos foram obtidos através da média de três experimentos independentes. A análise de dados foi realizada utilizando o teste paramétrico ANOVA One Way.

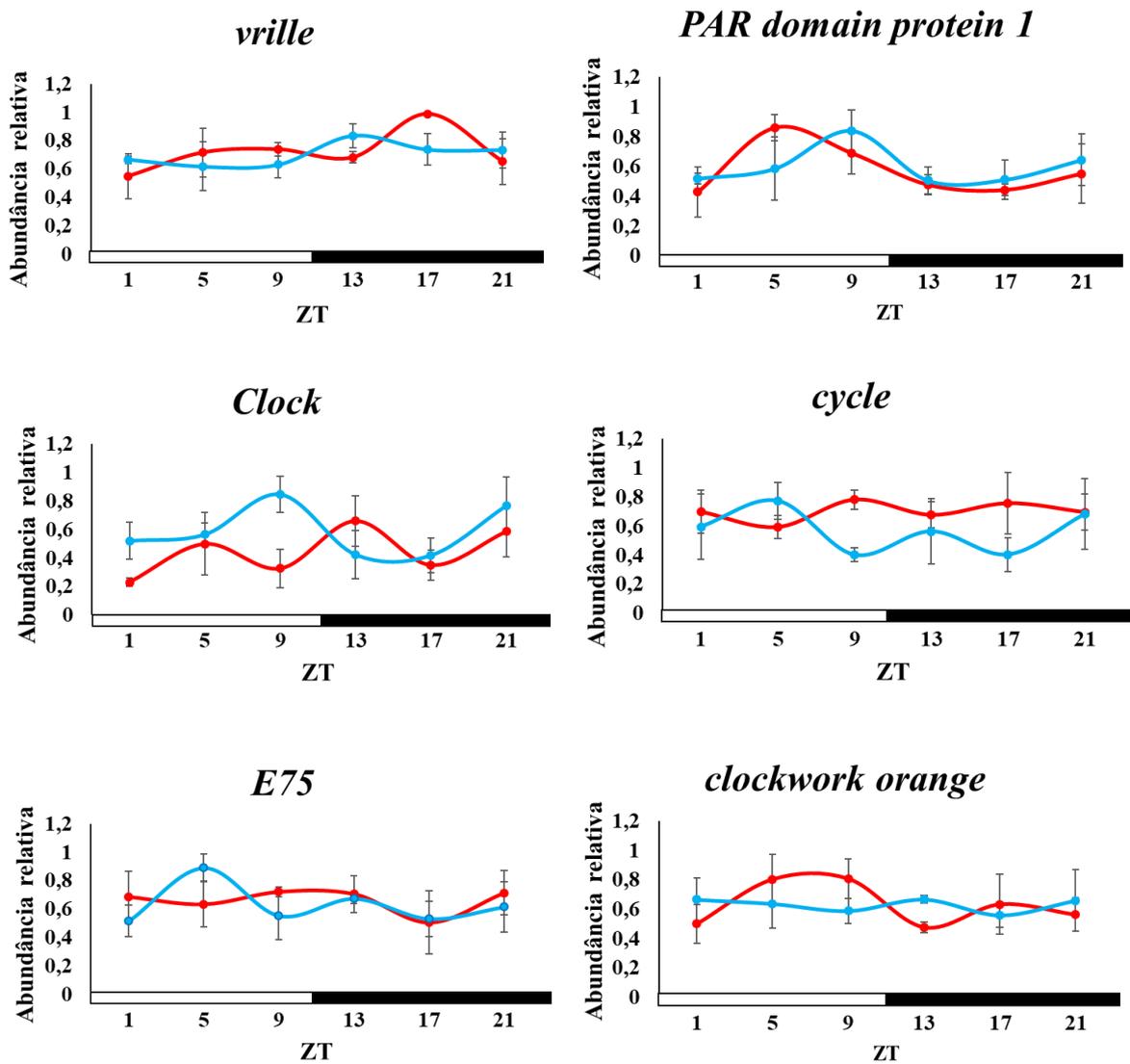


Figura 4.14: Expressão diária dos genes de relógio em células Aag2 infectadas e não infectadas pelo DENV2 avaliada por PCR quantitativo em tempo real. O gráfico mostra a expressão de *vri*, *Pdp1*, *Clk*, *cyc*, *E75* e *cwo* nessas células em 12 horas de claro e 12 horas de escuro (LD12:12). O eixo y indica a abundância relativa de RNAm e o eixo x o Zeitgeber (ZT), onde a barra branca representa a fase clara do regime claro/escuro e a barra preta a fase escura. O ZT1 representa uma hora após o acender das luzes e o ZT13 uma hora após o apagar das luzes. As linhas em vermelho representam a expressão dos genes de relógio em células infectadas pelo DENV2, e em azul, células não infectadas (controles negativos do experimento). As barras verticais representam o erro padrão. Os gráficos foram obtidos através da média de três experimentos independentes. A análise de dados foi realizada utilizando o teste paramétrico ANOVA One Way.

