

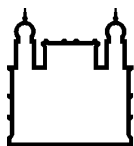
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação de Biologia Parasitária

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE RELÓGIO EM  
OVÁRIOS DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762) EM  
DIFERENTES CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS

LÉO NAVA PIORSKY DOMINICI CRUZ

Rio de Janeiro  
Março de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*Léo Nava Piorsky Dominici Cruz*

Caracterização da expressão de genes de relógio em ovários de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em diferentes condições fisiológicas

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

**Orientador (es):** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rafaela Vieira Bruno

**RIO DE JANEIRO**

Março de 2022

Cruz, Léo Nava Piorsky Dominici.

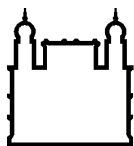
Caracterização da expressão de genes de relógio em ovários de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em diferentes condições fisiológicas / Léo Nava Piorsky Dominici Cruz. - Rio de Janeiro, 2022.  
xiv, 72 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2022.

Orientadora: Rafaela Vieira Bruno.

Bibliografia: f. 56-72

1. *Aedes aegypti*. 2. Ovário. 3. Inseminação. 4. Expressão Gênica. 5. Ritmo Circadiano. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**AUTOR: LÉO NAVA PIORSKY DOMINICI CRUZ**

### **CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE RELÓGIO EM OVÁRIOS DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762) EM DIFERENTES CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr.<sup>a</sup> Rafaela Vieira Bruno**

**Aprovada em: 30/03/2022**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Fernando Ariel Genta** (Instituto Oswaldo Cruz- Fiocruz) - **Presidente**

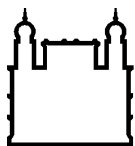
**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Denise Valle** (Instituto Oswaldo Cruz- Fiocruz)

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula Bargi de Souza** (Universidade Federal de Minas Gerais)

**Prof. Dr. Carlucio Rocha dos Santos** (Instituto Oswaldo Cruz- Fiocruz)

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tamara Nunes de Lima-Camara** (Faculdade de Saúde Pública- USP)

Rio de Janeiro, 30 de março de 2022



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

Este trabalho é dedicado a todos os organismos utilizados em ensaios e experimentos que me levaram às conclusões obtidas.

## **AGRADECIMENTOS**

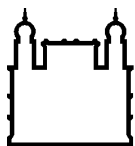
Agradeço primeiramente à minha avó Maria das Neves Nava por tudo o que tem feito por mim desde sempre, dedicação sem a qual não teria chegado aonde cheguei, nem seria o que sou. Agradeço a toda a minha família pela tão importante dedicação, carinho e confiança dados a mim durante o meu crescimento em todos os aspectos da minha vida.

Dedico um agradecimento especial à minha orientadora, Rafaela Vieira Bruno, pela confiança, apoio e amizade que tem me dado desde o início do mestrado. Pelo mesmo motivo, dedico com carinho um agradecimento a todas as minhas novas mentoras e companheiras de laboratório, que me acompanharam nessa saga de trabalho em meio a uma pandemia: Andresa Borges, Karine Padilha, Luciana Araripe e Renata Maia. Um grande agradecimento também à Luana Farnesi, Jéssica Assunção e Aline Cupolillo, que, mesmo à distância durante o período do meu trabalho, continuaram trazendo contribuições inestimáveis ao nosso grupo, inclusive a este trabalho.

Agradeço imensamente aos preciosos amigos que fiz durante a vida e admiro pelo companheirismo e apoio dedicados a mim. Em especial, agradeço a Agostinho Cardoso Pereira, por ter aceitado dividir seu espaço no Rio de Janeiro comigo, sem o qual dificilmente teria oportunidade de trabalhar presencialmente no laboratório e coletar os dados da minha pesquisa. Agradeço especialmente também a meus eternos parceiros de pesquisa Rosa (Rosinha) Cristina Ribeiro da Silva e José Manuel Macário Rebêlo pela confiança para continuarmos trabalhando juntos, mesmo a quilômetros de distância.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento da bolsa para a realização do mestrado. Agradeço ainda à Fundação Oswaldo Cruz, ao Instituto Oswaldo Cruz e ao Laboratório de Biologia Molecular de Insetos por garantirem o suporte para a realização desse trabalho e para a minha formação. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Quanto mais sabemos, mais  
percebemos que há o que saber.”  
Jennifer Doudna



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Caracterização da expressão de genes de relógio em ovários de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em diferentes condições fisiológicas

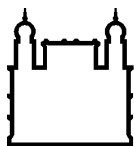
RESUMO

### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Léo Nava Piorsky Dominici Cruz

Osciladores endógenos (*clocks*) são componentes indispensáveis para a geração de ritmos (*outputs*) circadianos a partir de sua sincronização por fatores externos (*inputs*). Em organismos multicelulares, esse mecanismo é composto pelo oscilador central (*pacemaker*), localizado no sistema nervoso central, e osciladores periféricos localizados em outros tecidos, garantindo a manutenção dos ritmos biológicos desempenhados durante a história de vida desses organismos. O mosquito *Aedes aegypti*- por exemplo- vetor de diversos patógenos de importância médica, tem comportamentos reprodutivos rítmicos, como a oviposição, que depende de um ciclo de 24 horas de luz e escuridão; entretanto, ainda não é claro se esses ritmos são produzidos unicamente pela atividade do oscilador central ou se osciladores periféricos nos tecidos reprodutivos participam nesse processo. Devido a isso, em nossa pesquisa, investigamos se o perfil de expressão dos genes do relógio em ovários de *A. aegypti* indicavam a presença de um oscilador endógeno nesses tecidos e se a inseminação, como um dos principais eventos reprodutivos das fêmeas desse mosquito, poderia alterar esse perfil. Para isso, extraímos o RNA de ovários no estágio previtelogênico de fêmeas virgens e inseminadas em condições de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão (LD 12:12) e 24 horas de escuridão constante (DD). Analisamos a expressão desses genes por meio da Reação quantitativa em Cadeia da Polimerase (qPCR) em tempo real e os quantificamos pelo método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Para investigar se os valores da expressão dos genes variavam dentro de um período de 24 horas e apresentavam um perfil circadiano, recorreremos à análise de variância (ANOVA) e à análise baseada em cosinor pelo software CircWave v1.4. Nossos resultados mostram que a maioria dos genes de relógio nos ovários de *A. aegypti* não apresenta um padrão de expressão oscilatório em fêmeas virgens e inseminadas, com exceção do gene *period*, que apresenta uma oscilação em sua expressão em fêmeas inseminadas, mas apenas na condição de LD. Verificamos ainda que a inseminação reduz o nível de expressão apenas dos transcritos de *vriille* e *Pdp1ε* em LD 12:12 e de *Clock* em DD. Por outro lado, a expressão dos genes *period*, *Clock*, *cryptochrome 1* e *cryptochrome 2* é reduzida em fêmeas virgens mantidas em fotoperíodo LD 12:12 em comparação às fêmeas mantidas em DD. Em fêmeas inseminadas, essa redução ocorre em *period*, *cycle*, *vriille*, *cryptochrome 1* e *cryptochrome 2*. Nossos resultados sugerem que os ovários de *A. aegypti* não apresentam um oscilador endógeno detectável a nível tecidual, mas a condição luminosa claramente modula a expressão de alguns genes de relógio.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### CHARACTERIZATION OF THE CLOCK GENES EXPRESSION IN OVARIES OF *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* UNDER DIFFERENT PHYSIOLOGICAL CONDITIONS

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN PARASITARY BIOLOGY

Léo Nava Piorsky Dominici Cruz

Endogenous oscillators (clocks) are essential components for the generation of circadian rhythms (outputs) by their synchronization by external factors (inputs). In multicellular organisms, this mechanism involves the participation of a central oscillator (pacemaker) located in the central nervous system and peripheral oscillators located in other tissues, ensuring the maintenance of biological rhythms performed during the life history of these organisms. The *Aedes aegypti* L. mosquito - for example -, vector of several medically important pathogens, has reproductive rhythmic behaviors, like oviposition, which depends on a 24-hour light and dark cycle; however, it is not yet clear whether these rhythms are produced solely by the activity of the central oscillator or if peripheral oscillators in the reproductive tissues participate in this process. Due to this, in our research, we investigated whether the expression profile of clock genes in *A. aegypti* ovaries indicated the presence of an endogenous oscillator in these tissues and whether insemination, as one of the main reproductive events of this mosquito's females, could change that profile. To achieve this, we extract RNA from ovaries at the previtellogenic stage of virgin and inseminated females in photoperiods of 12 hours of light and 12 hours of darkness (LD 12:12) and 24 hours of constant darkness (DD). We analyzed the expression of these genes through real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) and quantified them by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. To investigate whether gene expression values varied within a 24-hour period and presented a circadian profile, we used analysis of variance (ANOVA) and cosinor-based analysis using the CircWave v1.4 software. Our results show that most clock genes in *A. aegypti* ovaries do not show an oscillatory expression pattern in virgin and inseminated females, except for the *period* gene, which shows an oscillation in its expression in inseminated females, but only in LD condition. We also verified that insemination reduces the expression level only of the *vrille* and *Pdp1ε* transcripts in LD 12:12 and *Clock* in DD. On the other hand, the expression of *period*, *Clock*, *cryptochrome 1* and *cryptochrome 2* genes is reduced in virgin females maintained in 12:12 LD photoperiod compared to females maintained in DD. In inseminated females, this reduction occurs in *period*, *cycle*, *vrille*, *cryptochrome 1* and *cryptochrome 2*. Our results suggest that *A. aegypti* ovaries do not present an endogenous oscillator detectable at the tissue level, but light condition clearly modulates the expression of some clock genes.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VIII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Ritmos biológicos em insetos</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Ritmos circadianos .....	2
1.1.2 Estrutura celular do oscilador central e osciladores periféricos .....	4
<b>1.2 Genes do relógio</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 Alça central (core loop) .....	7
1.2.2 Alças interligadas (interlocked loops) .....	10
<b>1.3 Oscilador nos tecidos reprodutivos</b> .....	<b>15</b>
<b>1.4 Ciclo de vida, ritmos e relógio do vetor <i>Aedes aegypti</i></b> .....	<b>17</b>
<b>1.5 Contribuições da inseminação na alteração do perfil de         expressão gênica em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i></b> .....	<b>21</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>24</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
4.1 Obtenção dos espécimes estudados .....	26
4.2 Coleta dos pontos e dissecação dos ovários .....	27
4.3 Extração e quantificação de RNA .....	28
4.4 Ensaio de transcrição reversa seguido por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) .....	28
4.5 PCR quantitativa em tempo real (qPCR) .....	29
4.6 Análise de dados .....	31
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>32</b>
5.1 Perfis de expressão temporal em ovários de fêmeas submetidas a ciclos de luz e escuridão (LD 12:12) .....	32

5.1.1	Perfis temporais de expressão dos genes em fêmeas virgens (FV) .....	32
5.1.2	Perfis temporais de expressão dos genes em fêmeas inseminadas (FI) .....	33
5.1.3	Alteração dos perfis entre grupos experimentais .....	35
<b>5.2</b>	<b>Perfis de expressão temporal em escuridão constante (DD) ....</b>	<b>37</b>
5.2.1	Perfis temporais de expressão dos genes em fêmeas virgens (FV) .....	37
5.2.2	Perfis temporais de expressão dos genes em fêmeas inseminadas (FI) .....	38
5.2.3	Alteração dos perfis entre grupos experimentais .....	40
<b>5.3</b>	<b>Alterações dos perfis de expressão entre diferentes condições de luz .....</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>47</b>
6.1	Perfil de expressão temporal dos genes de relógio .....	48
6.2	Diferenças na expressão dos genes de relógio entre fêmeas virgens e inseminadas .....	50
6.3	Diferenças na expressão dos genes de relógio entre fêmeas mantidas em LD 12:12 e DD .....	52
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>55</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação ilustrativa dos componentes necessários à manutenção dos ritmos circadianos. ....	3
Figura 2. Modelo de regulação central do relógio pelos genes <i>per</i> e <i>tim</i> . ....	10
Figura 3. Modelo de regulação do relógio pelos genes <i>vri</i> e <i>Pdp1ε</i> . ....	12
Figura 4. Modelo de alça de regulação do relógio pelo gene <i>cwo</i> . ....	13
Figura 5. Modelo de inibição da transcrição mediada por CLK/CYC pela ação de CRY2 em <i>Danaus plexippus</i> . ....	14
Figura 6. Modelo de regulação do relógio por E75 em <i>D. melanogaster</i> e <i>Thermobia domestica</i> . ....	15
Figura 7. Expressão circadiana dos genes de relógio em <i>Aedes aegypti</i> (linhas claras) e <i>Culex quinquefasciatus</i> (linhas escuras). ....	19
Figura 8. Esquema ilustrando os tipos celulares dos folículos e os estágios previtelogênico e vitelogênico da oogênese em <i>Aedes aegypti</i> . ....	23
Figura 9. Etapas de manutenção de insetos adultos para experimentos. ....	27
Figura 10. Par de ovários de <i>Aedes aegypti</i> em estágio de repouso previtelogênico dissecado em PBS 1x. ....	28
Figura 11. Perfil temporal da expressão relativa dos genes do relógio em ovários de fêmeas virgens em LD 12:12, mensurada por PCR quantitativa em tempo real. ....	32
Figura 12. Perfil temporal da expressão relativa dos genes do relógio em ovários de fêmeas inseminadas em LD 12:12, mensurada por PCR quantitativa em tempo real. ....	34
Figura 13. Representação do teste <i>t</i> entre os valores de expressão relativa dos genes de relógio dos grupos FV e FI em LD 12:12. ....	36
Figura 14. Perfil temporal da expressão relativa dos genes do relógio em ovários de fêmeas virgens em DD, mensurada por PCR quantitativa em tempo real. ...	37
Figura 15. Perfil temporal da expressão relativa dos genes do relógio em ovários de fêmeas inseminadas em DD, mensurada por PCR quantitativa em tempo real. ....	39
Figura 16. Representação do teste <i>t</i> entre os valores de expressão relativa dos genes de relógio dos grupos FV e FI em DD. ....	42
Figura 17. Representação do teste <i>t</i> entre os valores de expressão relativa dos genes de relógio em ovários de fêmeas virgens submetidas a LD 12:12 e DD. ....	44

**Figura 18. Representação do teste t entre os valores de expressão relativa dos genes de relógio em ovários de fêmeas inseminadas submetidas a LD 12:12 e DD.....46**

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais componentes moleculares dos relógios de insetos.....	6
Tabela 2. Concentrações e volumes de reagentes utilizados nas reações de RT-PCR.....	29
Tabela 3. Reagentes e seus respectivos volumes utilizados em reações de qPCR. ....	29
Tabela 4. Oligonucleotídeos ( <i>primers</i> ), e suas respectivas sequências de DNA, usados nos ensaios de qPCR para quantificação da expressão dos genes de relógio (indicados na coluna à esquerda).....	30
Tabela 5. Valores da Análise de variância ( <i>One-way ANOVA</i> ) e de CircWave a partir dos valores de expressão dos genes de relógio em ovários de fêmeas de <i>A. aegypti</i> virgens (FV) e submetidas a fotoperíodo LD12:12. ....	33
Tabela 6. Valores da Análise de variância ( <i>One-way ANOVA</i> ) e de CircWave a partir dos valores de expressão dos genes de relógio em ovários de fêmeas de <i>A. aegypti</i> inseminadas (FI) e submetidas a fotoperíodo LD12:12. ....	35
Tabela 7. Valores do teste <i>t</i> da expressão dos genes de relógio entre ovários de fêmeas de <i>A. aegypti</i> virgens e inseminadas, submetidas a fotoperíodo LD12:12. ....	35
Tabela 8. Valores da Análise de variância ( <i>One-way ANOVA</i> ) e de CircWave a partir dos valores de expressão dos genes de relógio em ovários de fêmeas de <i>A. aegypti</i> virgens (FV) e submetidas a fotoperíodo DD.....	38
Tabela 9. Valores da Análise de variância ( <i>One-way ANOVA</i> ) e de CircWave a partir dos valores de expressão dos genes de relógio em ovários de fêmeas de <i>A. aegypti</i> inseminadas (FI) e submetidas a fotoperíodo DD. ....	40
Tabela 10. Valores do teste <i>t</i> da expressão dos genes de relógio entre ovários de fêmeas de <i>A. aegypti</i> virgens e inseminadas, submetidas a fotoperíodo DD. ....	41
Tabela 11. Valores do teste <i>t</i> da expressão dos genes de relógio entre ovários de fêmeas de <i>A. aegypti</i> virgens submetidas a LD12:12 e DD. ....	43
Tabela 12. Valores do teste <i>t</i> da expressão dos genes de relógio entre ovários de fêmeas de <i>A. aegypti</i> inseminadas submetidas a LD12:12 e DD. ....	45

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CLK/ <i>Clk</i>	proteína Clock/gene <i>Clock</i>
CRY1/ <i>cry1</i>	proteína Cryptochrome 1/gene <i>cryptochrome 1</i>
CRY2/ <i>cry2</i>	proteína Cryptochrome 2/gene <i>cryptochrome 2</i>
CT	<i>Circadian Time</i> (Tempo circadiano)
Ct	<i>Cycle threshold</i> (limiar do ciclo)
CWO/ <i>cwo</i>	proteína Clockwork Orange/gene <i>clockwork orange</i>
CYC/ <i>cyc</i>	proteína Cycle/gene <i>cycle</i>
DD	<i>Dark/Dark</i> (escuridão constante)
DENV	<i>Dengue virus</i> (vírus dengue)
E75/ <i>e75</i>	proteína Ecdysone-Induced Protein 75/ gene <i>ecdysone-induced protein 75</i>
FI	Fêmeas Inseminadas
FV	Fêmeas Virgens
RNAi	Ribonucleic Acid interference (Ácido ribonucleico de interferência)
HJ	Hormônio Juvenil
LD	<i>Light/Dark</i> (luminosidade/escuridão)
MAG	<i>Male Accessory Gland</i> (Glândula Acessória de Macho)
NPF	<i>Neuropeptide F</i> (Neuropeptídeo F)
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction (Reação Quantitativa em Cadeia da Polimerase)
PAS	Domínio <i>Period-Arnt-Single minded</i>
pb	pares de base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (solução Salina tamponada com fosfato)
PDF	Pigment-Dispersing Factor (Fator de dispersão de pigmento)
PDP1 $\epsilon$ / <i>Pdp1<math>\epsilon</math></i>	proteína Par-Domain Protein 1 $\epsilon$ /gene <i>Par-domain protein 1<math>\epsilon</math></i>
PER/ <i>per</i>	proteína Period/gene <i>period</i>
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa)
sNPF	<i>short Neuropeptide F</i> (Neuropeptídeo F curto)
TIM/ <i>tim</i>	proteína Timeless/gene <i>timeless</i>
U	Unidade
VRI/ <i>vri</i>	proteína Vrille/gene <i>vrille</i>
ZT	<i>Zeitgeber Time</i> (Tempo de <i>Zeitgeber</i> )

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Ritmos biológicos em insetos

Os organismos biológicos apresentam atividades e parâmetros fisiológicos com padrões rítmicos. Levando-se em consideração sua frequência em relação à rotação da Terra, esses padrões podem ser classificados em ritmos ultradianos (do latim “*ultra*: para além de” e “*diem*: dia”), circadianos (do latim “*circa*: cerca de” e “*diem*: dia”) ou infradianos (do latim “*infra*: inferior” e “*diem*: dia”) (revisado por Bruno et al. (1)). Ritmos ultradianos apresentam um período menor que 24 horas, e podem ser observados na atividade cardíaca e respiratória. Ritmos circadianos apresentam um período de aproximadamente 24 horas (e.g. ciclos de sono e vigília) Ritmos infradianos apresentam períodos significativamente superiores a 24 horas e são exemplificados por eventos como ciclos de estro, hibernação e diapausa (1).

Os ritmos biológicos podem ser sincronizados às variações das condições ambientais às quais os organismos estão diariamente submetidos, como luminosidade, temperatura, umidade e outras mais (2). Esses fatores são denominados dentro da cronobiologia como *Zeitgebers* (do alemão *zeit*: tempo e *geber*: doador), ou pistas temporais, e são responsáveis pelo “arrastamento”- em outras palavras, sincronização- do ritmo endógeno dos organismos com os ciclos ambientais (2). Dessa forma, os organismos podem antecipar-se às mudanças periódicas no seu ambiente, evitando danos e perda energética (3,4).

Apesar de serem sincronizados por fatores externos, os ritmos biológicos são gerados e mantidos por elementos endógenos do organismo (2). Esses elementos compõem o “oscilador”, que conta com interações rítmicas de biomoléculas num mecanismo de autorregulação que gera a ritmicidade das respostas fisiológicas (2,5). A atuação do oscilador gera o livre curso dos ritmos mesmo na ausência dos *Zeitgebers*, permitindo que os organismos se antecipem às mudanças periódicas do ambiente.

Até o momento, padrões rítmicos já foram identificados em todos os domínios da vida (6), o que é esperado, tendo em vista que os organismos terrestres sempre estiveram submetidos às mudanças temporais do ambiente. Em plantas, por exemplo, são conhecidas várias atividades rítmicas com padrão tanto circadiano (7) como infradiano (8). Em vertebrados, motivações médicas levaram à descoberta de padrões

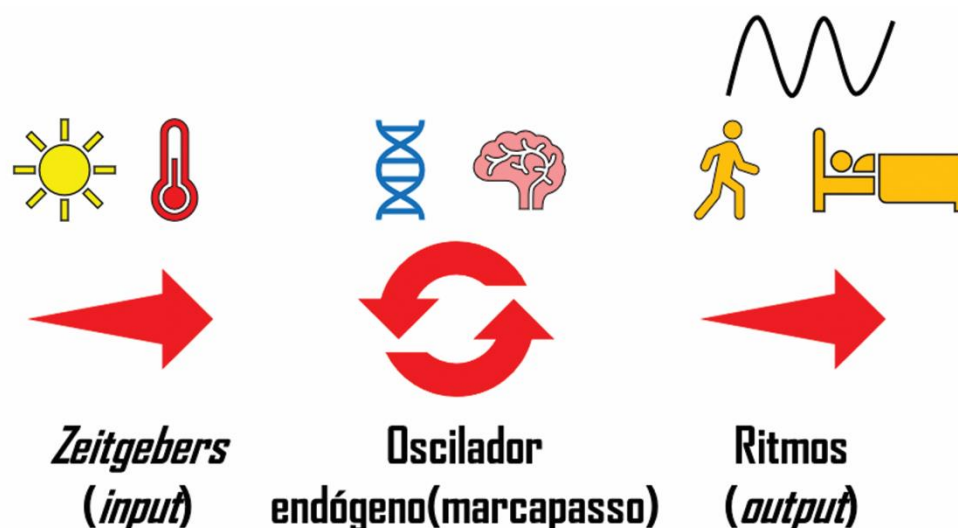


rítmicos em humanos e murídeos, e permitiram o avanço no entendimento das relações entre ritmos biológicos e doenças (9); além disso, estudos em vertebrados também permitiram a compreensão de ritmos ligados à sazonalidade (10–12).

Os ritmos biológicos em insetos são relativamente bem estudados, levando-se em conta a praticidade na manipulação desses organismos em ambientes controlados e sua rápida sucessão de gerações, o que permite a obtenção de mutantes para diversos padrões rítmicos (2). Experimentos com fatores de sincronização permitiram identificar oscilação rítmica em vários parâmetros na biologia dos insetos, como na atividade locomotora (13), alimentação (14,15), comportamentos reprodutivos (16) e desenvolvimento (17,18). Os ritmos circadianos, em especial, refletem os comportamentos diários da história de vida dos organismos, o que os tornam atrativos para estudos de cronobiologia.

### **1.1.1 Ritmos circadianos**

O relógio circadiano é composto por três componentes conceituais básicos: um elemento externo sincronizador (*input/Zeitgebers*), o oscilador, ou marcapasso (*pacemaker*), que gera o ritmo endógeno de cerca de 24 horas, e as vias de saída posteriores (*output/ritmo*), que correspondem aos elementos controlados pelo relógio e transmitem a informação temporal às mais diversas funções celulares (Figura 1) (7). O *Zeitgeber* mais importante é a luz, que, considerando um mesmo ponto ou localização geográfica, muda conforme a rotação da Terra, proporcionando um fotoperíodo (razão luminosidade/escuridão) com 12 horas de luminosidade e 12 horas de escuridão (na altura da linha do Equador), variando conforme a latitude e a estação do ano (2). A variação diária na temperatura também atua no arrastamento do relógio biológico, com temperaturas maiores durante o dia e menores durante à noite, mas variando sua amplitude a depender da localização geográfica (2).



**Figura 1. Representação ilustrativa dos componentes necessários à manutenção dos ritmos circadianos.**

Os ritmos biológicos de padrão circadiano observados em organismos (e.g., atividade locomotora e sono) são gerados a partir dos seus osciladores endógenos (marcapassos), que são sincronizados com o período de rotação terrestre por sinais ambientais, como luz e temperatura.

As interações entre indivíduos também podem alterar a influência a determinados *Zeitgebers*. Na mosca das frutas *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830), indivíduos mantidos em grupos apresentam ritmos de atividade locomotora com fases (uma fração do período de um ritmo) similares, enquanto indivíduos mantidos isolados não apresentam essa coerência de fases tão evidente (19). Essa sincronização é proporcionada por comunicação química (feromônios) e pode também promover a sincronização entre grupos com diferentes fases ou períodos de atividade (19,20). Na abelha social *Apis mellifera* (L., 1758), os ritmos individuais de seus membros variam entre estágios de vida e castas, então a interação com os indivíduos forrageadores é necessária para a sincronização das operárias que, conforme amadurecem, passam a explorar o ambiente fora da colônia (21).

A sincronização pelos *Zeitgebers* só é possível devido aos mecanismos de recepção sensoriais, cujo funcionamento também se antecipa às mudanças ambientais. A sensibilidade olfativa e visual são exemplos de mecanismos sensoriais que apresentam ritmicidade e podem indicar a fase do período diário em que se encontra o organismo (22–24).

A atividade locomotora, entretanto, é um dos melhores indicativos do perfil circadiano em insetos, pois normalmente traduz o desenvolvimento de tarefas essenciais, como forrageio (15) e cópula (25). Alternativamente, outras atividades,

como digestão, podem ser desenvolvidas quando o organismo apresenta uma locomoção reduzida (26). Por essa razão, a atividade locomotora é muito explorada em estudos de cronobiologia e comportamentais em insetos (13,27–29).

Alguns comportamentos com ritmos aproximados de 24 horas não são circadianos, uma vez que podem ser o produto de mascaramento. Esses comportamentos são desempenhados apenas na presença de um estímulo, mas não são mantidos pelo oscilador em livre curso (*i.e.*, ausência do *Zeitgeber*) (2). Essa situação é representada, por exemplo, pela redução na amplitude da atividade locomotora devido ao aumento de massa corporal (26,30) ou no aumento da atividade locomotora proporcionado por alterações bruscas de luminosidade (31). Dessa forma, nem todos os comportamentos observados reproduzem fielmente a programação endógena circadiana do inseto.

### **1.1.2 Estrutura celular do oscilador central e osciladores periféricos**

Os ritmos circadianos de atividade geral em insetos são regidos pelo oscilador central. Esse oscilador localiza-se em grupos específicos de neurônios do cérebro, sendo bem caracterizado em *D. melanogaster*. Nesse organismo modelo, existem cerca de 150 neurônios compondo o oscilador central: neurônios dorsais (DNs) e, neurônios laterais (LNs), denominados em virtude da sua localização no corpo cerebral. Os DNs são subdivididos em DN1, DN2 e DN3, enquanto os neurônios laterais em laterais ventrais (LN<sub>v</sub>) e laterais dorsais (LN<sub>d</sub>). Os LN<sub>v</sub>s podem ainda ser grandes (ILN<sub>v</sub>) ou pequenos (sLN<sub>v</sub>). As populações de neurônios são distribuídas equitativamente entre os dois hemisférios do corpo cerebral e suas denominações levam em consideração a sua posição (dorsal, lateral e ventral), ainda que evidências apontem que neurônios da mesma posição tenham diferentes origens embriológicas (32).

Além do oscilador central dos neurônios de relógio, outros osciladores podem ser encontrados em diferentes tecidos e órgãos, onde sincronizam as fases de outras funções, como crescimento e secreção de hormônios. Em sua maioria, esses osciladores periféricos são independentes do oscilador central, mas alguns podem ser sincronizados (*e.g.*, relógio da Glândula Protorácica) ou serem dependentes- (*e.g.*, relógio do corpo gorduroso) dos ritmos produzidos pelo oscilador central (33).

A comunicação entre o relógio central e alguns relógios periféricos é mediada por neuropeptídeos, como o Neuropeptídeo F (NPF) que atua na transmissão do ritmo

do oscilador central aos relógios da Glândula Protorácica e do Corpo Gorduroso(34,35). Outros neuropeptídeos, como o PDF (*Pigment-dispersing Factor*) mediam a sincronização do relógio de células produtoras de feromônios(36). Entretanto muitos mecanismos das vias de comunicação entre os relógios ainda são pouco caracterizados em insetos.

## **1.2 Genes do relógio**

O funcionamento dos osciladores depende, em sua instância mais básica, da expressão periódica de certos genes, comumente conhecidos como genes do relógio. Os genes do relógio são altamente conservados (37), permitindo a modelagem de suas vias dentro de grupos com muito tempo de divergência, apesar de algumas diferenças estruturais e funcionais serem observadas (38,39).

A descoberta de genes relacionados ao relógio teve início pela observação de indivíduos de *D. melanogaster* portando mutações induzidas, cujos períodos de atividades desviavam do padrão dos grupos controle. Esses achados demonstraram que os desvios dos períodos de atividades observados eram resultado de alterações no material genético desses insetos (40). Desde então, a identificação de vários outros componentes moleculares (Tabela 1) permitiu elucidar mecanismo de relógio endógeno e de suas vias, sendo identificadas, até o momento, três alças de regulação gênica: a alça central e duas alças interligadas(5).

**Tabela 1.** Principais componentes moleculares dos relógios de insetos.

Os genes envolvidos no relógio são apresentados junto aos seus produtos proteicos, grupos de organismos em que foram caracterizados e sua função na regulação do relógio (tomando-se como base, os modelos de *Drosophila melanogaster* e insetos não modelos). Baseada em dados de (5,41–46).

Gene	Produto	Clados portadores	Função no relógio
<i>period</i>	PER	• Insecta, Mammalia	• Inibição da transcrição mediada por CLK/CYC (ligação com CLK/CYC)
<i>timeless</i>	TIM	• Insecta, Mammalia	
<i>Clock</i>	CLK	• Insecta, Mammalia (ortólogo: m <i>Clock</i> )	• Ativação transcricional de <i>per</i> , <i>tim</i> , <i>vri</i> , <i>Pdp1ε</i> e genes controlados pelo relógio
<i>cycle</i>	CYC	• Insecta, Mammalia (ortólogo: B <i>Mal1</i> )	
<i>Par-domain protein-1ε</i>	PDP1ε	• Insecta	• Regulação positiva de <i>Clk</i>
<i>vri</i>	VRI	• Insecta, Vertebrata (ortólogo: <i>NF-IL3A</i> )	• Regulação negativa de <i>Clk</i>
<i>clockwork organge</i>	CWO	• Insecta	• Inibição/ativação da transcrição mediada por CLK/CYC
<i>cryptochrome 1</i>	CRY1	• Insecta (exceto Hymenoptera e Coleoptera)	• Sensibilidade luminosa; indução de TIM à degradação via proteosoma
<i>cryptochrome 2</i>	CRY2	• Insecta (exceto Cyclorrhapha), Vertebrata (ortólogo: <i>mcry</i> )	• Inibição da transcrição mediada por CLK/CYC
<i>ecdysone-induced protein 75</i>	E75	• Ecdysozoa, Mammalia (ortólogo: REV-ERBα e REV-ERBβ)	• Regulação negativa de <i>Clk</i> ( <i>Drosophila melanogaster</i> ); Repressão do ritmo de <i>cyc</i> e <i>tim</i> ( <i>Thermobia domestica</i> )

### 1.2.1 Alça central (core loop)

Na alça de regulação central do relógio, os genes *Clock* e *cycle* e suas respectivas proteínas atuam associados como um complexo de transcrição (CLK/CYC) que regula positivamente o relógio (5). Em oposição, os genes *period* e *timeless* e seus produtos são os principais reguladores negativos (5).

O primeiro gene descrito do relógio de insetos foi *period* (*per*), descoberto a partir de mutantes induzidos de *D. melanogaster* que apresentavam variações no período de emergência dos adultos e de atividade locomotora circadiana em relação às 24 horas em moscas selvagens: *per<sup>L</sup>* (29h), *per<sup>S</sup>* (19h) e *per<sup>0</sup>* (arrítmico) (40). Outras observações sobre mutantes rítmicos nesse *locus* confirmaram a importância de *per* para o controle dos ritmos circadianos (47).

Observações sobre o padrão de expressão de *per* e de seus alelos mutantes revelaram uma oscilação padrão de 24h, aumentando do ZT (*Zeitgeber Time*) 6 e atingindo seu pico aproximadamente no ZT 15, diferente do padrão de abundância de sua proteína (PER), sugerindo um mecanismo de retroalimentação (*feedback*) negativa (48). Tal hipótese foi reforçada por evidências da inibição da oscilação de *per* pela presença constitutiva de PER (49).

Estruturalmente *per* consiste num *locus* de aproximadamente 7 kb (kilobases) localizado na região 3B1-2 do cromossomo X (50–52). Seu principal transcrito possui 4.5 kb (53) e codifica uma proteína de cerca ~1127 aminoácidos (54,55). PER apresenta dois domínios de ligação proteica PAS (abreviação para os genes *period-arnt-single minded*), homólogos em genes de diferentes vias fisiológicas (56). Em PER também há uma sequência de repetições homólogas aos sítios de glicosilação em proteoglicanas de mamíferos (54,55), a qual possivelmente está relacionada ao mecanismo de compensação de temperatura nesse gene de relógio (57).

Algum tempo após a descoberta de *period*, outros genes relacionados ao relógio foram descobertos em mutantes de *Drosophila*, como *timeless* (*tim*), identificado a partir de moscas que perdiam os ritmos circadianos de atividade e de expressão de *period* (58). TIM é essencial para a acumulação de PER no citoplasma e para sua entrada no núcleo celular- onde interfere na expressão de *per* e com o padrão de atividade locomotora do inseto (59,60). As duas proteínas dimerizam por uma ligação heterotípica, por meio do domínio PAS de PER(61,62). Gekakis et al. (63)

demonstraram experimentalmente essa ligação e sua dependência de temperatura, pois, altas temperaturas inibiam a dimerização de PER e TIM.

Além de permitir a nuclearização de PER, TIM é importante pela sua relação com fatores de arrastamento. TIM é rapidamente degradada pela luz no citoplasma, uma etapa determinante para a manutenção do período do relógio (64,65). A degradação de TIM tem a participação de uma molécula fotossensível denominada CRYPTOCHROME (CRY), que se liga a TIM (66) e permite seu direcionamento à via de degradação ubiquitina-proteossoma (67).

O gene *Clk* (*Clock*), identificado em mutantes com períodos de atividade e eclosão mais curtos (68), é muito importante na alça central de regulação do relógio, pois codifica o fator de transcrição positivo de *per* e *tim* (69). CLOCK é uma proteína do grupo bHLH (*basic-helix-loop-helix*), domínio comum a fatores de transcrição e com afinidade a sequências de DNA, especialmente às regiões E-box (CACGTG) (69).

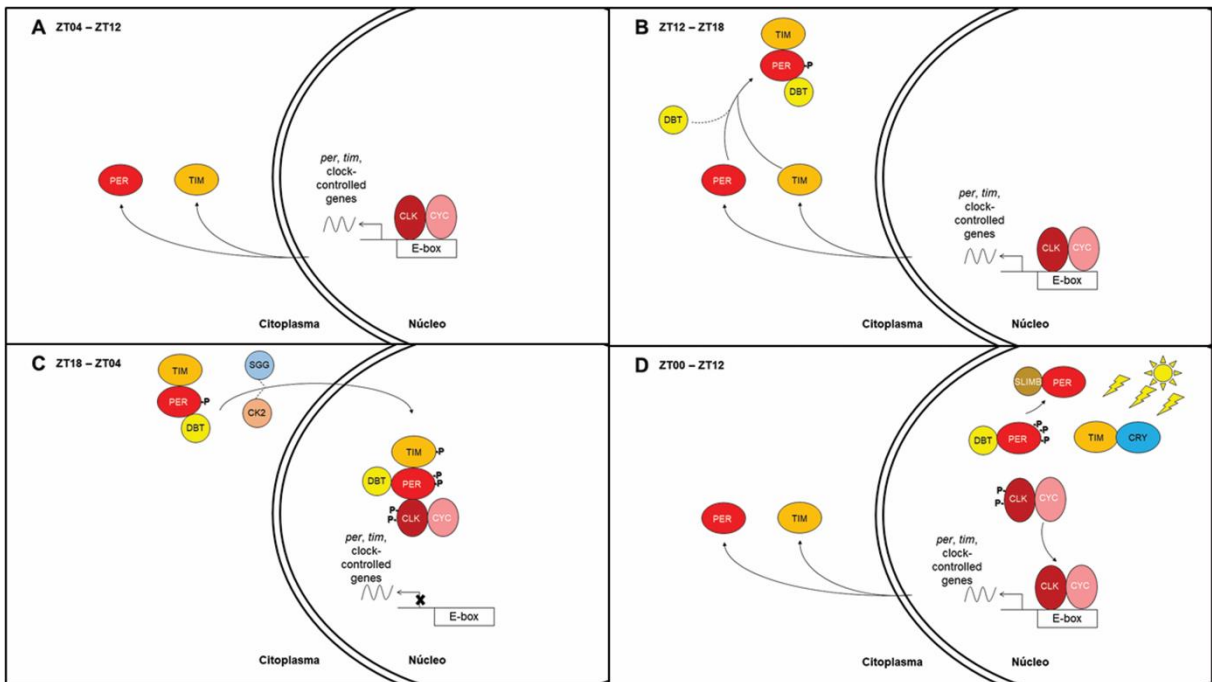
O gene *cyc* (*cycle*) codifica outro fator de transcrição do grupo bHLH-PAS importante para a expressão de *per* e *tim* em *Drosophila* cujos mutantes apresentam fenótipos semelhantes aos mutantes de *Clk* (70). Devido à sua homologia ao gene de relógio mamaliano *Bmal1*, cuja proteína dimeriza com mCLK (proteína CLK de camundongo), especulou-se que CYC (proteína de *cyc*) também associava-se como dímero ao homólogo CLK de *Drosophila* (70). A expressão de *cyc* em *D. melanogaster* não apresenta padrão oscilatório (70), entretanto em outros insetos, como os mosquitos, esse componente possui oscilação circadiana (38,71).

A partir dessas conclusões, o modelo de regulação da alça central do relógio de *D. melanogaster* (Figura 2) procede pelas seguintes fases: no ZT04, a expressão de *per* e *tim* inicia-se induzida pelo complexo CLK/CYC, atingindo seu pico aproximadamente no ZT18. O acúmulo de PER e TIM no citoplasma ocorre aproximadamente no ZT12 (início da fase de escuridão do ciclo, ou escotofase), e são direcionados ao núcleo na forma de PER/TIM, a partir do ZT18; no núcleo, esse complexo induz a fosforilação de CLK e, conseqüentemente, a liberação de CLK/CYC do sítio E-box. Essa liberação reduz a expressão mediada por CLK/CYC (inclusive dos *per* e *tim*). Ao ZT0 (início da fase luminosa do ciclo, ou fotofase), a presença de luz induz à degradação de TIM, evitando a estabilidade de PER e deixando livre complexo CLK/CYC para a transcrição de *per* e *tim*, reiniciando o ciclo a partir do ZT04 (Revisado em Hardin 2011)(5).

Apesar do papel dos componentes da alça central, a regulação do relógio depende de modificações pós-traducionais desses componentes, proporcionadas por quinases, que regulam a concentração das proteínas de relógio, permitem sua entrada no núcleo, ativação ou indução à degradação. Por exemplo, a proteína DOUBLETIME (DBT), codificada pelo gene *Doubletime (dbt)*, controla a concentração citoplasmática de PER no citoplasma e o induz à degradação no núcleo pela proteína F-box SLIMB (72,73).

Outras quinases garantem a estabilização em complexos proteicos, como a proteína SHAGGY (gene *sgg*), da via embriogênica, que possibilita a entrada do complexo PER-TIM no núcleo celular (74). A nuclearização desse complexo também é promovida pela quinase CK2 (*Casein kinase 2*), que também atua na estabilização de CLK, mas reduz a atividade transcricional desse componente do relógio(75,76).





**Figura 2. Modelo de regulação central do relógio pelos genes *per* e *tim*.**

(A) O complexo CLK/CYC atua promovendo a transcrição dos genes da alça central, *per* e *tim*, além de outros genes de vias posteriores que possuem uma região E-box. (B) PER e TIM começam a se estabilizar e acumular no citoplasma aproximadamente no ZT12, com o auxílio da proteína Doubletime (DBT), e atingem seu pico no ZT18 (cerca de seis horas após o pico de expressão de seus genes). (C) A partir do ZT18, o complexo PER-TIM-DBT começa a adentrar o núcleo, com o auxílio das quinases Casein Kinase 2 (CK2) e Shaggy (SSH); esse complexo inibe a expressão dos genes *per*, *tim* e genes controlados pelo relógio impedindo que o complexo CLK/CYC se ligue às E-box desses genes. (D) O início da fase reseta o relógio quando a proteína Cryptochrome (CRY1) reage com a luz azul e sequestra TIM, induzindo-o à degradação via proteossoma; PER também é induzido à degradação pela proteína SLIMB, o que interrompe a ligação com o complexo CLK/CYC e retoma a transcrição de *per*, *tim* e genes controlados pelo relógio. Nomes dos genes e proteínas são descritos no texto; linha dupla: membrana nuclear; curva sinodal: expressão cíclica; linha com seta fechada: síntese, montagem ou localização; X: transcrição cessada. Baseado em Hardin (5).

### 1.2.2 Alças interligadas (*interlocked loops*)

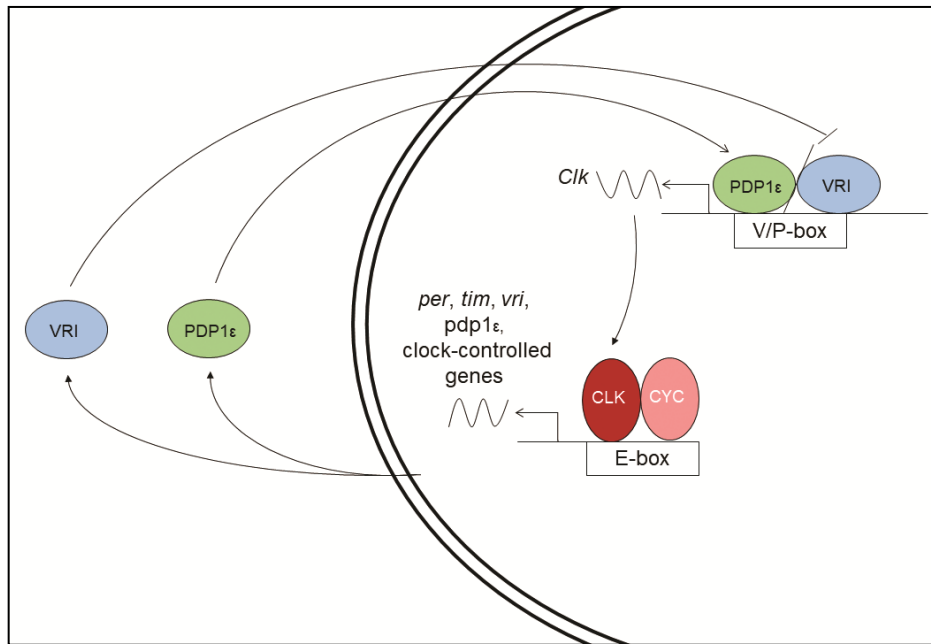
A importância da alça central reside no controle da expressão dos seus principais componentes (*per* e *tim*) e dos genes controlados pelo relógio (*clock controlled genes*) das vias posteriores (*outputs*). Entretanto, verificou-se que a expressão de *Clk* em *D. melanogaster* era inibida durante a atividade do complexo CLK/CYC, e retomada durante a atividade de PER/TIM, o que indicava que *Clk* mantinha sua expressão controlada por meio de uma alça de retroalimentação negativa (77). Entretanto, não havia definição se essa regulação negativa ocorria diretamente pela ligação de CLK/CYC a *Clk* ou indiretamente por outros elementos.