Tabela 4.3– Análise de variância (ANOVA One-Way) da expressão diária dos genes de relógio nas células Aag2 de *Ae. aegypti* em LD12:12 infectadas pelo DENV2.

Gene	F	P
<i>per</i>	$F_{5,18} = 1.991$	0.1524(NS)
<i>tim</i>	$F_{5,18} = 0.7383$	0.6091(NS)
<i>Clk</i>	$F_{5,18} = 0.9069$	0.5079(NS)
<i>cyc</i>	$F_{5,18} = 0.1426$	0.9786(NS)
<i>vri</i>	$F_{5,18} = 0.9753$	0.4710(NS)
<i>Pdp1</i>	$F_{5,18} = 1.306$	0.3248(NS)
<i>cry1</i>	$F_{5,18} = 0.8023$	0.5691 (NS)
<i>cry2</i>	$F_{5,18} = 0.4028$	0.8378 (NS)
<i>cwo</i>	$F_{5,18} = 0.5701$	0.7219(NS)
<i>E75</i>	$F_{5,18} = 0.4677$	0.7939(NS)

NS = Não significativo (arritmico).

Tabela 4.4 – Análise de variância (ANOVA One-Way) da expressão diária dos genes de relógio nas células Aag2 de *Ae. aegypti* não infectadas (controles) em LD12:12.

Gene	F	P
<i>per</i>	$F_{5,18} = 1.328$	0.3167(NS)
<i>tim</i>	$F_{5,18} = 0.5356$	0.7459(NS)
<i>Clk</i>	$F_{5,18} = 0.9777$	0.4697(NS)
<i>cyc</i>	$F_{5,18} = 0.2644$	0.9240(NS)
<i>vri</i>	$F_{5,18} = 0.4772$	0.7866(NS)
<i>Pdp1</i>	$F_{5,18} = 0.3930$	0.8443(NS)
<i>cry1</i>	$F_{5,18} = 0.7383$	0.6091(NS)
<i>cry2</i>	$F_{5,18} = 2.647$	0.0776(NS)
<i>cwo</i>	$F_{5,18} = 0.09333$	0.9917(NS)
<i>E75</i>	$F_{5,18} = 0.8119$	0.5633(NS)

NS = Não significativo (arritmico)

5 – DISCUSSÃO

O perfil de expressão dos genes de relógio na cabeça de fêmeas virgens de *Ae. aegypti*, - que são vetores de grande importância médica – foi descrito por Gentile e colaboradores em 2009 e se destaca do modelo *Drosophila melanogaster* em diferentes aspectos, tais como o perfil de expressão cíclico do gene *cycle* e a presença de uma segunda forma do gene *cryptochrome (cry2)*. No entanto, a ausência de mutantes conhecidos para estes genes, associado ao baixo sucesso no silenciamento dos genes de relógio por RNAi nestes insetos (Das e Dimopoulos, 2008; Gentile *et al*, 2013), torna a pesquisa acerca do relógio circadiano molecular uma tarefa mais descritiva do que funcional.

Por isso, uma alternativa encontrada pelo nosso grupo para realizar estudos funcionais sobre o relógio circadiano em *Aedes aegypti* foi utilizar a linhagem celular Aag2, proveniente da própria espécie. Deste modo, realizamos reações de RT PCR para que pudéssemos confirmar que de fato, os genes de relógio estão expressos nessas células. Após esta constatação, caracterizamos o perfil de expressão desses genes por qPCR, primeiramente fazendo a sincronização aos ciclos de claro/escuro.

Quando as células da linhagem Aag2 estão submetidas ao ciclo de claro/escuro, apenas um gene é ciclicamente expresso: *period*, com pico de expressão durante a fase clara. Os outros genes de relógio, que em cabeças de fêmeas de mosquito são rítmicos (Gentile *et al*, 2009), em células Aag2 apresentam expressão arritmica.