Eventualmente, a proteína Vriille (VRI) foi implicada como elemento de inibição direta da expressão de *Clk* (78). VRI é um fator de transcrição da família *Basic-region*

*leucine zipper* (bZIP), muito similar à proteína E4BP4, de mamíferos, que é um repressor do gene *Clk* (78,79). A expressão do gene *vri* (*vri*) é dependente do complexo CLK/CYC, iniciando no ZT04 e atingindo seu pico no ZT14, em antifase (perfis com picos e vales de expressão em fases opostas do período) à expressão de *Clk*, indicando o papel de VRI na inibição da expressão desse gene (78).

Assim como *vri*, o gene *Pdp1ε* (*Par-Domain Protein 1 ε*) codifica um fator de transcrição bZIP (PDP1ε) que adentra o núcleo, e possui padrão de expressão periódica. Tal como *vri*, *Pdp1ε* também possui um domínio E-box e sua expressão é dependente da ligação pelo complexo CLK/CYC, mas seu pico de expressão ocorre algumas horas após o de *vri* (ZT 18), quando este gene tem seus níveis reduzidos e os níveis de *Clk* voltam a aumentar (80).

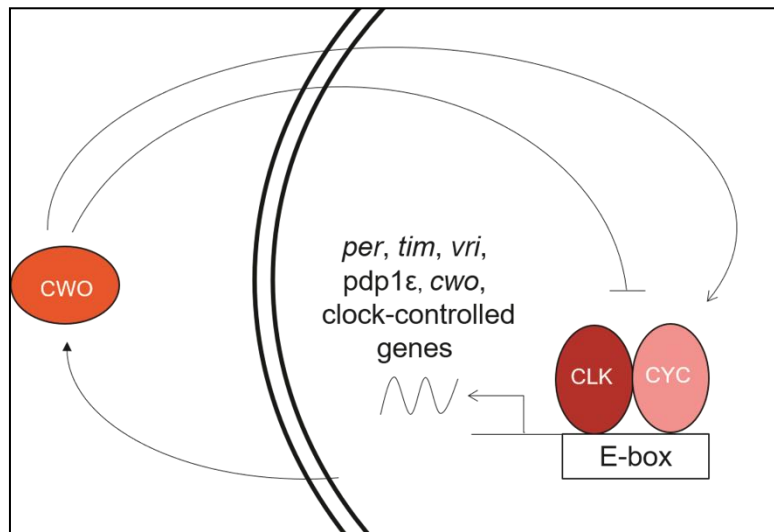
A partir das evidências de atividade de *vri* e *pdp1ε*, Cyran et al. (80), propuseram um modelo de regulação da transcrição de *Clk*, em que *vri* participa como repressor transcricional e *Pdp1ε* como ativador (Figura 3). Nesse modelo, *vri* e *Pdp1ε* começam a ser transcritos pela ligação de CLK/CYC (junto a outros genes dependentes desse complexo) no início da fotofase, enquanto os níveis de *Clk* são reduzidos devido à ação de VRI. VRI atinge seu pico entre os ZTs 12 e 15, a partir do qual começa a reduzir (possivelmente pela menor vida útil), permitindo a expressão de *Clk* por meio de PDP1ε, que atinge seu pico pouco tempo depois (ZT 18). O aumento da expressão de *Clk* ocorre nos últimos momentos da escotofase e, ao início do próximo ciclo, CLK/CYC promove a expressão dos genes da alça central (*per* e *tim*), da alça interligada (*vri* e *Pdp1ε*) e dos genes controlados pelo relógio.



**Figura 3. Modelo de regulação do relógio pelos genes *vri* e *Pdp1ε*.**

Nomes dos genes e proteínas são descritos no texto; linha dupla: membrana nuclear; curva sinodal: expressão cíclica; curva sinodal oposta: expressão em antifase; linha com seta aberta: transcrição ou ativação; linha com seta fechada: tradução ou mudança de localização; linha com seta bloqueada: repressão da transcrição; barra: atividade antagônica entre os fatores de transcrição. Baseado em Hardin (5).

Outra alça de regulação interligada envolve o gene *cwo* (*Clock-work orange*), um gene da família de fatores de transcrição bHLH-ORANGE, homólogo dos genes *Dec1* e *Dec2* de mamíferos. A proteína CWO foi identificada em *D. melanogaster* como um repressor transcricional dos genes alvo de CLK/CYC, atuando no final da escotofase na inibição da transcrição mediada por esse complexo (inclusive dos genes da alça central e *cwo*), de forma complementar à ação de PER (81). Isso é reforçado pelo fato de mutações nesse gene provocarem um alongamento do período circadiano ou arritmia da atividade locomotora (81). CWO também pode atuar como um ativador da transcrição mediada por CLK/CYC em *D. melanogaster* e *Gryllus bimaculatus*, demonstrado pela redução da amplitude de expressão de genes ativados por esse complexo em indivíduos cuja expressão de *cwo* foi comprometida (82,83). Dessa forma, CWO promove o ajuste fino da oscilação do relógio (Figura 4).

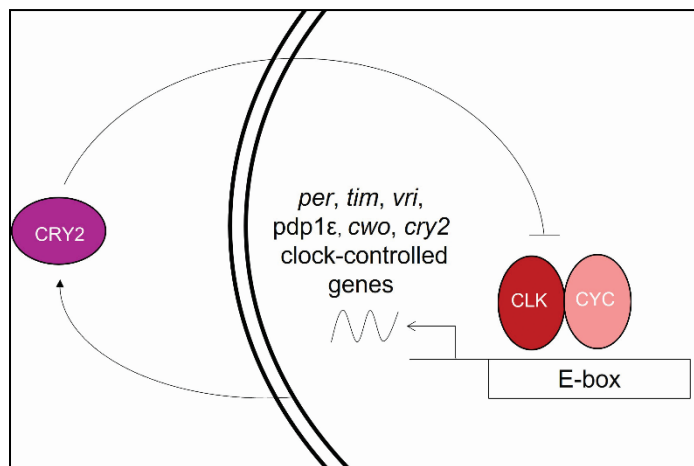


**Figura 4. Modelo de alça de regulação do relógio pelo gene *cwo*.**

Nomes dos genes e proteínas são descritos no texto; linha dupla: membrana nuclear; curva sinodal: expressão cíclica; linha com seta aberta: transcrição ou ativação; linha com seta fechada: tradução ou mudança de localização; linha com seta bloqueada: repressão da transcrição. Baseado em Hardin (5) e Richier et al. (83)

Além da alça central e das alças interligadas, outros componentes moleculares foram identificados como reguladores do relógio de insetos. É o caso do gene *Cryptochrome 2 (cry2)*, um homólogo do gene *cry1* de mamíferos (84). Apesar dessa natureza conservada, CRY2 (produto proteico de *cry2*) é ausente no relógio de *Drosophila melanogaster* (Tabela 1) e curiosamente é o único criptocromo relacionado ao relógio em Hymenoptera e Coleoptera, nos quais CRY1 é ausente (41).

Uma vez que mCRY1 (produto do gene *cry1* de mamíferos) é um repressor transcricional do relógio, estudos na mariposa monarca *Danaus plexippus* (L.) confirmaram que CRY2 também desempenha esse papel no relógio de insetos, no qual atua independente da alça central na inibição da transcrição mediada por CLK/CYC(84,85). Essa inibição não ocorre pela interação de CRY2 com o E-box dos genes alvos, mas possivelmente pela ligação de CRY2 ao domínio C-terminal de CYC (Figura 5), domínio ausente em *D. melanogaster* (41,86). Em *D. melanogaster*, CRY1 também é um repressor da transcrição mediada por CLK/CYC em osciladores periféricos, o que compensaria a ausência de CRY2 (87).

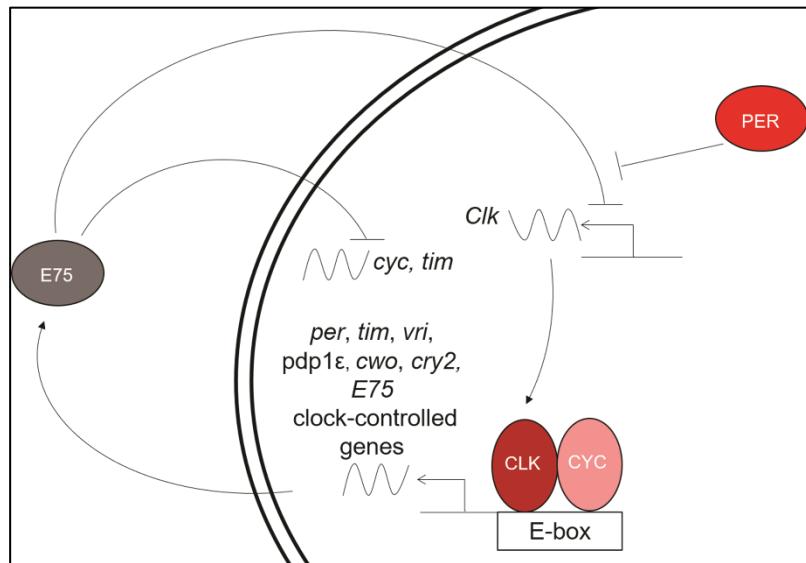


**Figura 5. Modelo de inibição da transcrição mediada por CLK/CYC pela ação de CRY2 em *Danaus plexippus*.**

Nomes dos genes e proteínas são descritos no texto; linha dupla: membrana nuclear; curva sinodal: expressão cíclica; linha com seta aberta: transcrição ou ativação; linha com seta fechada: tradução ou mudança de localização; linha com seta bloqueada: repressão da transcrição. Baseada em Yuan et al. (41); Zhu et al. (84, 85).

Outro gene cujo produto é indicado como componente do relógio é o gene da proteína 75 induzida por ecdisona (*E75*), que codifica um receptor nuclear do hormônio esteroide ecdisona e está amplamente difundido entre os animais do clado Ecdysozoa (88), uma vez que é um componente imprescindível ao seu desenvolvimento e reprodução (89–91). Entretanto, a proteína *E75* também participa do funcionamento do relógio, o que é sugerido por sua homologia com as proteínas heterólogas de mamíferos REV-ERB $\alpha$  (NR1D1) e REV-ERB $\beta$  (NR1D2), que têm expressão cíclica e inibem a expressão de *Bmal1*, homólogo de *cyc* (44).

A expressão de *E75* é necessária para manter o ritmo de atividade locomotora na traça *Thermobia domestica* (Packard, 1873), e sua inibição também promove a expressão cíclica de *tim* e *cyc*, que naturalmente não são rítmicos nesse inseto (42). A superexpressão ou redução da expressão de *E75* também suprime os ritmos de atividade e repouso de *Drosophila melanogaster* (46,92). Além disso, *E75* parece atuar, assim como *VRI*, na repressão da transcrição de *Clk* e sua atividade é inibida por *PER* (Figura 6) (46).



**Figura 6. Modelo de regulação do relógio por E75 em *D. melanogaster* e *Thermobia domestica*.**

Nomes dos genes e proteínas são descritos no texto; linha dupla: membrana nuclear; curva sinodal: expressão cíclica; curva sinodal oposta: expressão em antifase; linha com seta fechada: síntese, montagem ou localização; linha com seta bloqueada: repressão da transcrição ou inibição. Em *D. melanogaster*, E75 inibe a transcrição de *Clk*, enquanto em *T. domestica*, E75 inibe a oscilação de *cyc* e *tim*. Baseado em Kamae et al. (42); Kumar et al. (46); Jaumouillé et al. (92).

### 1.3 Oscilador nos tecidos reprodutivos

A maturação dos tecidos reprodutivos em organismos multicelulares é fortemente dependente de mecanismos de controle temporal, o que torna plausível a atuação do relógio em suas células. Evidências de relógios periféricos nos tecidos reprodutivos são bastante descritas em mamíferos, onde vários genes de relógio foram observados oscilando em alguns tipos de tecidos, enquanto outros não (93–95), sendo essa oscilação modulada também pela interação com hormônios secretados em diferentes momentos do ciclo estral (96). Apesar disso, o relógio central parece atuar em conjunto com esses relógios periféricos no processo de maturação dos tecidos reprodutivos e células germinativas (revisado em Sellix (97)).

Em modelos de insetos, entretanto, o papel dos genes de relógio nos tecidos germinativos ainda é pouco conhecido. Os genes de relógio são essenciais para a fertilidade dos machos de *D. melanogaster*. Machos carregando mutações nos genes de relógio possuem cerca de 40% menos espermatozoides em suas vesículas seminais que machos selvagens, o que reduz também quantitativamente sua prole

(98). Os genes de relógio *per*, *tim* e *Clk* nas vesículas seminais também apresentam um padrão rítmico e os componentes PER e TIM penetram no núcleo das células epiteliais dos testículos e vesículas seminais, sugerindo fortemente que atuam na manutenção dos ritmos de produção das células germinativas (98).

Em fêmeas de *D. melanogaster*, por outro lado, PER e TIM não adentram o núcleo dos ovários, como ocorre nas células que compõem o relógio e não apresentam flutuação diária, em resposta à presença de luz ou aos componentes CLK e CYC (99). Essa persistência pode ser explicada pela ausência de CRY1 nas células foliculares, o que evita a degradação de TIM, que mantém a estabilidade de PER no citoplasma (100).

A depleção de TIM ou expressão constitutiva de PER não afetam a produção de ovócitos maduros, sugerindo que, em *D. melanogaster*, esse processo pode ser independente de um relógio funcional (99). Contudo, assim como em machos, a presença de formas funcionais dos genes *per* e *tim* ainda é essencial garantir uma quantidade natural de células maduras e de prole, sugerindo que a regulação desses genes contribui para a fecundidade nesse inseto, ainda que não como genes de relógio (99).

Evidências demonstram que PER possui uma regulação no desenvolvimento das células dos ovários de *D. melanogaster*, “semelhante ao ritmo de expressão circadiano do gene *per*”. No estágio previtelogênico, PER é exclusivamente citoplasmático, mas no início do estágio vitelogênico, essa proteína predomina no núcleo de algumas células foliculares (apesar de nem todas expressarem PER no núcleo), talvez pela fosforilação induzida por DBT, e tem seu nível reduzido conforme as células foliculares progridem pela vitelogênese (101).

Tobback et al. (102) observaram que *per*, *tim* e *Clk* são expressos nos ovários de fêmeas do gafanhoto do deserto *Schistocerca gregaria* (Forskall, 1775). Esses autores também reduziram, por meio de RNA de interferência (RNAi), a expressão de *per* e *tim* nos ovários das fêmeas desse inseto, que foram injetadas e posteriormente inseminadas por machos. Essa redução diminuiu a quantidade de ovos postos pelas fêmeas, mas não a quantidade de ovos fertilizados, já que os machos não foram tratados com RNAi. Além disso, a inibição de *per* resultou no aumento da expressão de *tim* e vice-versa nos ovários e no cérebro, indicando a existência de um *feedback* típico de um relógio; por outro lado, a inibição de *Clk* é deletéria para esse inseto.

#### 1.4 Ciclo de vida, ritmos e relógio do vetor *Aedes aegypti*

Dentre os insetos vetores de parasitas causadores de doenças humanas e veterinárias, destaca-se o mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), vetor confirmado de diversos arbovírus, protozoários e helmintos, além de possível vetor de diversos parasitas causadores de doenças emergentes (103–105). A espécie *A. aegypti* engloba as subespécies: *A. aegypti aegypti* - amplamente distribuída entre as populações humanas e comum em núcleos urbanos - e *A. aegypti formosus* - um mosquito de hábitos silvestres encontrado em florestas equatoriais da África subsaariana (revisado por Powell e Tabachnick (106)). A distribuição atual do *A. aegypti* é um retrato da própria dispersão humana pela Terra e pelas modificações ambientais promovidas durante esse fenômeno (106).

A atividade locomotora e dos mosquitos *A. aegypti* adultos é majoritariamente diurna, com maior expressão nas primeiras e nas últimas horas da fotofase, com baixa amplitude de atividade durante a escotofase (107–109). Mudanças de postura corporal e expressão gênica diferenciada sugerem que, além de terem sua atividade reduzida durante a escotofase, os mosquitos podem passar por um estado análogo ao sono dos mamíferos, fenômeno já observado em outros insetos (110).

Em relação à reprodução, machos e fêmeas de *A. aegypti* respondem prontamente à presença de feromônios e sinais sonoros do sexo oposto, e experimentam um aumento de sua atividade locomotora (25,111). Fêmeas de *A. aegypti* também reconhecem os sinais sonoros do bater de asas (*lovesong*) dos machos e sincronizam seu próprio bater de asas até que o par atinja uma frequência de 1200 Hertz (convergência harmônica), após o qual, ocorre a cópula (112). Em cerca de 20 horas após a primeira cópula e inseminação, as fêmeas tornam-se refratárias às tentativas de cópulas posteriores por outros machos (113). Por outro lado, os machos podem copular com fêmeas diferentes ao longo da vida (114).

Após a inseminação pelos machos de sua espécie, as fêmeas de *A. aegypti* experimentam uma redução da amplitude de sua atividade locomotora média durante a fotofase, o que se acentua mais ainda após a realização do repasto sanguíneo (26). Essa redução da atividade locomotora após o repasto sanguíneo poderia ser um mascaramento provocado pelo aumento da massa da fêmea, como um mecanismo para evitar a formação de radicais livres pela reação do grupo heme do sangue quando em contato com a luz ou pela necessidade da digestão do conteúdo sanguíneo e maturação dos ovários (26), haja vista que a digestão sanguínea leva a



uma redução no consumo de oxigênio pelas mitocôndrias dos músculos alares nesse inseto (115).

As fêmeas de *A. aegypti* ovipositam na borda de corpos de água lântica, preferencialmente artificiais (116), distribuindo seus ovos por sítios distintos, o que maximiza o sucesso reprodutivo (117). O ritmo de oviposição desse inseto é fortemente influenciado pela luz (16). Fêmeas mantidas em fotoperíodo LD 12:12 depositam mais ovos durante a escotofase, fêmeas mantidas em DD (escuridão constante, do inglês *dark:dark*) ovipositam igualmente tanto no dia subjetivo quanto na noite subjetiva, enquanto fêmeas mantidas em LL (claro constante, do inglês *light:light*) ovipositam menos durante a noite subjetiva. Entretanto, o fotoperíodo é essencial para garantir a viabilidade dos ovos (16). Uma grande proporção de ovos de fêmeas mantidas em LL são inviáveis, enquanto fêmeas mantidas em DD produzem menos ovos viáveis durante o dia ou a noite subjetiva que fêmeas mantidas em LD, durante a escotofase (16).

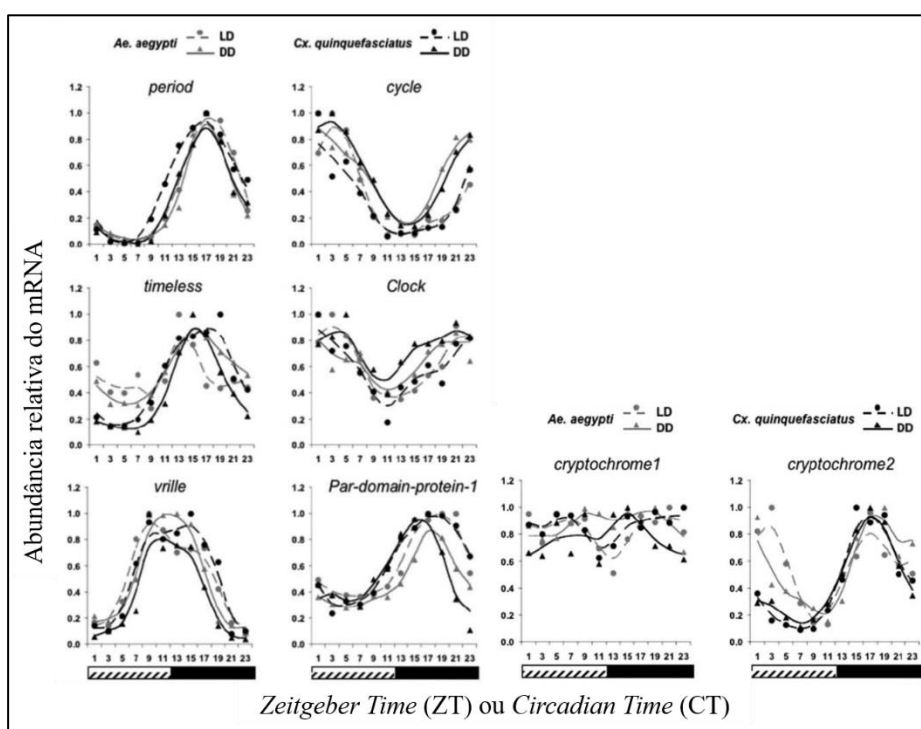
A formação de pupas e a emergência das formas adultas são processos contínuos, que se iniciam nas primeiras horas da fotofase, sendo que os machos precedem as fêmeas em cerca de oito a dez horas na formação de pupas, e em cerca de duas a três horas na emergência do imago (118).

O oscilador central de *Aedes aegypti* assemelha-se em muitos aspectos ao de *D. melanogaster*, porém, apresenta algumas diferenças. Gentile et al. (119) identificaram e caracterizaram a oscilação da expressão de *timeless* em *A. aegypti*, o primeiro gene de relógio identificado nesse mosquito. Em *A. aegypti*, *tim* atinge sua expressão máxima na transição entre a fotofase e a escotofase, reduzindo consideravelmente sua expressão no ZT19 e retornando a aumentar seus níveis ao final da escotofase e início da fotofase.

Gentile et al. (38) caracterizaram a oscilação da expressão dos genes de alça de regulação central (*per*, *tim*, *Clk* e *cyc*), da alça de regulação de *Clk* (*vri* e *Pdp1ε*) e dos criptocromos (*cry1* e *cry2*) em *A. aegypti* e no mosquito doméstico comum *Culex quinquefasciatus* Say (1823), a partir de tecidos da região cefálica, localização do oscilador central (Figura 7). Esses autores observaram que, apesar de apresentarem padrões de atividades em fases diferentes (*A. aegypti* é predominantemente diurno, enquanto *C. quinquefasciatus* é predominantemente noturno), a oscilação da maioria dos genes de relógio dessas duas espécies é muito similar, indicando que o padrão de oscilação desses genes não é necessariamente correlato com as fases dos ritmos

dos organismos. Os autores também observaram que a oscilação de *cry2* (ausente em *D. melanogaster*) em *A. aegypti* apresentava dois picos de expressão, o que foi sugerido pela presença de sítios V/P-box exclusivamente no *cry2* desse mosquito, que poderiam levar à ativação desse gene pela ação de PDP1ε. Contudo, essa hipótese merece maior investigação.

Outra contribuição relevante de Gentile et al. (38) foi a demonstração que *cyc* apresenta uma oscilação circadiana tanto em *A. aegypti* quanto em *C. quinquefasciatus*, diferentemente de *D. melanogaster*, na qual a expressão desse gene não oscila. Essa diferença pode estar relacionada à ausência de um domínio de trans-ativação C-terminal no gene *cyc* de *D. melanogaster*, mas presente em outros dípteros (e diversos outros eucariotos), como o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) (120). Entretanto, a distribuição espacial e temporal de CYC



**Figura 7. Expressão circadiana dos genes de relógio em *Aedes aegypti* (linhas claras) e *Culex quinquefasciatus* (linhas escuras).**

Fotoperíodos LD 12:12 são representados por linhas intermitentes e escuridão constante (DD) são representados por linhas contínuas. Os gráficos compilam a oscilação observada durante três dias, nos quais os insetos estiveram submetidos a condições LD 12:12 ou DD em temperatura constante de 25° C. Cada amostra representa um *pool* de 10 cabeças de fêmeas, coletadas em 12 pontos de tempo durante 24h. A variação temporal na abundância do mRNA em todos os casos é significativa, com exceção de *tim* de *A. aegypti* em LD e *Clk* em LD e DD. Modificado de Gentile et al. (38).

(produto de *cyc*) só foi mapeada em *A. aegypti* por Chahad-Ehlers et al. (71), os quais observaram a oscilação de CYC em quase todo o cérebro do mosquito - com exceção

da área dorsal -, com expressões máxima no ZT3 e mínima no ZT11, em fase com seu gene.

Além do fotoperíodo, ciclos diários de temperaturas também são capazes de sincronizar a oscilação da expressão dos genes do relógio de *A. aegypti* e outros mosquitos. Manipulando ciclos de temperatura com amplitude de 10°C (20 ou 30° C) durante 24 horas, Rivas et al. (121) verificaram que a oscilação na expressão de alguns genes de relógio tanto de *A. aegypti* e como de *C. quinquefasciatus* muda se o organismo está submetido a um fotoperíodo com fotofase (fase clara do ciclo) a 30° C e uma escotofase (fase escura do ciclo) a 20° C (“dias quentes e noites frias”; temperatura reforçando a luz) ou com fotofase a 20° C e escotofase a 30° C (“dias frios e noites quentes”; temperatura conflitando com a luz). Em dias frios e noites quentes, *per* e *tim* sofrem um atraso nos seus picos de expressão em *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Nesse regime conflitante, o pico de *cyc* também sofre um leve atraso em *A. aegypti* e uma redução na amplitude em *C. quinquefasciatus*; *cry2* sofre uma redução da amplitude em *A. aegypti* (possivelmente pela perda da oscilação de *vri* nesse regime) e seu pico avança sua fase em *C. quinquefasciatus*; por fim, o pico de *Pdp1ε* sofre um leve atraso em *A. aegypti* e um leve avanço de fase em *C. quinquefasciatus*, com redução de sua amplitude nesse último. Rivas et al. (121) também observaram que os ritmos de atividade locomotora de *A. aegypti* são mais susceptíveis à sincronização pela temperatura, enquanto os de *C. quinquefasciatus* são mais susceptíveis à sincronização pela luz.

Teles-de-Freitas et al. (122) mostraram que a maioria dos genes do relógio em cabeças de *A. aegypti* mantêm seus ritmos de expressão em fotoperíodos e termoperíodos seminaturais (transição gradual de luz e temperatura entre a fotofase e a escotofase) caso luz e temperatura estejam em fase uma com a outra. Quando luz e temperatura estão fora de fase uma com a outra, o gene *tim* perde seu caráter rítmico de expressão (122).

Teles-de-Freitas et al. (123), mostraram que, nos corpos (sem cabeças) de *A. aegypti*, a expressão de quatro genes de relógio (*per*, *tim*, *cyc* e *cry2*) mantêm seu ritmo se as condições seminaturais de luz e temperatura estiverem em fase. Em seu trabalho, esses autores mostraram que a luz ou a temperatura sozinha (*i.e.*, caso um dos *Zeitgebers* seja mantido constante durante o ciclo) não são capazes de manter o ritmo de expressão de todos os genes estudados. Sob temperatura constante de 25° C, três dos genes estudados perderam seus ritmos de expressão, o que não ocorre

em cabeças (38,123), e, sob escuridão constante, apenas *per* e *tim* mantiveram seus ritmos de expressão. Além disso, nos corpos de mosquitos nessas condições seminaturais, a expressão de *cry2* não apresenta um segundo pico no ZT17, como acontece nas cabeças de mosquitos sob essas mesmas condições (123).

### **1.5 Contribuições da inseminação na alteração do perfil de expressão gênica em fêmeas de *Aedes aegypti*.**

O processo de inseminação das fêmeas de *A. aegypti* - tal como em diversos insetos - por machos da mesma espécie promove uma série de alterações fisiológicas nas fêmeas que podem torná-las refratárias a futuras cópulas (124), reduzir o número de folículos ovarianos reabsorvidos durante o estágio previtelogênico (125) e aumentar o *fitness* das fêmeas (126). Essas alterações são promovidas por componentes presentes no sêmen, derivados tanto das gônadas quanto das glândulas acessórias dos machos (do inglês *Male accessory gland* - MAG) e transferidos pelos machos às fêmeas durante a cópula (125,127,128).

Numa análise direcionada aos genes de relógio de *A. aegypti*, Gentile et al. (129) verificaram que a inseminação não provoca a alteração na expressão desses genes nem na cabeça nem em corpos das fêmeas. Apenas a alimentação sanguínea provocou uma redução significativa na expressão de todos os genes de relógio no ZT11 (único ponto de tempo avaliado), tanto nos tecidos da cabeça quanto do corpo.

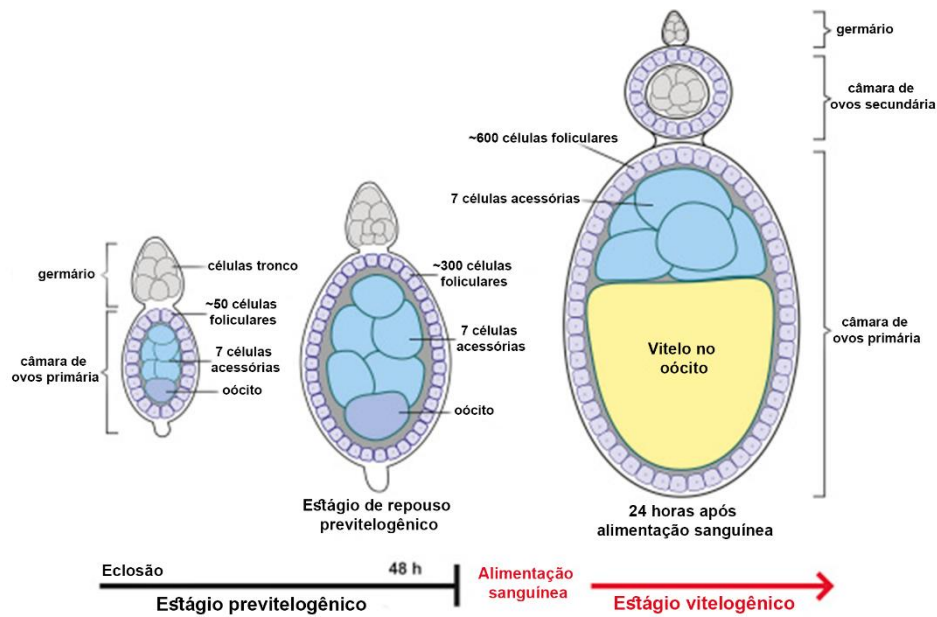
Alfonso-Parra et al. (130) verificaram diferenças entre os perfis transcriptômicos do trato reprodutivo abaixo do oviduto (sem ovários) de fêmeas de *Aedes aegypti* virgens e inseminadas: cerca de 60 transcritos são expressos ainda na primeira hora após a inseminação, incluindo transcritos de genes expressos no trato reprodutivo dos machos. Esses transcritos derivados de machos têm sua frequência reduzida nas horas posteriores, indicando que são provavelmente degradados. As maiores diferenças de expressão, entretanto, foram observadas entre fêmeas virgens e fêmeas inseminadas a partir das 6 horas após a inseminação, com 150 transcritos regulados positivamente e 130 negativamente nesse último grupo. Dentre os genes regulados negativamente, encontram-se alguns relacionados a processos rítmicos.

Alonso et al. (131) observaram que o perfil do transcriptoma de tecidos não-reprodutivos (cabeças e tórax) de fêmeas de *Aedes aegypti* é significativamente alterado se essas fêmeas estiverem em contato com machos conspecíficos (mas não inseminadas) ou forem inseminadas por eles: em fêmeas que apenas entraram em

contato com machos, 1048 genes foram regulados positivamente e 1140 negativamente em relação às fêmeas virgens; fêmeas inseminadas tiveram 1062 genes regulados positivamente e 1192 regulados negativamente em relação a fêmeas que apenas tiveram contato com machos. Por outro lado, apenas 65 genes regulados positivamente e 275 negativamente foram identificados em fêmeas inseminadas em relação às virgens, indicando uma semelhança entre os perfis transcriptômicos dessas duas condições. Dentre os genes encontrados com expressão diferenciada, não foram detectados genes relacionados ao relógio ou a processos rítmicos.

Camargo et al. (132) observaram que a inseminação, seguida de alimentação sanguínea, pode alterar o perfil de expressão gênica nas espermatecas- órgãos de armazenamento e manutenção do esperma no trato reprodutivo de fêmeas de insetos- de fêmeas de *A. aegypti*, pelo menos até 72 horas pós-inseminação. Fêmeas inseminadas- alimentadas com sangue e não alimentadas- apresentaram, ao total, 107 genes regulados positivamente e 168 negativamente em relação às fêmeas virgens. Dentre esses genes, a maioria correspondia a transportadores iônicos, os quais os autores supõem estarem envolvidos na manutenção do equilíbrio iônico e do pH nas espermatecas, juntamente com outros genes regulados positivamente e relacionados à manutenção do ambiente osmótico e proteção contra o estresse oxidativo nesses órgãos.

Alterações nos ovários de *A. aegypti* proporcionadas pela inseminação, entretanto, ainda são elusivas. Os ovários desse mosquito, de outros endopterigotos (e.g., ordens Hymenoptera, Trichoptera, Lepidoptera e Diptera) e alguns paraneópteros (i.e., ordens Psocoptera e Phthiraptera) são meroísticos politróficos (i.e., as oogônias, células precursoras dos oócitos, passam por divisões meióticas incompletas, originando células acessórias e um oócito conectadas por pontes citoplasmáticas), sendo compostos de um germário (onde localizam-se as células tronco), células do epitélio folicular, sete células acessórias e um oócito (Figura 8). Os ovários nas fêmeas crescem rapidamente após a emergência do adulto a partir da pupa e estacionam cerca de 48 horas depois no estágio de repouso previtelogênico (133). Nesse estágio, os oócitos dos folículos (câmara de ovos) primários têm as mesmas dimensões que as células acessórias e só retomam seu desenvolvimento (i.e., recebem os nutrientes e fatores citoplasmáticos maternos) após uma alimentação sanguínea, quando os ovários entram no estágio vitelogênico (Figura 8).



**Figura 8. Esquema ilustrando os tipos celulares dos folículos e os estágios previtelogênico e vitelogênico da oogênese em *Aedes aegypti*.** Modificado de Valzania et al. (133).

Em *A. aegypti*, tal como em diversos insetos, o processo de fertilização não ocorre simultaneamente à inseminação, visto que os espermatozoides armazenados na espermateca são liberados apenas durante a ovulação e penetram na micrópila, onde entram em contato com o ovócito no trato ovipositor da fêmea (134). Contudo, como exposto acima, a inseminação promove alterações na fisiologia das fêmeas de mosquito que repercutem em alterações na fisiologia dos ovários.

## 2 JUSTIFICATIVA

O mosquito *Aedes aegypti* constitui-se um obstáculo nos esforços para reduzir a incidência de arboviroses nas sociedades humanas, tendo em vista a permissibilidade dessa espécie para o desenvolvimento de diversos arbovírus, dentre os quais encontram-se alguns amplamente distribuídos como o vírus dengue (DENV) e outros com potencial emergente. Outro fator complicador é a forte domiciliação desse inseto, o qual completa seu ciclo de vida inteiramente em ambientes modificados pelo homem, inclusive dentro das próprias residências.

Tal como outros organismos, muitos aspectos da biologia do *A. aegypti* apresentam um padrão de ritmo circadiano e são gerados pelo oscilador central, cujo funcionamento ainda não foi precisamente modelado. Entretanto, outros ritmos podem ser o resultado de osciladores periféricos, dos quais há pouca informação a respeito, apesar de esses relógios serem conhecidos em outros modelos de insetos e de mamíferos. Estudos que nos permitam identificar esses osciladores e compreender seus mecanismos e fatores que afetam sua oscilação nos fornecerão subsídios para construir novas estratégias de controle e mitigação da transmissão de parasitas em adição às já existentes.

Uma vez inseminadas por machos da mesma espécie, as fêmeas de *A. aegypti* experimentam uma redução na amplitude de sua atividade locomotora, mas ainda não é claro se essa redução resulta de alterações no oscilador central, exclusivamente, ou se há a participação de relógios periféricos putativos (e.g. nos ovários). Apesar de observações anteriores terem mostrado que a inseminação não altera a oscilação dos genes de relógio nos corpos de fêmeas de *A. aegypti*, isso não é suficiente para descartar a existência de relógios periféricos em tecidos específicos, já que a análise de expressão de genes a partir do corpo inteiro pode ocultar a oscilação de tais relógios.

Apesar de a inseminação alterar o perfil de expressão de muitos processos biológicos das fêmeas de *Aedes aegypti*, tais alterações só foram mostradas nos primeiros momentos ou até 72 horas após a inseminação, podendo não persistir ritmicamente. Além disso, apesar de essas investigações terem identificado uma expressão diferencial de alguns poucos genes relacionados a processos rítmicos em fêmeas inseminadas, esse resultado pode ser o retrato de apenas uma fase da oscilação dos genes do relógio.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Investigar a existência de um relógio periférico nos ovários de fêmeas de *Aedes aegypti* e possíveis fatores de sua sincronização (*i.e.*, ciclos de luminosidade/escuridão e *status* de inseminação das fêmeas) a partir da análise de oscilação da expressão de genes do relógio da alça de regulação central (*period*, *timeless*, *cryptochrome 1*, *Clock* e *cycle*) e de alças de regulação interligadas (*vriille*, *par-domain-protein 1ε* e *cryptochrome 2*).

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Analisar o perfil oscilatório de expressão de genes do relógio em ovários de fêmeas virgens de *Aedes aegypti* submetidas a um regime de claro/escuro (LD12:12) e escuro constante (DD).
- Analisar o perfil oscilatório de expressão de genes do relógio em ovários de fêmeas de *A. aegypti* inseminadas por machos da mesma espécie, submetidas a um regime de claro/escuro (LD12:12) e escuro constante (DD).

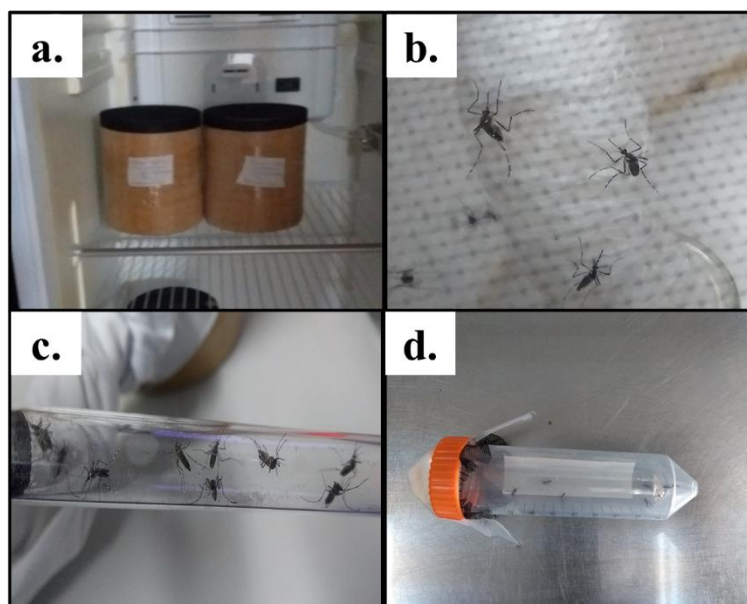


## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção dos espécimes estudados

Os espécimes de mosquitos usados no estudo foram obtidos a partir de ovos de *Aedes aegypti* – linhagem Paea – doados pelo Laboratório de Transmissores de Hematozoários do Instituto Oswaldo Cruz. As formas imaturas foram criadas em bacias de polietileno preenchidas com 1.5 L de água milliRO, e alimentadas com 1g de levedo (Vitalab<sup>®</sup>) em cada bacia. Ao atingir a fase de pupa, os insetos foram triados em machos e fêmeas seguindo-se as descrições morfológicas de Carvalho et al. (135) e acondicionados em gaiolas entomológicas (Figura 9a) no seguinte esquema: gaiolas contendo apenas fêmeas virgens (grupo de fêmeas virgens- FV) e gaiolas contendo fêmeas e machos- na proporção de uma fêmea para dois machos - (grupo de fêmeas inseminadas- FI).

As gaiolas contendo pupas foram acondicionadas em incubadoras B.O.D. (*Biological Oxygen Demand*), da companhia Solab<sup>®</sup>, com fotoperíodo de LD 12:12 (12 horas de fase fotofase e 12 horas de escotofase) a 25° C e umidade relativa de 60%, juntamente com um recipiente contendo solução de sacarose a 10% fornecida *ad libitum* (Figura 9b). Após a emergência, os insetos adultos foram deixados em contato durante quatro dias para que as fêmeas FI pudessem ser inseminadas pelos machos desse grupo. No quinto dia, as fêmeas FV e do FI foram acondicionadas (Figuras 9c e 9d) em tubos de coleta (cada tubo contendo 10 fêmeas) sob as mesmas condições de fotoperíodo, temperatura e umidade anteriores durante mais três dias.

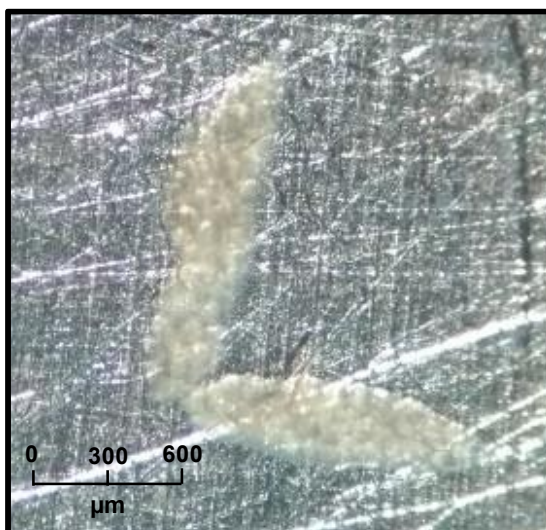


**Figura 9. Etapas de manutenção de insetos adultos para experimentos.**

(a) Pupas de fêmeas sozinhas (FV) ou fêmeas com machos (FI) são acondicionadas em gaiolas entomológicas dentro de incubadoras a 25° C e fotoperíodo LD 12:12 para que possam emergir como adultos. (b) Insetos adultos são mantidos durante quatro dias em gaiolas contendo solução de sacarose a 10%. (c) Fêmeas são separadas para experimento por meio de capturador de Castro e acondicionadas em tubos de coleta (d), onde permanecem por mais três dias antes da coleta (4° dia). A coleta no 4° dia pode ser realizada em fotoperíodo LD 12:12 ou em escuridão constante (DD), a depender do experimento.

#### **4.2 Coleta dos pontos e dissecação dos ovários**

No oitavo dia após emergência, as fêmeas adultas foram coletadas em seis pontos de tempo (correspondendo a seis ZTs/CTs) durante um período de 24 horas. Ao serem coletadas, as fêmeas foram mortas imediatamente em gelo seco e armazenadas a -80° C; logo após isso, as fêmeas de ambos os grupos FV e FI tiveram seus ovários dissecados sob estereomicroscópio com adição de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) sobre uma placa de metal refrigerada (Figura 10). Os ovários foram então acondicionados em solução de TRIzol™ (ThermoFisher Scientific®) em *pools* de 15 pares para cada ponto de tempo e armazenados a -80° C até a extração do seu RNA. Fêmeas de ambos os grupos tiveram suas espermatecas checadas quanto à presença de espermatozóides, um indicativo de inseminação.



**Figura 10. Par de ovários de *Aedes aegypti* em estágio de repouso previtelogênico dissecado em PBS 1x.**  
Escala em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ).

#### **4.3 Extração e quantificação de RNA**

A extração de RNA total foi realizada seguindo-se as instruções de fabricação do protocolo de TRIzol™, com volumes adaptados a ovários de *A. aegypti* (diluído em 30  $\mu\text{L}$ ). Após a extração, as amostras de RNA foram purificadas com 2,5 M de cloreto de lítio (LiCl), conforme estabelecido por Gentile et al. (38). Uma vez purificadas, as amostras tiveram seu RNA quantificado pelo sistema Qubit 3.0 Fluorometric Quantitation (ThermoFisher Scientific®) seguindo-se as instruções do kit Qubit RNA High Sensivity Assay (ThermoFisher Scientific®). Após a quantificação, as amostras foram diluídas para uma concentração padrão de 5,0 ng/ $\mu\text{L}$ .

#### **4.4 Ensaio de transcrição reversa seguido por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)**

O ensaio de transcrição reversa a partir de amostras de RNA extraído de ovários foi feita seguindo-se as instruções do kit TaqMan® Reverse Transcription Reagents (ThermoFisher Scientific®), com os reagentes utilizados nos seguintes volumes:

**Tabela 2.** Concentrações e volumes de reagentes utilizados nas reações de RT-PCR.

Reagentes	Concentração inicial	Volume aplicado por amostra (µL)
Buffer	10x	1,0
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,2
dNTP	2,5 mM/cada	2,0
oligo dT	50 mM	0,5
Inibidor de RNase	20 U/µL	0,2
Transcriptase Reversa	50 U/µL	0,25
RNA	5 ng/µL	4
<b>Total</b>		<b>10,15</b>

A reação de RT-PCR foi feita num termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems®) usando a seguinte configuração: 25° C por 10 minutos, 48° C por uma hora e 95° C por 5 minutos. Após a confecção, os produtos de RT foram diluídos em 10x e armazenados em freezer a -20° C.