Interessantemente, *per* apresenta um perfil de expressão completamente diferente do que é visto no mosquito e em outras espécies de insetos, como *Drosophila*, borboletas e formigas (Zhu *et al*, 2008; Gentile *et al*, 2009; Ingram *et al*, 2012; Menet & Hardin, 2014). Em mosquitos, o padrão de expressão é cíclico para quase todos os genes, com exceção de *Clock* e *cry1*, que não apresentam perfil de ciclagem tanto em LD12:12 como em DD (Gentile, *et al* 2009). Enquanto que nas células Aag2 o pico de expressão do gene *per* é por volta do ZT1, em mosquitos esse pico de expressão ocorre somente por volta do ZT17, ou seja, durante a fase escura de um ciclo claro/escuro.

A linhagem Aag2 é derivada de células embrionárias, portanto é possível que o perfil de expressão dos genes de relógio seja diferente daquele encontrado em adultos. Este padrão de expressão arritmico dos genes de relógio não é surpreendente quando se trata de linhagens celulares. As células embrionárias S2 de *Drosophila melanogaster* também apresentam um perfil de expressão arritmico, e inclusive não expressam alguns dos genes canônicos do relógio circadiano, como por exemplo, *per* e *cyc* (Nawathean *et al.* 2005, Rey *et al.*, 2018).

Estudos realizados com embriões de *D. melanogaster* mostram que, durante a embriogênese, a partir do estágio embrionário 12 (ES12), a proteína PER já está expressa no cordão nervoso ventral e no ES15, está expressa em células oscilatórias do cérebro. Entretanto, nestes estágios nenhuma proteína CLOCK está expressa, indicando que a transcrição do gene *per* neste momento da embriogênese não está sendo ativada pelos fatores de transcrição CLK-CYC, como acontece com a mosca adulta. Esses dados sugerem que *per* pode não estar sendo regulado pelos ativadores canônicos (CLK-CYC) do relógio circadiano em embriões de *D. melanogaster* (Houl *et al.*, 2008). Além disso, estudos do nosso grupo mostram que, em embriões de *Ae. aegypti* mantidos a 25°C e coletados a cada 4 horas ao longo de toda a embriogênese, *per* já está altamente expresso cerca de 12 horas após oviposição, enquanto *Clock* só apresenta um pico de expressão cerca de 40 e 48 horas após a oviposição (dados não publicados). Esses dados sugerem então, mais uma vez, que *per* nos estágios iniciais da embriogênese pode não estar sendo regulado por seus ativadores já conhecidos. Nas células Aag2, *per* e *tim* parecem apresentar perfis similares de expressão, embora os dados estatísticos indiquem que *tim* não esteja ciclando. Isto sugere que, mesmo não havendo um relógio circadiano funcional, esses genes podem estar interagindo de alguma maneira, através de uma regulação ainda não identificada, e, provavelmente, independente de *Clk* e *cyc*.

Ao contrário do que é visto em LD12:12, todos os genes testados mostraram-se arritmicos em DD. Estes dados não surpreendem uma vez que é sabido que as condições constantes levam a uma diminuição da amplitude do ritmo ou até mesmo à arritmicidade. Por exemplo, células embrionárias DpN1, provenientes da borboleta monarca *Danaus plexippus*, também expressam vários genes do relógio circadiano

com ritmicidade em LD12:12 (Zhu *et al*, 2008), como por exemplo *per*, *tim* e *cry2*, mas todos perdem o perfil de ciclagem em DD, assim como observamos nas células Aag2.

A perda de ritmicidade em DD sugere que o perfil de ciclagem observado em LD12:12 é apenas uma resposta à luz e não um ritmo controlado pelo relógio circadiano endógeno. Isto sugere que o *Zeitgeber* luz seja um importante sincronizador ambiental do relógio em células. No entanto, o fato do relógio não ser funcional, não significa necessariamente que a célula não esteja sob um controle oscilatório. Rey e colaboradores (2018) mostram que células S2 de *D. melanogaster* que não expressam vários genes canônicos do relógio circadiano apresentam proteínas, em particular enzimas metabólicas, que são expressas ritmicamente em um período de 24 horas. Isto sugere fortemente que há um relógio circadiano atuando. Uma hipótese para este fenômeno é que a expressão cíclica destas enzimas poderia estar sendo regulada em nível pós traducional, o que também poderia estar acontecendo com as células Aag2, que não apresentam um perfil de ciclagem de seus RNAm em ambos os fotoperíodos analisados. Portanto, pretendemos também investigar o perfil de ciclagem das proteínas de relógio nessas células.