#### 4.5 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Para quantificação da abundância relativa de transcritos das amostras, foram realizadas reações de qPCR no termociclador *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®) com o kit *Power SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems®), juntamente aos oligonucleotídeos (*primers*) gene específicos (diluídos a 10 µM cada um) e produto de RT das amostras, em reações com as seguintes configurações:

**Tabela 3.** Reagentes e seus respectivos volumes utilizados em reações de qPCR.

Reagentes	Volume aplicado por amostra (µL)
Power SYBR Green Master Mix	7,5
Oligo 5'-3'	0,75
Oligo 3'-5'	0,75
Água livre de nucleases	2,0
RNA	4,0
<b>Total</b>	<b>15</b>

Foram analisados os perfis de expressão de genes da alça de oscilação principal (*cyc*, *per* e *tim*) e de alças de regulação interligadas (*vri*, *Pdp1ε* e *cry2*), tomando-se como controle endógeno, para cada amostra, o gene *ribosomal protein 49* (*rp49*), de expressão constitutiva em *A. aegypti* e outros dípteros (136). Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de qPCR foram desenhados por Gentile et al. (38)- com exceção dos oligonucleotídeos para o gene *Clock*, os quais foram descritos por Fonseca et al. (137)- e estão listados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Oligonucleotídeos (*primers*), e suas respectivas sequências de DNA, usados nos ensaios de qPCR para quantificação da expressão dos genes de relógio (indicados na coluna à esquerda).

<b>Genes alvos</b>	<b>Oligonucleotídeos</b>	<b>Sequência de DNA (5'-3')</b>
<i>rp49</i>	5aexpRP	GCTATGACAAGCTTGCCCCCA
	3aeaquaRP1b	TCATCAGCACCTCCAGCTC
<i>per</i>	5aexpper3	CGTTGAAAAGTCTCAATCAACCT
	3aegyper3	GCTGAGTGAAAGCTTCGCCG
<i>tim</i>	5aegytim7	ATCGAACAACCTTTGGGAGC
	3aexptim3	CGATCCCGTAAAACCTGTATG
<i>Clk</i>	5aexpclkrvb1	TCCTCCGGACTCGTCAACCGG
	3aegyclkrvb1	TGCGCTGGAGTTAGCACGACG
<i>cyc</i>	5aegycyc1a	CCGACCAGGAGCTGAAAATG
	3aexpcyc1	GACCTAGCAAATCACCCCTGTG
<i>vri</i>	5aevri1	AACGGTTCGCCAATTAACGG
	3aexpvri	AGCAAGGCACTGTGTGCAGG
<i>Pdp1ε</i>	5aepdp1	ACAACATGGCGGCCAAGC
	3aexpdp1	CTCGGTGCAGGTTTCATGTTCTC
<i>cry1</i>	5aexpcry1	GCCGACGCTCTATGTCCACG
	3aecry1	CGATCATCGGTGCCGGATAGTC
<i>cry2</i>	5aexpcry2	ACTTGCCGGTGCTGAAGAACT
	3aecry2	CGATGATACTTGGCCGTGCG

Para cada produto de RT, foram realizadas três réplicas técnicas das reações de qPCR. As configurações de ciclagem de temperaturas das reações foram as seguintes: 95°C por 10 minutos (desnaturação inicial); 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Ao final dos ciclos de temperatura, foi realizada

uma curva de dissociação (*melting curve*) para identificar a ocorrência de possíveis contaminantes ou a formação de dímeros pelos oligonucleotídeos na seguinte configuração: 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos, e uma escala crescente de temperaturas (de 60° a 95° C) nas quais foram realizadas leituras de fluorescência a cada 0,3° C.

#### 4.6 Análise de dados

Para cada produto de RT, o valor de Ct (*cycle threshold*/limiar de ciclo) considerado corresponde à média dos valores de Ct das réplicas técnicas. Réplicas com variâncias muito altas (*outliers*) em relação aos valores críticos de Grubbs, foram excluídas da análise (138). Para quantificação dos valores de Ct, foi empregado o método de Ct Comparativo, ou método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (*Comparative Ct Method*; Método 2), considerando-se o maior valor de  $\Delta Ct$  (Máximo) da série (139,140).

Para verificarmos a existência de diferenças entre a abundância relativa de mRNA entre cada um dos ZTs/CTs estudados (*i.e.*, para verificamos a existência ou não de um perfil cíclico de expressão de cada gene), comparamos a média dos valores de expressão relativa pelo teste de Análise de Variância (*One-way ANOVA*), no software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.- San Diego, CA, EUA), considerando-se  $\alpha = 0.05$ . Após a *One-way ANOVA*, realizamos múltiplas comparações entre cada ZT pelo teste *a posteriori* de Tukey. Além disso, para verificamos a significância de ritmo diário ou circadiano, utilizamos o software CircWave ver. 1.4, o qual usa a estatística F para adicionar a quantidade de harmônicas necessárias ao ajuste de onda para produzir uma curva de Fourier que descreva da melhor forma possível a distribuição dos dados (141). Consideramos o perfil cíclico caso ambos os valores de  $p$  de ANOVA e do CircWave fossem inferiores ao valor de  $\alpha$  (0.05).

Para verificarmos se a expressão dos genes estudados foi alterada pela condição experimental (*i.e.*, FV e FI) ou pelo fotoperíodo (*i.e.*, LD e DD), comparamos os valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (normalizados a partir do maior valor de  $\Delta Ct$  de ambos os grupos experimentais comparados) desses grupos experimentais- considerando-se o grupo FV LD como grupo controle- pelo teste t paramétrico no software GraphPad Prism 5.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Perfis de expressão temporal em ovários de fêmeas submetidas a ciclos de luz e escuridão (LD 12:12)

#### 5.1.1 Perfis temporais de expressão dos genes em fêmeas virgens (FV)

Os perfis temporais de expressão dos genes de relógio nos ovários de fêmeas virgens são representados na Figura 11.

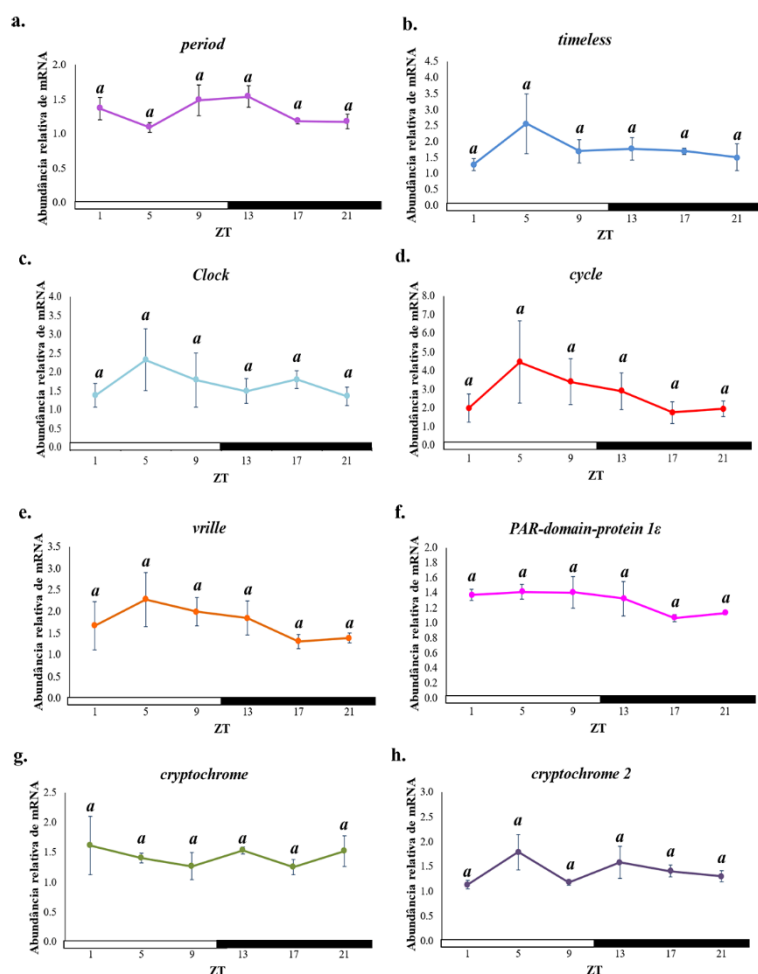


Figura 11. Perfil temporal da expressão relativa dos genes do relógio em ovários de fêmeas virgens em LD 12:12, mensurada por PCR quantitativa em tempo real.

O gráfico mostra a expressão média de *per* (a), *tim* (b), *Clk* (c), *cyc* (d), *vri* (e), *Pdp1ε* (f), *cry1* (g) e *cry2* (h) em fotoperíodos de 12 horas de luminosidade e 12 horas de escuridão (LD12:12). O eixo das ordenadas (y) indica a abundância relativa de RNA mensageiro e o eixo das abscissas (x), o tempo do *Zeitgeber* (*Zeitgeber Time*, ZT). Barras brancas delimitam os ZTs da fase clara do fotoperíodo 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. Barras verticais representam o erro padrão (SEM). O gráfico foi obtido através da média de quatro experimentos independentes (n=4). A análise de dados foi realizada utilizando o teste paramétrico ANOVA (*One Way*). Letras minúsculas diferentes indicam que os valores dos respectivos pontos diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Tukey (p < 0.05).

Os resultados da análise de variância das médias obtidas dos valores logarítmicos do  $\Delta\Delta Ct$  normalizado (Tabela 5) mostram que, no grupo FV (fêmeas virgens), os genes de relógio não apresentam diferenças significativas em seus valores de expressão em nenhum dos ZTs ( $p > 0,05$ ). A análise pelo CircWave apontou significância na distribuição dos dados apenas em *Pdp1ε*, ainda que a ANOVA não tenha apontado diferenças entre os valores de cada ZT (Tabela 5).

**Tabela 5.** Valores da Análise de variância (*One-way ANOVA*) e de CircWave a partir dos valores de expressão dos genes de relógio em ovários de fêmeas de *A. aegypti* virgens (FV) e submetidas a fotoperíodo LD12:12.

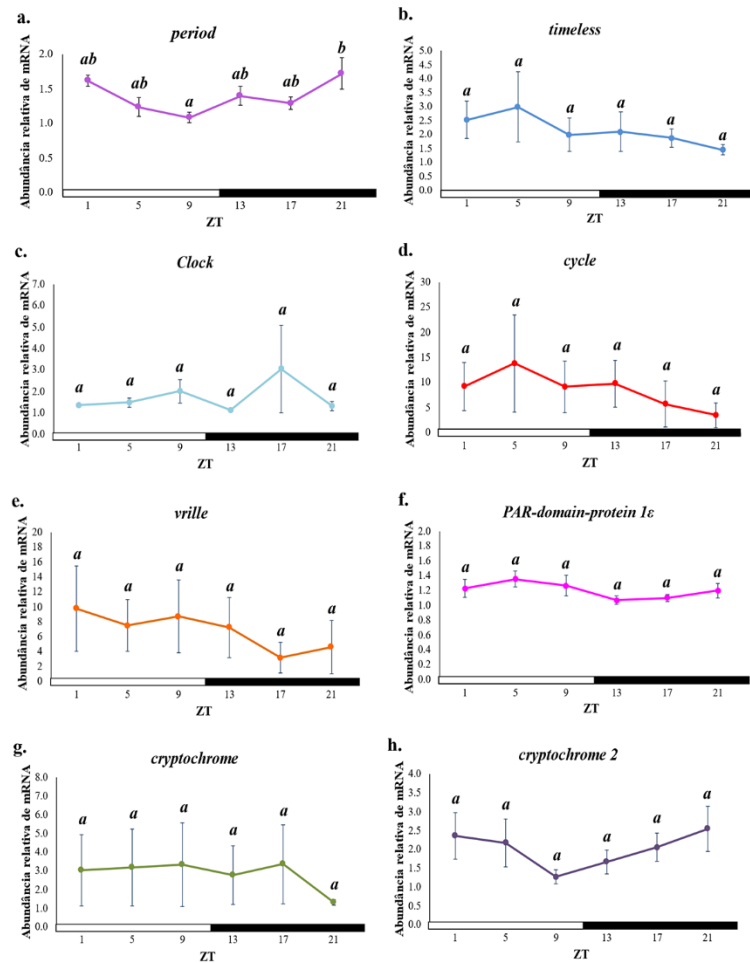
Gene	ANOVA		CircWave	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>
<i>period</i>	$F_{5,18} = 1,640$	0,2002 (NS)	(NS)	0
<i>timeless</i>	$F_{5,18} = 0,7268$	0,6123 (NS)	(NS)	0
<i>Clock</i>	$F_{5,12} = 0,5144$	0,7607 (NS)	(NS)	0
<i>cycle</i>	$F_{5,18} = 0,6929$	0,6354 (NS)	(NS)	0
<i>vrille</i>	$F_{5,18} = 0,8297$	0,5452 (NS)	(NS)	0
<i>Par-domain-protein 1ε</i>	$F_{5,18} = 1,454$	0,2532 (NS)	0,0421 (*)	0,2603
<i>cryptochrome 1</i>	$F_{5,12} = 0,3545$	0,8697 (NS)	(NS)	0
<i>cryptochrome 2</i>	$F_{5,18} = 1,066$	0,4111 (NS)	(NS)	0

NS: valor não significativo ( $p > 0,05$ ); \*: valor significativo ( $p < 0,05$ )

### 5.1.2 Perfis temporais de expressão dos genes em fêmeas inseminadas (FI)

Os perfis temporais de expressão dos genes de relógio nos ovários de fêmeas inseminadas são representados na Figura 12.





**Figura 12. Perfil temporal da expressão relativa dos genes do relógio em ovários de fêmeas inseminadas em LD 12:12, mensurada por PCR quantitativa em tempo real.**

O gráfico mostra a expressão de *per* (a), *tim* (b), *Clk* (c), *cyc* (d), *vri* (e), *Pdp1ε* (f), *cry1* (g) e *cry2* (h) em fotoperíodos de 12 horas de luminosidade e 12 horas de escuridão (LD12:12). O eixo das ordenadas (y) indica a abundância relativa de RNA mensageiro e o eixo das abscissas (x), o tempo de *Zeitgeber* (*Zeitgeber Time*, ZT). Barras brancas delimitam os ZTs da fase clara do fotoperíodo 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. Barras verticais representam o erro padrão (SEM). O gráfico foi obtido através da média de quatro experimentos independentes (n=4). A análise de dados foi realizada utilizando o teste paramétrico ANOVA (*One Way*). Letras minúsculas diferentes indicam que os valores dos respectivos pontos diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

No grupo experimental FI em LD 12:12, observamos um perfil oscilatório apenas na expressão do gene *period*. Em *period*, ambas as análises utilizadas (ANOVA e CircWave) mostraram a ocorrência de diferenças significativas entre os valores dos ZTs (Tabela 6). As comparações múltiplas pelo teste de Tukey indicaram que essa diferença ( $p = 0,0317$ ) ocorreu entre os ZTs 9 (fase clara do ciclo) e 21 (fase escura do ciclo), sendo o primeiro o vale da curva e o segundo o pico da curva de expressão (Figura 12).

**Tabela 6.** Valores da Análise de variância (*One-way ANOVA*) e de CircWave a partir dos valores de expressão dos genes de relógio em ovários de fêmeas de *A. aegypti* inseminadas (FI) e submetidas a fotoperíodo LD12:12.

Gene	ANOVA		CircWave	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>
<i>period</i>	$F_{5,18} = 3,426$	0,0238 (*)	0,0109 (*)	0,35
<i>timeless</i>	$F_{5,18} = 0,5956$	0,7037 (NS)	(NS)	0
<i>Clock</i>	$F_{5,12} = 0,5186$	0,7578 (NS)	(NS)	0
<i>cycle</i>	$F_{5,18} = 0,6241$	0,6835 (NS)	(NS)	0
<i>vrille</i>	$F_{5,18} = 0,4219$	0,8274 (NS)	(NS)	0
<i>Par-domain-protein 1ε</i>	$F_{5,18} = 1,128$	0,3810 (NS)	(NS)	0
<i>cryptochrome 1</i>	$F_{5,12} = 0,1338$	0,9814 (NS)	(NS)	0
<i>cryptochrome 2</i>	$F_{5,18} = 0,9767$	0,4584 (NS)	(NS)	0

NS: valor não significativo ( $p > 0,05$ ); \*: valor significativo ( $p < 0,05$ )

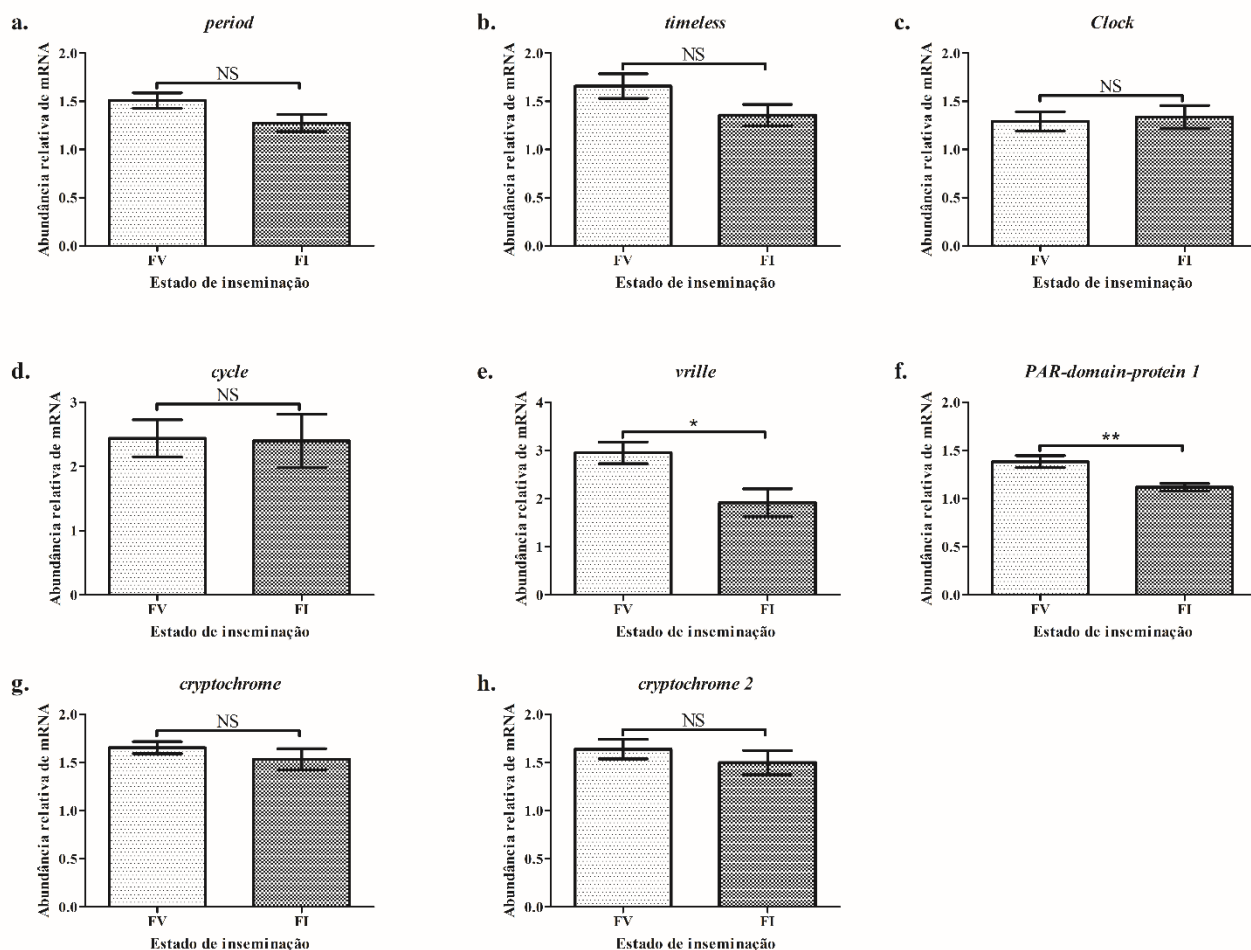
### 5.1.3 Alteração dos perfis entre grupos experimentais

Uma vez que encontramos poucas evidências da variação de expressão periódica entre os genes estudados em LD, recorreremos ao teste *t* para acessar possíveis diferenças nos valores de expressão relativa e a natureza dessa diferença entre os grupos experimentais. Apenas *vrille* e *Pdp1ε* tiveram sua expressão alterada entre FV e FI (Tabela 7), sendo que ambos os genes tiveram sua expressão reduzida nos ovários de FI (Figura 13).

**Tabela 7.** Valores do teste *t* da expressão dos genes de relógio entre ovários de fêmeas de *A. aegypti* virgens e inseminadas, submetidas a fotoperíodo LD12:12.

Gene	<i>T</i>	<i>p</i>
<i>period</i>	1,952	0,0795 (NS)
<i>timeless</i>	1,785	0,1046 (NS)
<i>Clock</i>	0,2869	0,7801 (NS)
<i>cycle</i>	0,07934	0,9383 (NS)
<i>vrille</i>	2,832	0,0178 (*)
<i>Par-domain-protein 1ε</i>	3,658	0,0044 (**)
<i>cryptochrome 1</i>	0,9488	0,3651 (NS)
<i>cryptochrome 2</i>	0,8674	0,4061 (NS)

NS: valor não significativo ( $p > 0,05$ ); \*: valor significativo ( $p < 0,05$ ); \*\*: valor significativo ( $p < 0,01$ )



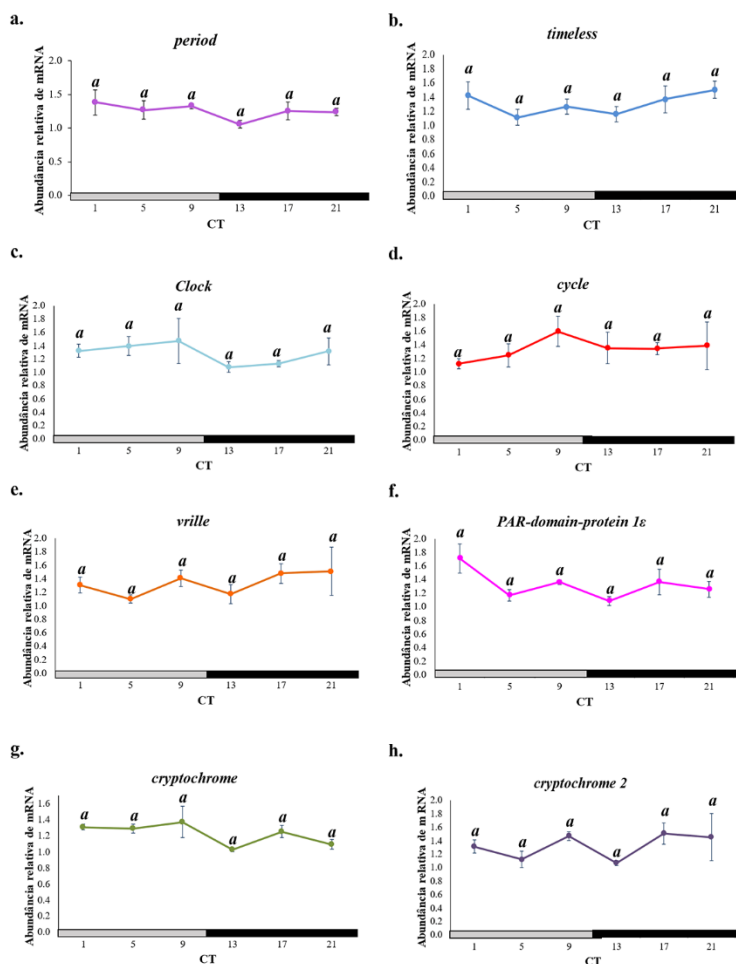
**Figura 13. Representação do teste *t* entre os valores de expressão relativa dos genes de relógio dos grupos FV e FI em LD 12:12.**

O gráfico as análises feitas com os genes *per* (a), *tim* (b), *Clk* (c), *cyc* (d), *vri* (e), *Pdp1ε* (f), *cry1* (g) e *cry2* (h) em fotoperíodos de 12 horas de luminosidade e 12 horas de escuridão (LD12:12). O eixo das ordenadas (y) indica o valor de abundância relativa de mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) normalizado pelo menor valor de ambos os grupos experimentais. O eixo das abscissas (x), indica os grupos experimentais. Barras verticais representam o erro padrão (SEM), (n=4). O símbolo “NS” indica ausência de diferenças significativas entre os valores dos grupos experimentais. Os símbolos “\*” (p < 0,05) e “\*\*” (p < 0,01) indicam diferenças significativas entre os valores dos grupos comparados.

## 5.2 Perfis de expressão temporal em escuridão constante (DD)

### 5.2.1 Perfis temporais de expressão dos genes em fêmeas virgens (FV)

Os perfis temporais de expressão dos genes de relógio nos ovários de fêmeas virgens em condição de escuridão constante são representados na Figura 14.



**Figura 14. Perfil temporal da expressão relativa dos genes do relógio em ovários de fêmeas virgens em DD, mensurada por PCR quantitativa em tempo real.**

O gráfico mostra a expressão de *per* (a), *tim* (b), *Clk* (c), *cyc* (d), *vri* (e), *Pdp1ε* (f), *cry1* (g) e *cry2* (h) em fotoperíodo de escuridão constante (DD). O eixo das ordenadas (y) indica a abundância relativa de RNA mensageiro e o eixo das abscissas (x), o tempo circadiano (*Circadian Time*, CT). Barras horizontais em cinza delimitam os CTs da fase clara subjetiva do fotoperíodo e a barra preta, a fase escura subjetiva. O CT1 representa uma hora após o acender o início da fase clara subjetiva e o CT13, uma hora após o início da fase escura subjetiva. Barras verticais representam o erro padrão (SEM). O gráfico foi obtido através da média de três experimentos independentes (n=3). A análise de dados foi realizada utilizando o teste paramétrico ANOVA (*One Way*). Letras minúsculas diferentes indicam que os valores dos respectivos pontos diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os resultados da análise de variância das médias obtidas dos valores logarítmicos do  $\Delta\Delta Ct$  normalizado (Tabela 8) mostram que no grupo FV (fêmeas virgens), sob escuridão constante, os genes de relógio não apresentam diferenças significativas em seus valores de expressão em nenhum dos CTs ( $p > 0,05$ ). A análise pelo CircWave não indicou distribuição circular dos valores de nenhum dos genes estudados (Tabela 8).

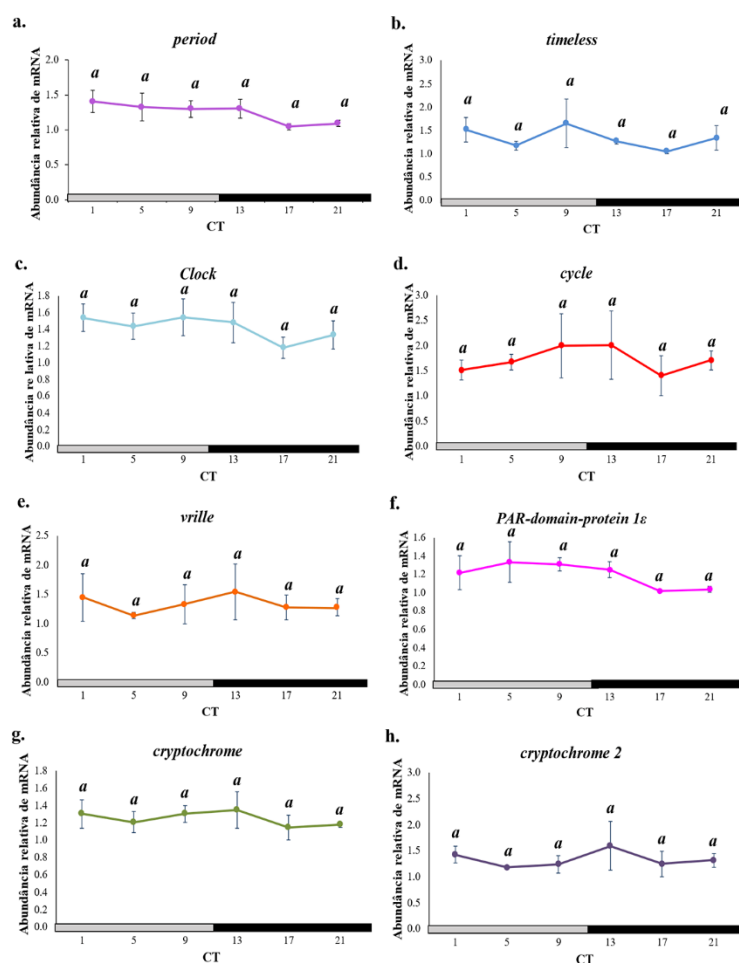
**Tabela 8.** Valores da Análise de variância (*One-way ANOVA*) e de CircWave a partir dos valores de expressão dos genes de relógio em ovários de fêmeas de *A. aegypti* virgens (FV) e submetidas a fotoperíodo DD.

Gene	ANOVA		CircWave	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	r <sup>2</sup>
<i>period</i>	$F_{5,12} = 1,022$	0,4473 (NS)	(NS)	0
<i>timeless</i>	$F_{5,12} = 1,097$	0,4112 (NS)	(NS)	0
<i>Clock</i>	$F_{5,12} = 0,7473$	0,6034 (NS)	(NS)	0
<i>cycle</i>	$F_{5,12} = 0,5910$	0,7074 (NS)	(NS)	0
<i>vrille</i>	$F_{5,12} = 0,9527$	0,4829 (NS)	(NS)	0
<i>Par-domain-protein 1ε</i>	$F_{5,12} = 2,349$	0,1047 (NS)	(NS)	0
<i>cryptochrome 1</i>	$F_{5,12} = 2,632$	0,0787 (NS)	(NS)	0
<i>cryptochrome 2</i>	$F_{5,12} = 1,487$	0,2649 (NS)	(NS)	0

NS: valor não significativo ( $p > 0,05$ )

### 5.2.2 Perfis temporais de expressão dos genes em fêmeas inseminadas (FI)

Os perfis temporais de expressão dos genes de relógio nos ovários de fêmeas inseminadas mantidas em DD são representados na Figura 15.



**Figura 15. Perfil temporal da expressão relativa dos genes do relógio em ovários de fêmeas inseminadas em DD, mensurada por PCR quantitativa em tempo real.**

O gráfico mostra a expressão de *per* (a), *tim* (b), *Clk* (c), *cyc* (d), *vri* (e), *Pdp1ε* (f), *cry1* (g) e *cry2* (h) em fotoperíodo de escuridão constante (DD). O eixo das ordenadas (y) indica a abundância relativa de RNA mensageiro e o eixo das abscissas (x), o tempo circadiano (*Circadian Time*, CT). Barras horizontais em cinza delimitam os CTs da fase clara subjetiva do fotoperíodo e a barra preta, a fase escura subjetiva. O ZT1 representa uma hora após o acender o início da fase clara subjetiva e o ZT13, uma hora após o início da fase escura subjetiva. Barras verticais representam o erro padrão (SEM). O gráfico foi obtido através da média de três experimentos independentes (n=3). A análise de dados foi realizada utilizando o teste paramétrico ANOVA (*One Way*). Letras minúsculas diferentes indicam que os valores dos respectivos pontos diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os resultados da análise de variância das médias obtidas dos valores logarítmicos do  $\Delta\Delta Ct$  normalizado (Tabela 9) mostram que no grupo FI (fêmeas inseminadas), sob escuridão constante, os genes de relógio não apresentam indicativos de ritmicidade, visto que seus valores de expressão relativa não se alteram significativamente com o tempo ou em seus valores de expressão em nenhum dos CTs ( $p > 0,05$ ) estudados. A análise por CircWave indicou um valor significativo

apenas em *Pdp1ε* (Tabela 9), contudo, como no caso do grupo FV em fotoperíodo LD 12:12, esse resultado não pode ser considerado como um indicativo de ritmicidade, visto que os resultados da ANOVA não indicaram diferenças entre os valores de nenhum dos pontos da série circadiana.

**Tabela 9.** Valores da Análise de variância (*One-way ANOVA*) e de CircWave a partir dos valores de expressão dos genes de relógio em ovários de fêmeas de *A. aegypti* inseminadas (FI) e submetidas a fotoperíodo DD.

Gene	ANOVA		CircWave	
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	r <sup>2</sup>
<i>period</i>	$F_{5,12} = 1,361$	0,3053 (NS)	(NS)	0
<i>timeless</i>	$F_{5,12} = 0,6678$	0,6553 (NS)	(NS)	0
<i>Clock</i>	$F_{5,12} = 0,5557$	0,7319 (NS)	(NS)	0
<i>cycle</i>	$F_{5,12} = 0,2961$	0,9059 (NS)	(NS)	0
<i>vrille</i>	$F_{5,12} = 0,1392$	0,9797 (NS)	(NS)	0
<i>PAR-domain-protein</i> <i>1ε</i>	$F_{5,12} = 1,351$	0,3086 (NS)	0,0468 (*)	0,3351
<i>cryptochrome 1</i>	$F_{5,12} = 0,3391$	0,8796 (NS)	(NS)	0
<i>cryptochrome 2</i>	$F_{5,12} = 0,3452$	0,8757 (NS)	(NS)	0

NS: valor não significativo ( $p > 0,05$ ); \*: valor significativo ( $p < 0,05$ )

### 5.2.3 Alteração dos perfis entre grupos experimentais

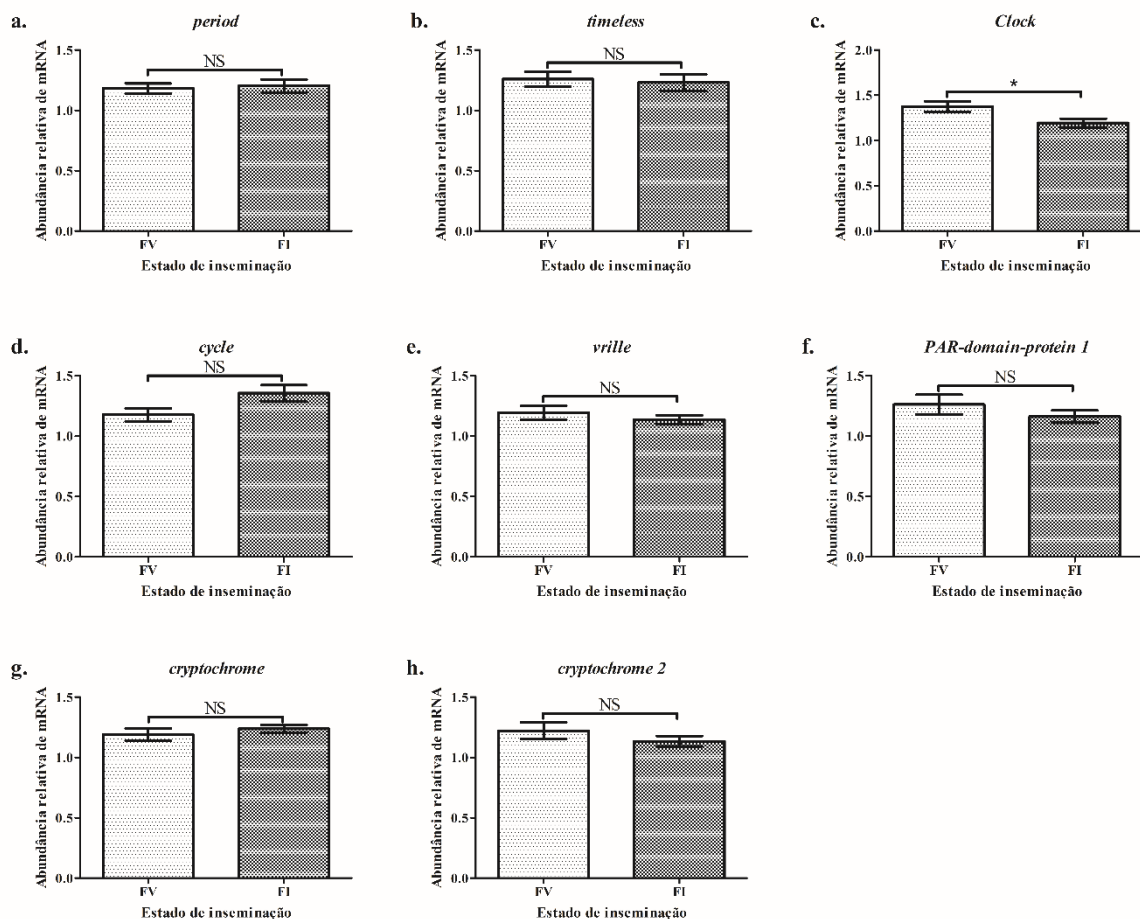
A partir do teste *t* entre os valores de expressão dos grupos FV e FI mantidos em DD, observamos que apenas *Clock* tem sua expressão alterada entre esses grupos experimentais (Tabela 10), sendo reduzida nos ovários de fêmeas inseminadas (Figura 16).

**Tabela 10.** Valores do teste *t* da expressão dos genes de relógio entre ovários de fêmeas de *A. aegypti* virgens e inseminadas, submetidas a fotoperíodo DD.

Gene	<i>t</i>	<i>p</i>
<i>period</i>	0,3199	0,7556 (NS)
<i>timeless</i>	0,3102	0,7628 (NS)
<i>Clock</i>	2,421	0,0360 (*)
<i>cycle</i>	2,084	0,0638 (NS)
<i>vrille</i>	0,8168	0,4331 (NS)
<i>PAR-domain-protein 1ε</i>	1,044	0,3210 (NS)
<i>cryptochrome 1</i>	0,7945	0,4453 (NS)
<i>cryptochrome 2</i>	1,063	0,3126 (NS)

NS: valor não significativo ( $p > 0,05$ ); \*: valor significativo ( $p < 0,05$ )





**Figura 16. Representação do teste *t* entre os valores de expressão relativa dos genes de relógio dos grupos FV e FI em DD.**

O gráfico as análises feitas com os genes *per* (a), *tim* (b), *Clk* (c), *cyc* (d), *vri* (e), *Pdp1ε* (f), *cry1* (g) e *cry2* (h) em condição de 24 horas de escuridão (DD). O eixo das ordenadas (y) indica o valor de abundância relativa de mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) normalizado pelo menor valor de ambos os grupos experimentais. O eixo das abscissas (x), indica os grupos experimentais. Barras verticais representam o erro padrão (SEM), (n=3). O símbolo "NS" indica ausência de diferenças significativas entre os valores dos grupos experimentais. O símbolo "\*" (p < 0,05) indica diferenças significativas entre os valores dos grupos comparados.

### 5.3 Alterações dos perfis de expressão entre diferentes condições de luz

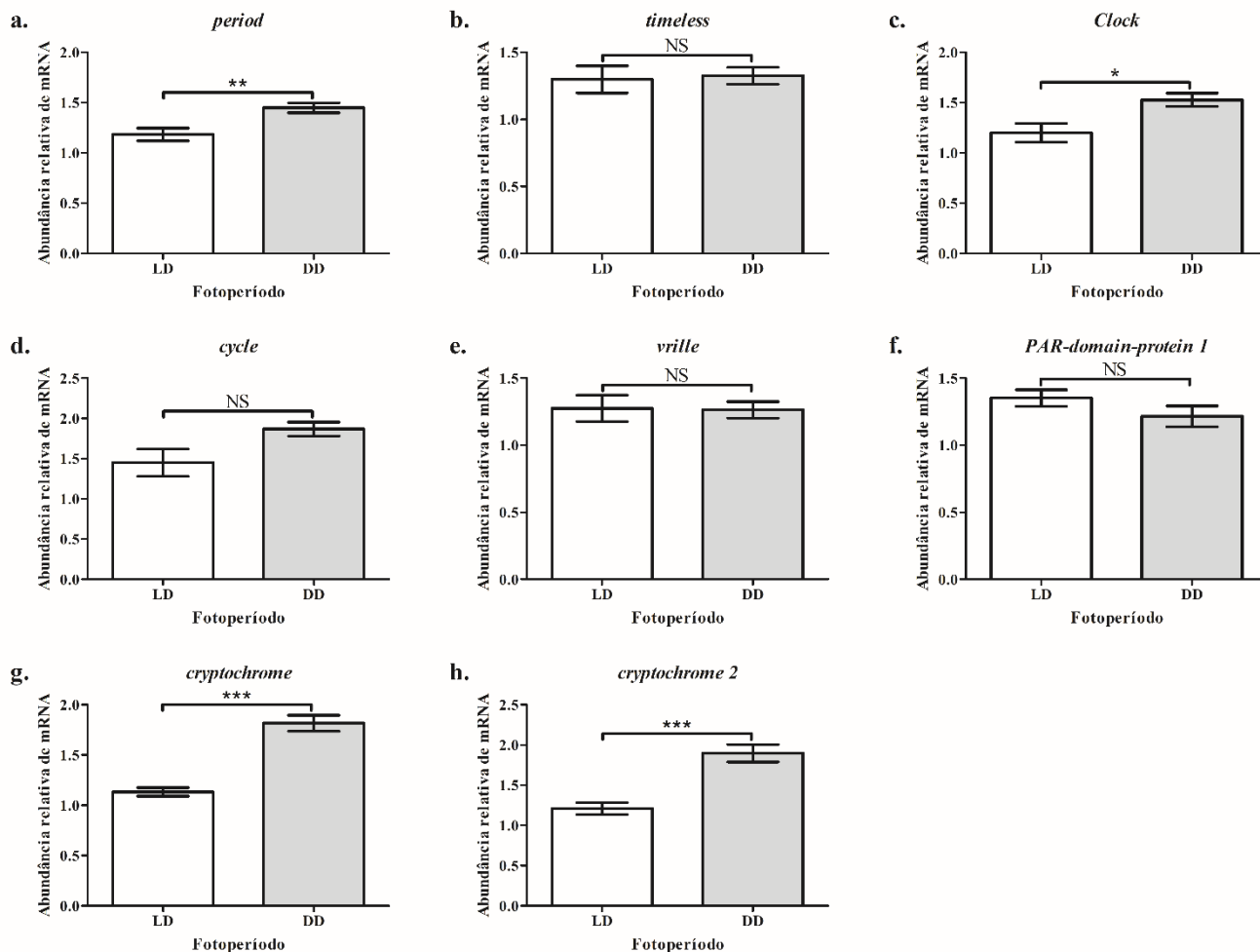
Após verificarmos possíveis alterações no perfil de expressão entre nossos grupos experimentais, comparamos, pelo teste *t*, os valores de expressão entre os dois regimes que estudamos (LD 12:12 e DD), com o intuito de investigarmos se esses genes são expressos da mesma forma com ou sem a presença de luz. Surpreendentemente, observamos que a maioria dos genes estudados apresenta uma abundância relativa de mRNA menor em LD 12:12 que em DD, considerando as comparações tanto dentro da condição FV quanto da condição FI.

Em fêmeas virgens, verificamos que quatro (*per*, *Clock*, *cry1* e *cry2*) dos oito genes estudados tiveram sua expressão alterada entre condições de luz (Tabela 11), nos quais houve um aumento da expressão relativa em ovários de fêmeas submetidas a escuridão constante (Figura 17).

**Tabela 11.** Valores do teste *t* da expressão dos genes de relógio entre ovários de fêmeas de *A. aegypti* virgens submetidas a LD12:12 e DD.

Gene	<i>t</i>	<i>p</i>
<i>period</i>	3,309	0,0079 (**)
<i>timeless</i>	0,2244	0,8270 (NS)
<i>Clock</i>	2,876	0,0165 (*)
<i>cycle</i>	2,177	0,0545 (NS)
<i>vriIle</i>	0,1007	0,9218 (NS)
<i>PAR-domain-protein 1ε</i>	1,373	0,1996 (NS)
<i>cryptochrome 1</i>	7,557	< 0,0001 (***)
<i>cryptochrome 2</i>	5,260	0,0004 (***)

NS: valor não significativo ( $p > 0,05$ ); \*: valor significativo ( $p < 0,05$ ); \*\*: valor significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\*: valor significativo ( $p < 0,001$ ).