Apesar de não termos visto um padrão claro de ciclagem na linhagem celular em LD12:12, começamos o processo de padronização da infecção por DENV2 nestas células, pois já existem dados na literatura que indicam que a infecção por patógenos modula o relógio circadiano (Lee & Edery, 2008). Portanto, seria razoável se o perfil de expressão destes genes sofresse alguma alteração nas células infectadas.

Como havia três vírus dengue disponíveis para a infecção, fizemos vários testes e optamos por utilizar a cepa BR/RJ66985/2000, que é um vírus que não sofreu adaptação. Entretanto, no início da realização dos experimentos para avaliação da ciclagem dos genes de relógio circadianos em células infectadas, tivemos dificuldade em realizar as coletas, porque não havia RNA suficiente para que prosseguíssemos com a análise molecular. Descartamos a possibilidade de a infecção estar causando a morte celular, ou até mesmo interferindo na replicação das células, por estarmos observando o mesmo padrão nas placas que continham as células controles não infectadas.

De acordo com o protocolo de infecção, todas as células foram incubadas com meio sem soro durante uma hora: As células que seriam infectadas eram incubadas com meio de cultura e vírus e as células controles, apenas com o meio de cultura livre de soro fetal bovino. O soro fetal bovino (SFB) é o suplemento de crescimento mais amplamente utilizado para cultura de células, principalmente por conta dos altos níveis de fatores estimuladores do crescimento (Zheng, 2006). Já foi visto em células A549 – que são uma linhagem celular humana proveniente de carcinoma de pulmão – que o crescimento em um meio pobre em SFB fazia com que essas células ficassem sob estresse e ocorresse morte celular induzida por apoptose (Rashid & Coombs, 2019). Embora as células Aag2 sejam uma linhagem proveniente de inseto, talvez o choque de soro ocasione algo semelhante ao que foi visto para as células A549, o que poderia explicar a nossa dificuldade em obter a mesma quantidade de células que culturas celulares que não passaram por essa ausência de soro.

Resolvemos manter o choque de soro para a infecção (pois a presença do SFB na cultura poderia atrapalhar a infecção das células), mas optamos por aumentamos em um dia a incubação das células para que estas pudessem se multiplicar e conseguíssemos obter material para análise molecular.

Após a padronização da infecção, realizamos três experimentos independentes onde as células foram submetidas ao regime de LD12:12. Após quatro dias de infecção viral, as células foram coletadas e seguimos com a análise molecular para avaliação do perfil de expressão dos genes de relógio em células infectadas e não infectadas, além de realizarmos citometria de fluxo para controle da infecção, onde a porcentagem de células infectadas variou entre 25,6% e 35,7% nos 3 experimentos, sugerindo que o nível de infecção dessas células pode ser variável mesmo quando plaqueadas na mesma concentração celular. Conforme visto por Barreira e colaboradores (2018), níveis de infecção não tão altos (detectados por citometria), conferem confiabilidade e são considerados níveis satisfatórios de infecção pelo DENV2 em células mononucleares de sangue periférico. Esses resultados são corroborados por análises moleculares feitas por PCR. (Barreira *et al*, 2018).

Para análise molecular foram realizadas reações de PCR quantitativo em tempo real, e foi visto que dos dez genes analisados, nenhum apresentou um perfil de

expressão cíclico, tanto nas células infectadas, como nas células controle. Entretanto, os gráficos mostram que os genes *per* e *tim* possuem o mesmo perfil de expressão, tanto em células infectadas como em células não infectadas, sugerindo mais uma vez que ambos possam estar interagindo de uma maneira ainda não identificada. Também vimos que *per*, *tim* e *cwo*, que são possíveis repressores do relógio em *Ae. aegypti*, apresentam um perfil de expressão semelhante em células infectadas (que é diferente quando comparamos o perfil de expressão desses genes com os seus respectivos controles), o que poderia indicar uma modulação dos genes de relógio pelo vírus. Contudo não podemos tirar conclusões desse resultado, devido ao fato de estatisticamente a ciclagem dos genes não ser significativa.

Nosso objetivo foi avaliar como a infecção viral poderia estar atuando sobre a atividade transcricional desses genes, a fim de entendermos como poderia estar ocorrendo a interação entre o relógio e a infecção por patógenos no sistema de cultura de células, interação esta que já é bem descrita em *Drosophila* (Lee & Ederly, 2008) e em outros mosquitos (Xi, Ramirez, Dimopoulos, 2008). Porém, ao não vermos uma ciclagem significativa de nenhum gene em células infectadas e não infectadas, nos questionamos se para as células Aag2 haveria a necessidade de sincronizar o ciclo celular, uma vez que alguns trabalhos mostram que, ao sincronizar células de mamíferos, com *serum shock* por exemplo, elas apresentam um perfil cíclico dos genes de relógio (Balsalobre *et al*, 1998, Xiang *et al*, 2012).

No nosso trabalho optamos por não sincronizar o ciclo celular, por não termos informações de duração deste ciclo nas células Aag2. Além disso, trabalhos realizados com células de insetos não utilizam essa metodologia para analisar o perfil de expressão de genes de relógio (Nawathean *et al*, 2005, Zhu *et al*, 2008, Rey *et al*, 2018).

Diante das dificuldades que tivemos em manter as células viáveis para a realização dos experimentos após submetê-las a ausência de soro para a infecção, pensamos que o *serum shock* não seja a melhor alternativa para sincronização do ciclo celular nestas células. Alguns grupos utilizam a forscolina, que é um diperteno tipo labdano proveniente da planta *Coleus forskohlii* (também conhecido como *Plectranthus barbatus*) para promover a sincronização das células e obter uma

expressão cíclica dos genes de relógio, como por exemplo o que é visto para os genes *Per1*, *rPer2* em fibroblastos de ratos (*rat-1 cells*) (Yagita & Okamura, 2000). Outros tipos celulares também são sincronizados com forscolina, como por exemplo células pancreáticas, que apresentam genes de relógio com perfil cíclico após a sincronização (Saini *et al*, 2016).

Ainda não sabemos qual seria o impacto na viabilidade celular e se de fato a sincronização com a forscolina poderia modular a expressão dos genes de relógio nas células Aag2, mas na literatura, pelo menos em células de mamíferos, esta abordagem está se mostrando eficiente.

Mesmo que não seja possível afirmar que as células Aag2 possuam um relógio circadiano funcional, estas células expressam todos os genes canônicos do relógio, o que nos mostra que ainda são necessários estudos adicionais para entendermos se estas células podem ser um modelo para estudos iniciais e complementares acerca do relógio circadiano em *Ae. aegypti*.

6 – CONCLUSÕES

- As células Aag2 expressam todos os genes canônicos do relógio.
- Apenas o gene *per* em regime de LD12:12 tem um perfil de expressão cíclico, com pico de expressão no ZT1. O fato de apenas ser visto ciclagem deste gene em LD12:12 e não em DD sugere que o *Zeitgeber* luz é muito importante para sincronização de *per* nessas células.
- O *serum shock* realizado para a infecção das células Aag2 foi demonstrado como sendo prejudicial para estas células.
- As células Aag2 mostraram-se susceptíveis a infecção pelas três cepas virais DENV2 testadas durante a realização dos experimentos (44/2; NGC e BR/RJ66985/2000).
- Em regime de LD12:12, as células Aag2 infectadas por DENV2 não apresentaram expressão cíclica dos genes de relógio. Entretanto, nestes experimentos, nas células controles da infecção (não infectadas), os genes de relógio também não apresentaram um perfil de expressão rítmico. A sincronização do ciclo celular pode ser importante para que estes genes possam apresentar um perfil de ciclagem nessas células.

7 – PERSPECTIVAS

- Estabelecer o perfil de expressão dos genes de relógio em células infectadas e não infectadas pelo DENV2 em escuro constante (DD);
- Padronizar um protocolo de sincronização do ciclo celular das células Aag2 por forskolina.
- Testar a infecção pelo DENV2 nas células Aag2 na presença de soro fetal bovino no meio de cultura.
- Caracterizar o funcionamento dos genes de relógio em células da linhagem Aag2:
 - Através de ensaios de bioluminescência em células infectadas e não infectadas com DENV2, transfectadas com plasmídeo *per-luc* ou *cry2-luc* em regime de LD12:12 e DD;
 - Através do silenciamento dos genes *per*, *cyc* e *cry2* por CRISPR/Cas9 em regime de LD12:12 e DD;
- Analisar o perfil de ciclagem de proteínas do relógio (PER, CYC e CRY2) em células da linhagem Aag2 infectadas e não infectadas com DENV2 em regime de LD12:12 e DD;

8 – REFERÊNCIAS

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

Allada R., Chung B.Y. Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila*. **Annual Review of Physiology** 72: 605-24, 2010.