**Figura 17. Representação do teste t entre os valores de expressão relativa dos genes de relógio em ovários de fêmeas virgens submetidas a LD 12:12 e DD.**

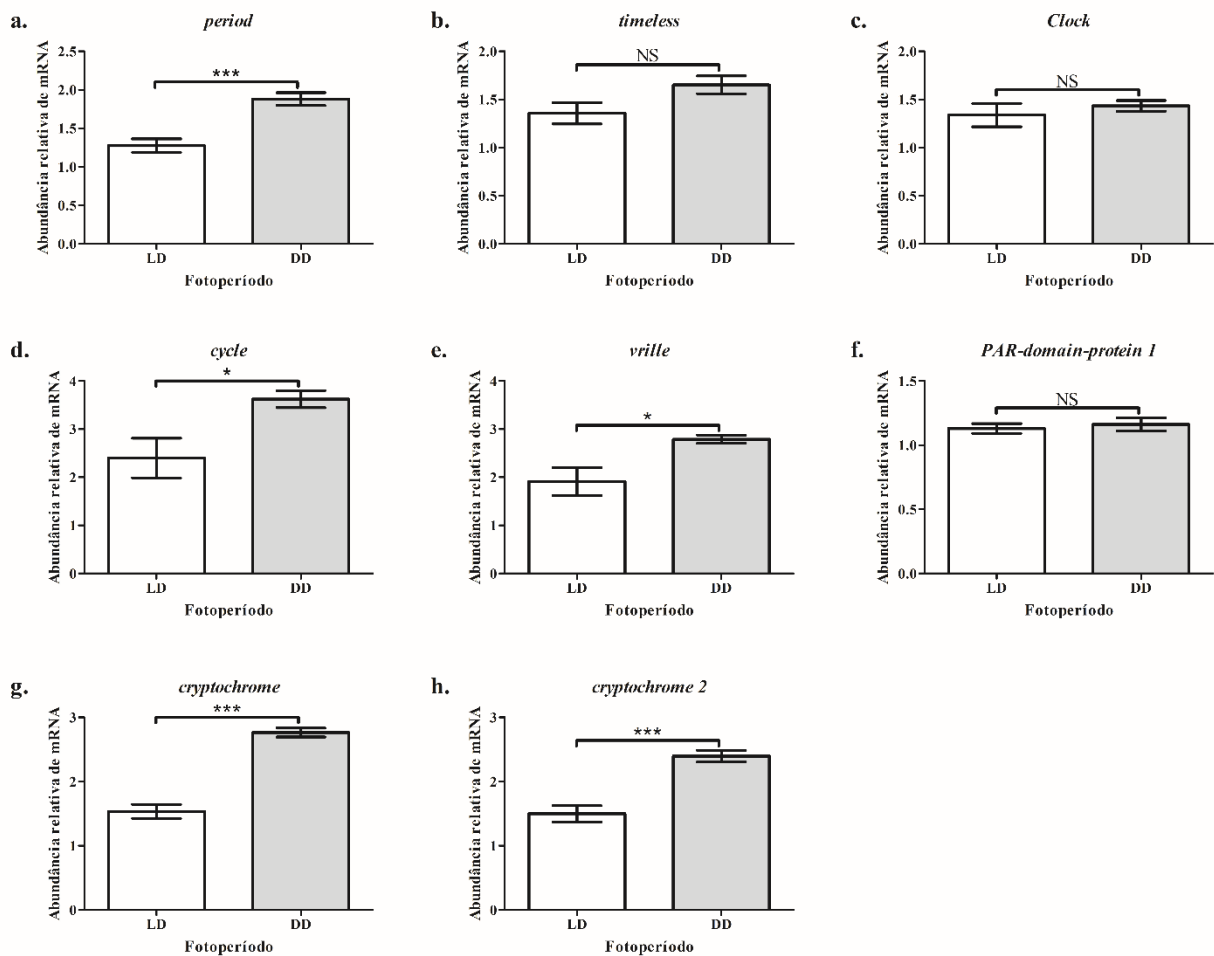
O gráfico ilustra as análises feitas com os genes *per* (a), *tim* (b), *Clk* (c), *cyc* (d), *vri* (e), *Pdp1ε* (f), *cry1* (g) e *cry2* (h) em fêmeas virgens (FV). O eixo das ordenadas (y) indica o valor de abundância relativa de mRNA ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) normalizado pelo menor valor de ambos os grupos experimentais. O eixo das abscissas (x), indica as a condição de luz. Barras verticais representam o erro padrão (SEM). O símbolo "NS" indica ausência de diferenças significativas entre os valores dos grupos experimentais. Os símbolos "\*" ( $p < 0,05$ ), "\*\*\*" ( $p < 0,01$ ) e "\*\*\*\*" ( $p < 0,001$ ) indicam diferenças significativas entre os valores dos grupos comparados.

Em fêmeas inseminadas, cinco (*per*, *cyc*, *vri*, *cry1* e *cry2*) dos oito genes estudados tiveram sua expressão alterada entre condições de luz (Tabela 12), nos quais novamente observamos um aumento nos valores de expressão relativa em insetos submetidos à escuridão constante (Figura 18).

**Tabela 12.** Valores do teste t da expressão dos genes de relógio entre ovários de fêmeas de *A. aegypti* inseminadas submetidas a LD12:12 e DD.

Gene	t	p
<i>period</i>	4,938	0,0006 (***)
<i>timeless</i>	2,049	0,0677 (NS)
<i>Clock</i>	0,7236	0,4859 (NS)
<i>cycle</i>	2,715	0,0217 (*)
<i>vri</i>	2,922	0,0153 (*)
<i>PAR-domain-protein 1ε</i>	0,4952	0,6312 (NS)
<i>cryptochrome 1</i>	9,489	< 0,0001 (***)
<i>cryptochrome 2</i>	5,776	0,0002 (***)

NS: valor não significativo ( $p > 0,05$ ); \*: valor significativo ( $p < 0,05$ ); \*\*: valor significativo ( $p < 0,01$ ); \*\*\*: valor significativo ( $p < 0,001$ ).



**Figura 18. Representação do teste t entre os valores de expressão relativa dos genes de relógio em ovários de fêmeas inseminadas submetidas a LD 12:12 e DD.**

O gráfico ilustra as análises feitas com os genes *per* (a), *tim* (b), *Clk* (c), *cyc* (d), *vri* (e), *Pdp1ε* (f), *cry1* (g) e *cry2* (h) em fêmeas inseminadas (FI). O eixo das ordenadas (y) indica o valor de abundância relativa de mRNA ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) normalizado pelo menor valor de ambos os grupos experimentais. O eixo das abscissas (x), indica as condições de luz. Barras verticais representam o erro padrão (SEM). O símbolo “NS” indica ausência de diferenças significativas entre os valores dos grupos experimentais. Os símbolos “\*” ( $p < 0,05$ ), “\*\*\*” ( $p < 0,01$ ) e “\*\*\*\*” ( $p < 0,001$ ) indicam diferenças significativas entre os valores dos grupos comparados.

## 6 DISCUSSÃO

Insetos apresentam uma série de processos reprodutivos rítmicos com perfil circadiano. No mosquito *Aedes aegypti*, a oviposição e a fecundidade ótima, por exemplo, dependem de ciclos diários de luz e escuridão (16). Entretanto, ainda não é claro se esses ritmos são produzidos apenas pela oscilação do marcapasso central ou se outros osciladores, localizados em tecidos periféricos, contribuem para a sua produção. Além disso, o perfil de certos ritmos, como atividade locomotora, pode ser alterado tanto em machos como em fêmeas quando sujeitos a eventos da história reprodutiva, como o encontro com o parceiro (25), inseminação e alimentação sanguínea (26). Devido a isso, nós tínhamos como hipótese que os ovários de *A. aegypti* apresentam um mecanismo oscilatório que poderia ser sincronizado por alterações fisiológicas da história de vida das fêmeas desse mosquito (e.g., inseminação por machos conspecíficos).

Para investigação da nossa hipótese, estudamos o perfil diário e circadiano de expressão de oito genes canônicos do relógio de *Drosophila melanogaster* nos ovários em estágio previtelogênico de *A. aegypti* em fêmeas adultas virgens e inseminadas. Utilizamos a ANOVA one-way para identificar diferenças na expressão entre as fases do período de 24 horas e, em seguida, empregamos o CircWave para investigar se os valores de expressão estavam distribuídos de forma senoidal, como esperado de uma oscilação.

Apesar de a análise por CircWave ter apontado uma distribuição senoidal dos valores do perfil em alguns casos (i.e., *Pdp1ε* em FV-LD e em FI-DD), esse resultado não pode ser considerado, visto que a análise prévia por ANOVA mostrou que não existem diferenças entre os valores dos pontos de tempo analisados. Essa abordagem tem sido empregada por outros autores na ritmometria da expressão de genes de relógio de outros organismos, nos quais são considerados apenas os casos em que ambas as metodologias apontam diferenças significativas entre os valores e distribuição senoidal (82,142,143). De qualquer forma, a concordância entre os resultados de ANOVA e CircWave na análise dos demais casos em nosso trabalho reforça a condição rítmica ou arrítmica da expressão desses genes.

## 6.1 Perfil de expressão temporal dos genes de relógio

Em fêmeas adultas virgens mantidas em fotoperíodo LD 12:12, não identificamos alterações na abundância relativa de mRNA em nenhum dos genes estudados que mostrassem um perfil de expressão temporal bem definido. Diferenças temporais na expressão dos genes de relógio são um forte indicador de um oscilador funcional, já que, elementos de regulação negativa (e.g., *per*, *tim* e *cry2* em *D. melanogaster*) inibem a atuação de elementos de regulação positiva (e.g., *Clk* e *cyc* em *D. melanogaster*) na transcrição dos próprios genes de relógio e genes controlados pelo relógio que atuam em vias posteriores (5). Dessa forma, a ausência de variação temporal na expressão desses genes sugere a ausência do mecanismo de autorregulação típica dos osciladores do sistema nervoso central.

Nossos resultados condizem com observações anteriores da expressão gênica de *period* nos ovários de *D. melanogaster*, sem perfil oscilatório (144,145). Nesse inseto, as proteínas PER e TIM também apresentam níveis constitutivos no citoplasma das células foliculares e não são translocadas para o núcleo (99).

Rush et al. (100) observaram que, em ovários de *D. melanogaster*, a presença constitutiva de PER e TIM e a insensibilidade de TIM à luz ocorrem devido à ausência de expressão de *cry1* nos ovários. Ao induzirem a expressão ectópica desse gene, esses autores observaram redução na abundância tanto de PER como de TIM, reforçando sua conclusão que *cry1* é um elemento chave para a indução da oscilação dos componentes do relógio nos ovários dessa mosca (100). Entretanto, verificamos que *cry1* é expresso constitutivamente nos ovários de *A. aegypti* independente da condição fisiológica ou fotoperíodo, demonstrando que o perfil arritmico da expressão dos genes do relógio que estudamos não pode ser explicado simplesmente pela ausência da expressão de *cry1* nos ovários de *A. aegypti*.

É possível que a arritmia da expressão dos genes de relógio que observamos possa resultar da ausência de outros componentes essenciais para a dinâmica temporal de interação dos componentes de relógio e, portanto, para que esses componentes formem um mecanismo oscilatório. Um desses componentes é a quinase DOUBLETIME (DBT), essencial para a redução da estabilidade de PER no citoplasma, o que impede sua acumulação precoce e permite a formação e translocação do complexo PER/TIM no início da escotofase (72). Kotwica et al. (101) verificaram que em câmaras de ovos dos folículos de *D. melanogaster* em estágio previtelogênico DBT estava ausente e só começava a ser identificada no estágio de

desenvolvimento 9 (estágio vitelogênico), fase na qual PER tem sua abundância citoplasmática reduzida e aparece no núcleo de algumas células foliculares. É possível que, assim como em *D. melanogaster*, *dbt* seja expresso somente em folículos de *A. aegypti* no estágio vitelogênico, o qual se inicia apenas com a alimentação sanguínea(146).

Dados preliminares obtidos por Resck, M. E. B. (2020) não indicam a presença de um perfil de expressão circadiano em *tim*, *vri* e *cry2* nos ovários de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue. Segundo essa autora, a expressão de *period* aparenta um perfil temporal rítmico, contudo, mais ensaios de expressão desse gene são necessários para a performance de uma análise estatística. Isso sugere que, caso haja um mecanismo de oscilação endógena nos ovários desse inseto, tal mecanismo não envolve a regulação da expressão desses genes de relógio. Mais observações do perfil de expressão dos genes de relógio em fêmeas alimentadas são essenciais para confirmar esses dados.

Em fêmeas inseminadas mantidas em LD 12:12, observamos um perfil rítmico de expressão apenas em *period*, o qual apresenta um pico de expressão no ZT 21 (escotofase) e um vale no ZT 9 (fotofase), embora o baixo valor de  $r^2$  do CircWave (0,35) indique um ritmo menos robusto que o observado em cabeças de machos ( $r^2 = 0,99$ ) (Bezerra, J. R. A. 2020). De qualquer forma, esse perfil de expressão não é circadiano (*i.e.*, produzido por um mecanismo oscilatório próprio do tecido), visto que não se manteve em fêmeas inseminadas acondicionadas em escuridão constante (DD), sendo apenas um mascaramento produzido na presença do *Zeitgeber* luz.

A oscilação da expressão de *per* nessa condição pode ter sido produzida por uma redução da expressão desse gene durante a fotofase por meio de neuropeptídeos que podem comunicar os ritmos produzidos em osciladores em outros tecidos até os ovários. Neuropeptídeos, como o NPF e o *small* NPF (sNPF), são conhecidos por comunicar o marcapasso central com osciladores periféricos em *D. melanogaster* (34,35), entretanto, nenhuma via de comunicação de oscilações circadianas até os ovários é conhecida em *A. aegypti* até o momento. Des Marteaux et al. (147) identificaram que o transportador vesicular de glutamato (VGlut), expresso nos neurônios dorsais do percevejo *Riptortus pedestris* é essencial para a indução de diapausa em fêmeas desse inseto em dias curtos, identificada pela cessão do desenvolvimento dos ovários. Esses autores demonstraram que a interferência na expressão de *VGlut* leva ao desenvolvimento de ovários em fêmeas mantidas em



fotoperíodo LD 12:12 (*i.e.*, revertia a indução à diapausa). A comunicação via glutamato, entretanto, ocorre entre neurônios do relógio central (148) e, provavelmente, o efeito produzido nos ovários depende de vias de sinalização posteriores.

Outra explicação possível para perfil arritmico observado na expressão dos genes de relógio em ovários no estágio previtelogênico é a presença de diferentes tipos celulares nos folículos: folículos primários em *A. aegypti* apresentam células de epitélio, um oócito e sete células acessórias, além de germários com células embrionárias pouco diferenciadas (149). Essa heterogeneidade nos tecidos ovarianos poderia mascarar a presença de osciladores em tipos celulares específicos caso essas células não estejam sincronizadas pelos mesmos *Zeitgebers* ou estejam em fases diferentes, como ocorre com populações de células cultivadas caso sejam dessincronizadas (150,151). Além disso, Fonseca et al. (137) mostraram que em células embrionárias de *A. aegypti* da linhagem Aag2 a maioria dos genes de relógio-com exceção de *per-* não apresenta um perfil de expressão circadiano, fenômeno que talvez possa ocorrer também com os tipos celulares dos ovaríolos.

Além dos diferentes tipos celulares, é necessário levar em conta que os ovários em *A. aegypti* são órgãos dinâmicos e a progressão ou reabsorção dos folículos depende da condição fisiológica dos mosquitos (152). Clifton e Noriega (153) demonstraram que fêmeas adultas alimentadas com sacarose na concentração 20%, e tratadas com hormônio juvenil III (HJIII) ainda durante o estágio previtelogênico, acumulavam mais lipídeos nos ovários, reabsorviam menos folículos no estágio vitelogênico e apresentavam maior fecundidade. Clifton et al. (125) também mostraram que o HJIII transferido pelos machos durante a inseminação é essencial para a manutenção dos folículos das fêmeas durante o estágio previtelogênico e para sua fecundidade ótima. Dessa forma, a investigação do perfil de expressão dos genes de relógio em folículos em estágios de desenvolvimento similares é pertinente, pois possibilitará confirmar se a arritmia observada é um mascaramento provocado pela heterogeneidade celular dos ovários.

## **6.2 Diferenças na expressão dos genes de relógio entre fêmeas virgens e inseminadas**

Nossa investigação sobre o efeito da inseminação no perfil de expressão dos genes de relógio levou em conta que esse é um importante evento da história

reprodutiva das fêmeas e muitos genes em *A. aegypti* têm sua expressão alterada por ele (131). Além disso, *period* apresenta expressão oscilatória independente da presença de componentes de regulação positiva do relógio nos embriões de *D. melanogaster* (154), o que nos levou a questionar se essa oscilação era causada por eventos prévios da história reprodutiva das fêmeas.

Com exceção de *per*, nenhum outro gene teve seu padrão de expressão temporal alterado pela inseminação. O perfil rítmico da expressão de *per* só foi observado em fêmeas mantidas em LD 12:12, o que pode ter sido provocado por uma redução na expressão desse gene causada pela sinergia entre inseminação e luz durante a fotofase. A inseminação pode ter aumentado a sensibilidade das fêmeas à luz ou, pelo menos, a sensibilidade dos tecidos dos ovários para receberem sinais externos ou de outras partes do corpo, os quais podem ter reduzido a expressão de *per* na fotofase.

O papel da inseminação em conjunto à luz é reforçado quando observamos que *vri* e *Pdp1ε* em fêmeas inseminadas submetidas a fotoperíodo LD 12:12 têm uma expressão menor que fêmeas virgens nessa mesma condição, o que não ocorre entre FV e FI mantidas em escuridão constante (DD). Curiosamente, VRI e PDP1ε são, ambos, zíperes básicos de leucina, fatores de transcrição que, em plantas, possuem vários representantes cujos genes têm sua expressão modulada pela luz (155,156). Assim, o fato de *vri* e *Pdp1ε* terem sua expressão alterada em ovários de *A. aegypti* devido principalmente à inseminação, mas em conjunto ao fotoperíodo LD 12:12, indica diferenças na regulação e no papel desses genes entre animais e plantas.

Além de *vri* e *Pdp1ε* em LD, só observamos alterações causadas pela inseminação no gene *Clk* em ovários de fêmeas mantidas em DD. De forma similar, Gentile et al. (129) não detectaram alterações na expressão de quatro genes de relógio (*per*, *tim*, *cyc* e *Clk*) em cabeças e corpos inteiros entre fêmeas virgens e inseminadas mantidas em LD 12:12. Nossos resultados, portanto, reforçam a hipótese desses autores que a inseminação, *per se*, não é um evento relevante ao ponto de alterar a expressão dos genes de relógio nem no oscilador central, nem em tecidos periféricos, como os ovários.

### 6.3 Diferenças na expressão dos genes de relógio entre fêmeas mantidas em LD 12:12 e DD

A redução da expressão relativa de *per*, *Clk*, *cyc*, *vri*, *cry1* e *cry2* em fotoperíodo LD 12:12 indica que em condição de luminosidade, de alguma forma, esses genes têm a sua expressão reduzida. Uma vez que não há evidências que os ovários estão associados diretamente a um mecanismo fotorreceptor (e.g., olhos compostos, ocelos), essa redução pode ser causada por mediadores (e.g., neuropeptídeos) induzidos por osciladores em outros tecidos, como discutido acima. Por outro lado, Giebultowicz (157) argumenta em sua revisão que insetos e invertebrados menos complexos podem ter retido em seus relógios periféricos a capacidade de responder diretamente aos *Zeitgebers* ambientais, visto que a origem evolutiva dos osciladores circadianos pode ser traçada a seres de organização mais simples, cujos osciladores autônomos estão em contato direto com o ambiente. A influência direta da luz na expressão dos genes de relógio nos ovários de *A. aegypti* poderia explicar porque a redução em sua expressão não ocorre em DD, a qual deveria persistir caso fosse induzida por neuropeptídeos dirigidos pelo oscilador central- ou qualquer oscilador de fato-, já que os ritmos produzidos por eles persistem em escuridão constante (35).

Xu et al. (158) observaram que, após a cópula, machos e fêmeas da mariposa *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) apresentam uma maior expressão de *cry1* em cabeças na fotofase em relação à escotofase, o que, segundo os autores, é um indicativo do papel de CRY1 como fotorreceptor atuante na sincronização pela luz. Por outro lado, em fêmeas virgens e copuladas e em machos virgens, *cry2* apresenta uma maior expressão durante a escotofase em relação à fotofase, em fase com genes de outros componentes do relógio (e.g., *per* e *vri*), sugerindo seu papel como repressor da transcrição mediada por CLK/CYC no relógio central de *S. litura* (158). Nossos dados, entretanto, mostram que ambos *cry1* e *cry2* são menos expressos em fotoperíodo LD 12:12 que em escuridão constante, sem qualquer indício de oscilação circadiana. Isso sugere que, nos ovários de *A. aegypti*, independente do *status* de inseminação, *cry1* e *cry2* desempenham papéis diferentes daqueles observados no oscilador central, ainda que sua expressão seja fortemente afetada pela presença de luz.

Considerando-se a ausência de um oscilador endógeno nos ovários de *A. aegypti*, a regulação positiva de alguns genes de relógio contendo E-box (e.g., *per*, *tim*, *vri*) pode ser feita por outros elementos que não o complexo CLK/CYC. Essa

regulação diferenciada em relação ao oscilador central (*i.e.*, não circadiana) poderia explicar a ausência de ritmo observada na expressão desses genes do relógio, mesmo tal expressão sendo inibida em ciclos diários de luz e escuridão, possivelmente por sinalizações advindas de outros tecidos.

Embora o perfil temporal de expressão dos genes de relógio não indique a presença de um oscilador endógeno nos ovários de *A. aegypti*, esses genes possivelmente desempenham outras funções no metabolismo celular desses tecidos. Por exemplo, *vri*, produz um fator de determinação materno em *D. melanogaster* (159) embora seu papel nos ovários em estágio previtelogênico desse mosquito seja desconhecido. Estudos em diferentes modelos de artrópodes têm demonstrado que os genes de relógio são essenciais para a manutenção da fertilidade e fecundidade desses organismos (98,99,102), embora nesses trabalhos, não tenha sido possível desvincular os efeitos da expressão dos genes de relógio entre diferentes tecidos. Kotwica et al. (160), por outro lado, demonstraram- por meio do cultivo *in vitro* do vasos deferentes superiores e RNAi- que *per* é essencial localmente para os ritmos de liberação de esperma na mariposa *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833).

Funções pleiotrópicas dos genes de relógio, bem como seu papel na manutenção da fertilidade, fecundidade e outros parâmetros reprodutivos em *A. aegypti* permanecem ignotos e devem ser explorados em pesquisas posteriores.

## 7 PERSPECTIVAS

- Identificar o papel do oscilador central no perfil de expressão dos genes de relógio em ovários de *Aedes aegypti*.
- Identificar o papel dos genes de relógio em aspectos reprodutivos de *A. aegypti*.
- Analisar o perfil temporal de expressão dos genes do relógio em ovários de *A. aegypti* em estágio vitelogênico.
- Analisar o perfil temporal de expressão dos genes do relógio em folículos dos ovários sob diferentes estágios de desenvolvimento.
- Analisar o perfil temporal de expressão dos genes do relógio em ovários de *A. aegypti* em diferentes ciclos de temperatura.