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: 87-98.

Baik L.S., Nave C., Au D.D., Guda T., Chevez J.A., Ray A., Holmes T.C. (2019) Circadian regulation of light-evoked attraction/avoidance in day- vs. night-biting mosquitoes. **BioRxiv the Preprint Server for Biology**. Disponível em: < <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2019/05/05/627588.full.pdf>>

Balsalobre A., Damiola F., Schibler U. (1998) A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells. **Cell**. 93:929–937.

Barreira L., Scheucher P.S., Romeiro M.F., La Serra L., Badra S.J., Souza W.M., Figueiredo L.T.M. (2018) Evaluating the use of fluorescence-based flow cytometry assay for dengue diagnosis using peripheral blood mononuclear cells. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 51(2):168-173.

Bargiello T.A.; Young M.W. (1984) Molecular genetics of a biological clock in *Drosophila*. **PNAS** 81:2142-2146.

Barletta, A.B.F., Silva, M.C.N., Sorgine M.H.F. (2012) Validation of *Aedes aegypti* Aag2 cells as a model for insect immune studies. **Parasites & Vectors**. 5(1): 1-9.

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

Boothroyd C.E., Young M.W. (2008) The in(put)s and out(put)s of the *Drosophila* circadian clock. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1129:350-7.

Braga, I.A., Valle, D. *Aedes aegypti*: Insecticides, Mechanisms of Action and Resistance. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** 16:279-293, 2007.

Bruno R.V, Lima-Camara T.N., Peixoto A.A. (2012) Ritmos biológicos em seus insetos vetores e seu controle molecular. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. **INCT-EM**.

Byk L.A., Gamarnik A.V. (2016) Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. **Annual Review of Virology**. 3(1): 263–281.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention < <https://www.cdc.gov/dengue/about/index.html> > Acesso em 15 de junho de 2019.

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

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) *vriille*, *Pdp1*, and *dClock* form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. **Cell**. 112, 329–341.

Das S., Dimopoulos G. (2008) Molecular analysis of photic inhibition of blood-feeding in *Anopheles gambiae*. **BMC Physiology**. 8: 1-19.

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

Fu Q., Inankur B., Yin J., Striker R., Lan Q. (2015) Sterol Carrier Protein 2, a Critical Host Factor for Dengue Virus Infection, Alters the Cholesterol Distribution in Mosquito Aag2 Cells. **Journal of Medical Entomology**. 52(5):1124-34.

Fredericks A.C., Wallace L.E., Russell T.A., Davidson A.D., Fernandez-Sesma A., Maringer K. (2019). *Aedes aegypti* (Aag2)-derived clonal mosquito cell lines reveal the impact of pre-existing persistent infection with the insect-specific bunyavirus Phasi Charoen-like virus on arbovirus replication. **BioRxiv the Preprint Server for Biology**. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2019/04/01/596205.full.pdf>>.

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

Gentile C, Rivas G.B.S., Meireles-Filho A.C.A., Lima J.B.P., Peixoto A.A., (2009). Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: *cry2* is different. **Journal of Biological Rhythms**. 24: 444-51.

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

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.

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

Houl J.H., Ng F, Taylor P., Hardin P. (2008) CLOCK expression identifies developing circadian oscillator neurons in the brains of *Drosophila* embryos. **BMC Neuroscience**, 9: 1-13.

Ingram K.K., Kutowoi A., Wurm Y., Shoemaker D., Meier R., Bloch G. (2012) The Molecular Clockwork of the Fire Ant *Solenopsis invicta*. **PLoS One**. 7(11): 1-11.

Jaumouillé E., Machado Almeida P., Stähli P., Koch R., Nagoshi E. (2015) Transcriptional regulation via nuclear receptor crosstalk required for the *Drosophila* circadian clock. **Current Biology**. 25, 1502–1508.

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

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 & Development**. 21, 1675–1686.

Kraemer M.U.G, Sinka M.E., Duda K.A., Mylne A.Q.M, F.M, Shearer F.M., Barker C.M., Moore C.G., Carvalho R.G., Coelho G.E., Bortel W.V., Hendrickx G., Schaffner F., Elyaza I.R.F., Teng H., Brady O.J., Messina J.P., Pigott D.V., Scott T.W., Smith D.L., Wint G.R.W., Golding N., Hay S.I. (2015) The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **eLife: Latest research**. 4:1-18.

Kim E.Y, Edery I. (2006) Balance between DBT/CKIepsilon kinase and protein phosphatase activities regulate phosphorylation and stability of *Drosophila* CLOCK protein. **PNAS**.103 (16): 6178-83.

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.

Klowden M.J., Zwiebel L. (2004) Vector Olfaction and Behavior. In **Biology of Disease Vectors** 2nd Edition. ed. Marquardt W.C. et al. Elsevier Academic Press. Amsterdam.

Konopka R.J., Benzer S. (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. **PNAS**. 68, 2112-2116.

Kumar S., Chen D., Jang C., Nall A., Zheng, X., Sehgal A. (2014) Na ecdysone-responsive nuclear receptor regulates circadian rhythms in *Drosophila* Nature Communications, 5:5697.

Lan Q, Fallon M. (1990) Small heat shock proteins distinguish between two mosquito species and confirm identity of their cell lines. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 43: 669–676.

Lee J., Edery I. (2008) Circadian regulation in the ability of *Drosophila* to combat pathogenic infections. **Current Biology**, 18(3): 195-9.

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*. **Current Biology**. 17, 1082– 1089.

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

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

Marques & Menna-Barreto (2003) Cronobiologia: Princípios e Aplicações. 3ªedição. Edusp, São Paulo.

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

Menet J.S., Hardin P.E. (2014) Circadian Clocks: The Tissue Is the Issue. **Current Biology**. 24 (1): 25-27.

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.

Nawathean P., Menet J.S., Rosbash M. (2005) Assaying the *Drosophila* negative feedback loop with RNA interference in S2 cells. In **Methods in Enzymology: Circadian Rhythms**, Vol. 393. Michael Young. Better World Books, Mishawaka.

Niepoth N., Ke G., Jacobus C.R., Groot A.T. (2017) Comparing Behavior and Clock Gene Expression between Caterpillars, Butterflies, and Moths. **Journal of Biological Rhythms**. 33 (1): 52-64.

Ozturk N., Selby C.P., Annayev Y., Zhong D., Sancar A. (2011) Reaction mechanism of *Drosophila* cryptochrome. **PNAS** 108(2): 516-21. Peleg J. (1968) Growth of arboviruses in monolayers from subcultured mosquito embryo cells. *Virology*. 35 (4):617-9.

Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research** 29(9):2002-7.

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

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.

Ramos-Castañeda J., Santos F.B., Martinez-Veja R., Araujo J.M.G., Joint G., Sarti E., (2017) Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 11(1): e0005224

Rashid M., Coombs K.M. (2019) Serum-reduced media impacts on cell viability and protein expression in human lung epithelial cells. **Journal of Cellular Physiology**. 234:7718-7724.

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

Reppert S.M., Guerra P.A., Merlin C. (2016) Neurobiology of Monarch Butterfly Migration. **Annual Review of Entomology**. 61:25-42.

Rey G., Milev N.B., Valekunja U.K., Ch R., Ray S., Silva Dos Santos M., Nagy A.D., Antrobus R., MacRae J.I., Reddy A.B. (2018) Metabolic oscillations on the circadian time scale in *Drosophila* cells lacking clock genes. **Molecular Systems Biology**, 14(8):1-11

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

Ruckert C., Weger – Lucarelli J., Garcia – Luna S. M., Young M.C., Byas A. D., Murrieta R. A., Fauver J. R., Ebel G. D. (2017) Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. **Nature Communications**, 8, p.15412

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

Saini C., Petrenko V., Pulimeno P., Giovannoni L., Berney T., Hebrok M., Howald C., Dermitzakis E.T., Dibner C. (2016) A functional circadian clock is required for proper insulin secretion by human pancreatic islet cells. **Diabetes, Obesity and Metabolism**. 18: 355–365.

Salomão N.G., Rabelo K., Póvoa, T.F., Alves A.M.B., Costa S.M., Gonçalves A.S., Amorim J.F., Azevedo A.S., Nunes P.C.G., Basílio-de-Oliveira C.A., Basílio-de-Oliveira R.P., Geraldo L.H.M., Fonseca C.G., Lima F.R.S., Mohana-Borges R.S., Silva E.M., Santos F.B., Oliveira E.R.A., Paes M.V. (2018) BALB/c mice infected with DENV-2 strain 66985 by the intravenous route display injury in the central nervous system. **Scientific Reports**. 8:9754.

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

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

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.

Sim S., Dimopoulos G. (2010) Dengue virus inhibits Immune Responses in *Aedes aegypti* cells. **PloS One**. 5(5):1-9.

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

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

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

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

Walker T., Jeffries C.L., Mansfield K.L., Johnson N. (2014) Mosquito cell lines: history, isolation, availability and application to assess the threat of arboviral transmission in the United Kingdom. **Parasites & Vectors**. 7: 382.

Whitfield Z.J., Dolan P.T., Kunitomi M., Tasseto M., Seetin M.G., Oh S., Heiner C., Paxinos E., Andino R. (2017) The Diversity, Structure, and Function of Heritable Adaptive Immunity Sequences in the *Aedes aegypti* Genome. **Current Biology**. 27, 3511-3519.

World Health Organization. 2016. Dengue Control. Epidemiology. Disponível em: <<https://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>>. Acesso em: 26/07/2019.

Xi Z., Ramirez J.L., Dimopoulos G., (2008). The *Aedes aegypti* Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection. *PLOS Pathogens*, 4(7): 1-12.

Xiang S., Mao L., Duplessis T., Yuan L., Dauchy R., Dauchy E., Blask D.E., Frasch T., Hill S.M. (2012) Oscillation of Clock and Clock Controlled Genes Induced by Serum Shock in Human Breast Epithelial and Breast Cancer Cells: Regulation by Melatonin. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**. 6:137–150.

Yagita K., Okamura H. (2000) Forskolin induces circadian gene expression of *rPer1*, *rPer2* and *dbp* in mammalian rat-1 fibroblasts. **FEBS Letters**. 465: 79-82.

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

Yuan Q., Metterville D., Briscoe A.D., Reppert S.M. (2007). Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. **Molecular Biology and Evolution**. 24 (4), 948-55.

Zehring W. A., Wheeler D.A., Reddy P., Konopka R.J., Kyriacou C.P., Rosbash M., Hall J.C. (1984) P element transformation with *period* locs DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. **Cell** 39, 369-376.

Zhang E.E., Kay S.A. (2011) Clocks not winding down: unravelling circadian networks. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 11(11): 764-76.

Zheng X., Baker H., Hancock W. S., Fawaz F., McCaman M., Pungor, E. (2006). Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. **Biotechnology Progress**, 22(5), 1294–1300.

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. **The Journal of Neuroscience**. 29, 10920–10927.

Zhu H., Sauman I., Yuan Q., Casselman A., Emery-Le M., Emery P., Reppert S.M. (2008) Cryptochromes define a novel circadian clock mechanism in monarch butterflies that may underlie sun compass navigation. **Plos Biology**. 6 (1), 138-155.

ANEXO I - Lista de tampões usados na dissertação

1. Tampão Fosfato Salino PBS (1L)

8g de NaCl, 0,2g de KCl, 1,44g de Na₂HPO₄, 0,24g de KH₂PO₄, água deionizada para completar 1L. pH 7.4

2. Tampão Fosfato de Sódio 0,1M (500mL)

38,7mL de Na₂HPO₄ 1M, 11,3mL de NaH₂PO₄ 1M, pH 7.4, água deionizada para completar 500mL. pH 7,4

3. Tampão Fosfato de Sódio 0,2M (200mL)

38,7mL de Na₂HPO₄ 1M, 11,3mL de NaH₂PO₄ 1M, pH 7.4, água deionizada para completar 250mL. pH 7,4

4. Tampão de Permeabilização (imunofluorescência)

BSA 1%, saponina 0,6%, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4

5. Tampão de Bloqueio (imunofluorescência)

BSA 1%, saponina 0,2%, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4

6. Tampão de Diluição (imunofluorescência)

BSA 0,1%, saponina 0,2%, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4

7. Tampão de Bloqueio/Permeabilização (Citometria de Fluxo)

BSA 2%, saponina 0,1%, em PBS 1X, pH 7,4.

8. Tampão FACS

EDTA 2mM, BSA 0,6%, β-mercaptoetanol diluído 1000x em PBS 1X, pH 7,4.