## 8 CONCLUSÕES

- Os genes de relógio não são expressos de forma circadiana nos ovários de fêmeas virgens *A. aegypti* mantidas em temperatura constante de 25° C.
- A inseminação por machos conspecíficos não altera o perfil de expressão dos genes de relógio em ovários de *A. aegypti*, que permanecem arrítmicos, com exceção do gene *period*, que apresenta perfil de expressão rítmico nos ovários de fêmeas inseminadas submetidas a ciclos diários de luminosidade e escuridão. A oscilação de *period*, contudo, não é circadiana, pois não persiste em livre-curso.
- A inseminação reduz a expressão apenas de *vrille* e *PAR-domain-protein 1ε* em ovários de fêmeas de *A. aegypti* mantidas em ciclos diários de luminosidade e escuridão e de *Clock* nos ovários de fêmeas mantidas em escuridão constante.
- Ciclos diários de luminosidade e escuridão modulam a expressão de *period*, *Clock*, *cryptochrome 1* e *cryptochrome 2* nos ovários de fêmeas virgens de *A. aegypti*.
- Ciclos diários de luminosidade e escuridão modulam a expressão de *period*, *cycle*, *vrille*, *cryptochrome 1* e *cryptochrome 2* nos ovários de fêmeas inseminadas de *A. aegypti*.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bruno RV, Lima-Camara TN de, Peixoto AA. Ritmos Biológicos em Insetos Vetores e seu Controle Molecular. In: Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. 1st ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular; 2012. p. 21.
2. Saunders DS, Steel CGH, Vafopoulou X, Lewis RD. Insect clocks. 3rd ed. Burgerhartstraat S, editor. Vol. 1. Amsterdam: Elsevier; 2002. 560 p.
3. Rund SSC, O'Donnell AJ, Gentile JE, Reece SE. Daily rhythms in mosquitoes and their consequences for malaria transmission. *Insects*. 2016;7(2):1–20.
4. Cloudsley-Thompson JL. Adaptive functions of circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1960;25:345–55.
5. Hardin PE. Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. 1st ed. Vol. 74, *Advances in Genetics*. Elsevier Inc.; 2011. 141–173 p.
6. Bhadra U, Thakkar N, Das P, Pal Bhadra M. Evolution of circadian rhythms: from bacteria to human. *Sleep Med*. 2017;35:49–61.
7. McClung CR. Circadian Rhythms in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 2001 Jun;52(1):139–62.
8. Lumsden PJ. Photoperiodism in Plants. In: *Biological Rhythms*. 2002. p. 181–91.
9. Ripperger JA, Jud C, Albrecht U. The daily rhythm of mice. *FEBS Lett*. 2011;585(10):1384–92.
10. Williams CT, Barnes BM, Loren Buck C. Persistence, entrainment, and function of circadian rhythms in polar vertebrates. *Physiology*. 2015;30(2):86–96.
11. Baker FC, Driver HS. Circadian rhythms, sleep, and the menstrual cycle. *Sleep Med*. 2007;8(6):613–22.
12. Körtner G, Geiser F. The temporal organization of daily torpor and hibernation:

- Circadian and circannual rhythms. *Chronobiol Int.* 2000;17(2):103–28.
13. Nayar JK, Sauerman DM. The effect of light regimes on the circadian rhythm of flight activity in the mosquito *Aedes taeniorhynchus*. *J Exp Biol.* 1971;54(3):745–56.
  14. Lipton GR, Sutherland DJ. Feeding rhythms in the American cockroach, *Periplaneta americana*. *J Insect Physiol.* 1970;16(9):1757–67.
  15. Jürgen Stelzer R, Stanewsky R, Chittka L. Circadian foraging rhythms of bumblebees monitored by radio-frequency identification. *J Biol Rhythms.* 2010;25(4):257–67.
  16. Farnesi LC, Barbosa CS, Araripe LO, Bruno RV. The influence of a light and dark cycle on the egg laying activity of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113(4):4–9.
  17. Ikeno T, Tanaka SI, Numata H, Goto SG. Photoperiodic diapause under the control of circadian clock genes in an insect. *BMC Biol.* 2010;8(1):1–9.
  18. Nayar JK. The pupation rhythm in *Aedes taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). II. Ontogenetic timing, rate of development, and endogenous diurnal rhythm of pupation. *Ann Entomol Soc Am.* 1967;60(5):946–71.
  19. Levine JD, Funes P, Dowse HB, Hall JC. Resetting the Circadian clock by social experience in *Drosophila melanogaster*. *Science (80- )*. 2002;298(5600):2010–2.
  20. Krupp JJ, Kent C, Billeter JC, Azanchi R, So AKC, Schonfeld JA, et al. Social Experience Modifies Pheromone Expression and Mating Behavior in Male *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol.* 2008;18(18):1373–83.
  21. Moore D. Honey bee circadian clocks : behavioral control from individual workers to whole-colony rhythms. *J Insect Physiol.* 2001;47(8):843–57.
  22. Nippe OM, Wade AR, Elliott CJH, Chawla S. Circadian Rhythms in Visual Responsiveness in the Behaviorally Arrhythmic *Drosophila* Clock Mutant *ClkJrk*. *J Biol Rhythms.* 2017;32(6):583–92.



23. Krishnan B, Dryer SE, Hardin PE. Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature*. 1999;400(6742):375–8.
24. Castrovillo PJ, Cardé RT. Environmental regulation of female calling and male pheromone response periodicities in the codling moth (*Laspeyresia pomonella*). *J Insect Physiol*. 1979;25(8):659–67.
25. Araripe LO, Bezerra JRA, Rivas GBDS, Bruno RV. Locomotor activity in males of *Aedes aegypti* can shift in response to females' presence. *Parasites and Vectors*. 2018;11(1):1–12.
26. Lima-Camara TN, Lima JBP, Bruno RV, Peixoto AA. Effects of insemination and blood-feeding on locomotor activity of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females under laboratory conditions. *Parasites and Vectors*. 2014;7(1):1–8.
27. Bloch G, Sullivan JP, Robinson GE. Juvenile hormone and circadian locomotor activity in the honey bee *Apis mellifera*. *J Insect Physiol*. 2002;48(12):1123–31.
28. Harker J. The Effect of Perturbations in the Environmental Cycle of the Diurnal Rhythm of Activity of *Periplaneta Americana* L. *J Exp Biol*. 1960;37(1):154–63.
29. Keil S, Gu H, Dorn S. Diel patterns of locomotor activity in *Cydia pomonella*: Age and sex related differences and effects of insect hormone mimics. *Physiol Entomol*. 2001;26(4):306–14.
30. Tsai CW, Lee HJ. Circadian locomotor rhythm masked by the female reproduction cycle in cockroaches. *Physiol Entomol*. 2000;25(1):63–73.
31. Page TL, Larimer JL. Entrainment of the circadian locomotor activity rhythm in crayfish. *J Comp Physiol*. 1972;78(2):107–20.
32. Helfrich-Förster C, Yoshii T, Wülbeck C, Grieshaber E, Rieger D, Bachleitner W, et al. The lateral and dorsal neurons of *Drosophila melanogaster*: New insights about their morphology and function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2007;72:517–25.
33. Ito C, Tomioka K. Heterogeneity of the peripheral circadian systems in

- Drosophila melanogaster*: A review. *Front Physiol.* 2016;7(JAN):1–7.
34. Selcho M, Millán C, Palacios-Muñoz A, Ruf F, Ubillo L, Chen J, et al. Central and peripheral clocks are coupled by a neuropeptide pathway in *Drosophila*. *Nat Commun.* 2017;8(May):1–13.
  35. Erion R, King AN, Wu G, Hogenesch JB, Sehgal A. Neural clocks and neuropeptide F/Y regulate circadian gene expression in a peripheral metabolic tissue. *Elife.* 2016;5(APRIL2016):1–21.
  36. Krupp JJ, Billeter JC, Wong A, Choi C, Nitabach MN, Levine JD. Pigment-Dispersing Factor Modulates Pheromone Production in Clock Cells that Influence Mating in *Drosophila*. *Neuron* [Internet]. 2013;79(1):54–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.019>
  37. Sandrelli F, Costa R, Kyriacou CP, Rosato E. Comparative analysis of circadian clock genes in insects. *Insect Mol Biol.* 2008;17(5):447–63.
  38. Gentile C, Rivas GBS, Meireles-Filho ACA, Lima JBP, Peixoto AA. Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: *Cry2* is different. *J Biol Rhythms.* 2009;24(6):444–51.
  39. Gesto JSM, Rivas GBDS, Pavan MG, Meireles-Filho ACA, Amoretty PR De, Souza NA De, et al. Clocks do not tick in unison: Isolation of Clock and vrille shed new light on the clockwork model of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2015;8(1):1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1117-6>
  40. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(9):2112–6.
  41. Yuan Q, Metterville D, Briscoe AD, Reppert SM. Insect cryptochromes: Gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *Mol Biol Evol.* 2007;24(4):948–55.
  42. Kamae Y, Uryu O, Miki T, Tomioka K. The nuclear receptor genes HR3 and E75 are required for the circadian rhythm in a primitive insect. *PLoS One.* 2014;9(12):1–16.

43. Tomioka K, Matsumoto A. Circadian molecular clockworks in non-model insects. *Curr Opin Insect Sci* [Internet]. 2015;7:58–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2014.12.006>
44. Preitner N, Damiola F, Luis-Lopez-Molina, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, et al. The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*. 2002. p. 251–60.
45. Partch CL, Green CB, Takahashi JS. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2014;24(2):90–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.002>
46. Kumar S, Chen D, Jang C, Nall A, Zheng X, Sehgal A. An ecdysone-responsive nuclear receptor regulates circadian rhythms in *Drosophila*. *Nat Commun*. 2014;5(May):1–12.
47. Hamblen-Coyle M, Konopka RJ, Zwiebel LJ, Colot H V., Dowse HB, Rosbash M, et al. A new mutation at the period locus of *Drosophila melanogaster* with some novel effects on circadian rhythms. *J Neurogenet*. 1989;5(4):229–56.
48. Hardin PE, Hall JC, Rosbash M. Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*. 1990;343(6258):536–40.
49. Zeng H, Hardin PE, Rosbash M. Constitutive overexpression of the *Drosophila* period protein inhibits period mRNA cycling. *EMBO J*. 1994;13(15):3590–8.
50. Bargiello TA, Jackson FR, Young MW. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature*. 1984;312(5996):752–4.
51. WA Z, DA W, P R, RJ K, CP K, M R, et al. P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell* [Internet]. 1984;39(2 Pt 1):369–76. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med2&AN=6094014>
52. Bargiello TA, Young MW. Molecular genetics of a biological clock in *Drosophila*.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1984;81(7 I):2142–6.

53. Reddy P, Zehring WA, Wheeler DA, Pirrotta V, Hadfield C, Hall JC, et al. Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell*. 1984;38(3):701–10.
54. Jackson FR, Bargiello TA, Yun SH, Young MW. Product of per locus of *Drosophila* shares homology with proteoglycans. *Nature*. 1986;320(6058):185–8.
55. Reddy P, Jacquier AC, Abovich N, Petersen G, Rosbash M. The period clock locus of *D. melanogaster* codes for a proteoglycan. *Cell*. 1986;46(1):53–61.
56. Huang ZJ, Edery I, Rosbash M. PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature*. 1993;364(6434):259–62.
57. Sawyer LA, Hennessy JM, Peixoto AA, Rosato E, Parkinson H, Costa R, et al. Natural variation in a *Drosophila* clock gene and temperature compensation. *Science* (80- ). 1997;278(5346):2117–20.
58. Sehgal A, Price JL, Man B, Young MW. Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science* (80- ). 1994;263(5153):1603–6.
59. Vosshall LB, Price JL, Sehgal A, Saez L, Young MW. Block in nuclear localization of period protein by a second clock mutation, timeless. *Science* (80- ). 1994;263(5153):1606–9.
60. Price JL, Dembinska ME, Young MW, Rosbash M. Suppression of PERIOD protein abundance and circadian cycling by the *Drosophila* clock mutation timeless. *EMBO J*. 1995;14(16):4044–9.
61. Saez L, Young MW. Regulation of nuclear entry of the *Drosophila* clock proteins period and timeless. *Neuron*. 1996;17(5):911–20.
62. Myers MP, Wager-Smith K, Wesley CS, Young MW, Sehgal A. Positional cloning

- and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, *timeless*. *Science* (80- ). 1995;270(5237):805–8.
63. Gekakis N, Saez L, Myers MP, Sehgal A, Young MW, Weitz CJ. Isolation of *timeless* by PER Protein Interaction: Defective Interaction Between *timeless* Protein and Long-Period Mutant PERL. *Science* (80- ). 1995;270(November):811–5.
  64. Myers MP, Wager-Smith K, Rothenfluh-Hilfiker A, Young MW. Light-Induced Degradation of TIMELESS and Entrainment of the *Drosophila* Circadian Clock. *Science* (80- ) [Internet]. 1996 Mar 22;271(5256):1736 LP – 1740. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/271/5256/1736.abstract>
  65. Lee C, Parikh V, Itsukaichi T, Bae K, Edery I. Resetting the *drosophila* clock by photic regulation of PER and a PER-TIM complex. *Science* (80- ). 1996;271(5256):1740–4.
  66. Ceriani MF, Darlington TK, Staknis D, Más P, Petti AA, Weitz CJ, et al. Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science* (80- ). 1999;285(5427):553–6.
  67. Naidoo N, Song W, Hunter-Ensor M, Sehgal A. A role for the proteasome in the light response of the *timeless* clock protein. *Science* (80- ). 1999;285(5434):1737–41.
  68. Dushay MS, Konopka RJ, Orr D, Greenacre ML, Kyriacou CP, Rosbash M, et al. Phenotypic and genetic analysis of *Clock*, a new circadian rhythm mutant in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* [Internet]. 1990 Jul 1;125(3):557 LP – 578. Available from: <http://www.genetics.org/content/125/3/557.abstract>
  69. Allada R, White NE, So WV, Hall JC, Rosbash M. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian clock disrupts circadian rhythms and transcription of *period* and *timeless*. *Cell*. 1998;93(5):791–804.
  70. Rutila JE, Suri V, Le M, So WV, Rosbash M, Hall JC. *Cycle* is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* *period* and *timeless*. *Cell*. 1998;93(5):805–14.

71. Chahad-Ehlers S, Gentile C, Lima JBP, Peixoto AA, Bruno RV. Analysis of cycle Gene Expression in *Aedes aegypti* Brains by In Situ Hybridization. *PLoS One*. 2013;8(1):1–6.
72. Price JL, Blau J, Rothenfluh A, Abodeely M, Kloss B, Young MW. double-time Is a Novel *Drosophila* Clock Gene that Regulates PERIOD Protein Accumulation. *Cell* [Internet]. 1998;94(1):83–95. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400812246>
73. Grima B, Lamouroux A, Chélot E, Papin C, Limbourg-Bouchon B, Rouyer F. The F-box protein slimb controls the levels of clock proteins period and timeless. *Nature*. 2002;420(6912):178–82.
74. Martinek S, Inonog S, Manoukian AS, Young MW. A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*. 2001;105(6):769–79.
75. Blau J. A new role for an old kinase: CK2 and the circadian clock. *Nat Neurosci*. 2003;6(3):208–10.
76. Szabó Á, Papin C, Zorn D, Ponien P, Weber F, Raabe T, et al. The CK2 Kinase Stabilizes CLOCK and Represses Its Activity in the *Drosophila* Circadian Oscillator. *PLoS Biol*. 2013;11(8):1–16.
77. Glossop NRJ, Lyons LC, Hardin PE. Interlocked feedback loops within the *Drosophila* circadian oscillator. *Science* (80- ). 1999;286(5440):766–8.
78. Glossop NRJ, Houl JH, Zheng H, Ng FS, Dudek SM, Hardin PE. vrille feeds back to control circadian transcription of Clock in the *Drosophila* circadian oscillator. *Neuron*. 2003;37(2):249–61.
79. George H, Terracol R. The vrille gene of *drosophila* is a maternal enhancer of decapentaplegic and encodes a new member of the bZIP family of transcription factors. *Genetics*. 1997;146(4):1345–63.
80. Cyran SA, Buchsbaum AM, Reddy KL, Lin M, Glossop NRJ, Hardin PE, et al. vrille , Pdp1 , and dClock Form a Second Feedback Loop in the *Drosophila* Circadian Clock. *Cell*. 2003;112(3):329–41.

81. Kadener S, Stoleru D, McDonald M, Nawathean P, Rosbash M. Clockwork Orange is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. *Genes Dev.* 2007;21(13):1675–86.
82. Tomiyama Y, Shinohara T, Matsuka M, Bando T, Mito T, Tomioka K. The role of clockwork orange in the circadian clock of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Zool Lett.* 2020;6(1):1–15.
83. Richier B, Michard-Vanhée C, Lamouroux A, Papin C, Rouyer F. The clockwork orange *Drosophila* protein functions as both an activator and a repressor of clock gene expression. *J Biol Rhythms.* 2008;23(2):103–16.
84. Zhu H, Yuan Q, Briscoe AD, Froy O, Casselman A, Reppert SM. The two CRYs of the butterfly. *Curr Biol.* 2006;16(7):730.
85. Zhu H, Sauman I, Yuan Q, Casselman A, Emery-Le M, Emery P, et al. Cryptochromes define a novel circadian clock mechanism in monarch butterflies that may underlie sun compass navigation. *PLoS Biol.* 2008;6(1):0138–55.
86. Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, et al. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* (80- ). 2000;288(5468):1013–9.
87. Collins B, Mazzoni EO, Stanewsky R, Blau J. *Drosophila* CRYPTOCHROME is a circadian transcriptional repressor. *Curr Biol.* 2006;16(5):441–9.
88. Schumann I, Kenny N, Hui J, Hering L, Mayer G. Halloween genes in panarthropods and the evolution of the early moulting pathway in Ecdysozoa. *R Soc Open Sci.* 2018;5(9):1–15.
89. Chan SM. Cloning of a shrimp (*Metapenaeus ensis*) cDNA encoding a nuclear receptor superfamily member: An insect homologue of E75 gene. *FEBS Lett.* 1998;436(3):395–400.
90. Pierceall WE, Li C, Biran A, Miura K, Raikhel AS, Segraves WA. E75 expression in mosquito ovary and fat body suggests reiterative use of ecdysone-regulated hierarchies in development and reproduction. *Mol Cell Endocrinol.* 1999;150(1–2):73–89.

91. Guo WC, Liu XP, Fu KY, Shi JF, Lü FG, Li GQ. Nuclear receptor ecdysone-induced protein 75 is required for larval-pupal metamorphosis in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say). Vol. 25, *Insect Molecular Biology*. 2016. p. 44–57.
92. Jaumouillé E, Machado Almeida P, Stähli P, Koch R, Nagoshi E. Transcriptional regulation via nuclear receptor crosstalk required for the drosophila circadian clock. *Curr Biol*. 2015;25(11):1502–8.
93. Bebas P, Goodall CP, Majewska M, Neumann A, Giebultowicz JM, Chappell PE. Circadian clock and output genes are rhythmically expressed in extratesticular ducts and accessory organs of mice. *FASEB J*. 2009;23(2):523–33.
94. Fahrenkrug J, Georg B, Hannibal J, Hindersson P, Gräs S. Diurnal rhythmicity of the clock genes *Per1* and *Per2* in the rat ovary. *Endocrinology*. 2006;147(8):3769–76.
95. Brzezinski A, Saada A, Miller H, Brzezinski-Sinai N, Ben-Meir A. Is the aging human ovary still ticking?: Expression of clock-genes in luteinized granulosa cells of young and older women. *J Ovarian Res*. 2018;11(1):9–12.
96. Nakamura TJ, Sellix MT, Kudo T, Nakao N, Yoshimura T, Ebihara S, et al. Influence of the estrous cycle on clock gene expression in reproductive tissues: Effects of fluctuating ovarian steroid hormone levels. *Steroids*. 2010;75(3):203–12.
97. Sellix MT. Circadian clock function in the mammalian ovary. *J Biol Rhythms* [Internet]. 2015;30(1):7–19. Available from: <https://doi.org/10.1177/0748730414554222>
98. Beaver LM, Gvakharia BO, Vollintine TS, Hege DM, Stanewsky R, Giebultowicz JM. Loss of circadian clock function decreases reproductive fitness in males of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(4):2134–9.
99. Beaver LM, Rush BL, Gvakharia BO, Giebultowicz JM. Noncircadian Regulation and Function of Clock Genes *period* and *timeless* in Oogenesis of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms*. 2003;18(6):463–72.



100. Rush BL, Murad A, Emery P, Giebultowicz JM. Ectopic Cryptochrome renders Tim light sensitive in the *Drosophila* Ovary. *J Biol Rhythms*. 2006;21(4):272–8.
101. Kotwica J, Larson MK, Bebas P, Giebultowicz JM. Developmental profiles of PERIOD and DOUBLETIME in *Drosophila melanogaster* ovary. *J Insect Physiol*. 2009;55(5):419–25.
102. Tobback J, Boerjan B, Vandersmissen HP, Huybrechts R. The circadian clock genes affect reproductive capacity in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem Mol Biol* [Internet]. 2011;41(5):313–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.01.008>
103. Chouin-Carneiro T, dos Santos FB. Transmission of Major Arboviruses in Brazil: The Role of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Vectors. In: SHIELDS VD, editor. *Biological Control of Pest and Vector Insects*. 1st ed. BoD–Books on Demand; 2017. p. 231–55.
104. Alavi Y, Arai M, Mendoza J, Tufet-Bayona M, Sinha R, Fowler K, et al. The dynamics of interactions between Plasmodium and the mosquito: A study of the infectivity of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum*, and their transmission by *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Int J Parasitol*. 2003;33(9):933–43.
105. Serrão ML, Labarthe N, Lourenço-de-Oliveira R. Vectorial competence of *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) Rio de Janeiro strain, to *Dirofilaria immitis* (Leidy 1856). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(5):593–8.
106. Powell JR, Tabachnick WJ. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(October):11–7.
107. Yasuno M, Tonn RJ. A study of biting habits of *Aedes aegypti* in Bangkok, Thailand. *Bull World Health Organ*. 1970;43(2):319–25.
108. McClelland GAH. Observations on the Mosquito, *Aëdes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.), in East Africa. II.—The Biting Cycle in a Domestic Population on the Kenya Coast. *Bull Entomol Res*. 1960;50(4):687–96.
109. McClelland GAH. Observations on the Mosquito, *Aëdes* (*Stegomyia*) *aegypti*

- (L.), in East Africa. I.—The Biting Cycle in an Outdoor Population at Entebbe, Uganda. *Bull Entomol Res.* 1959;50(2):227–35.
110. Ajayi OM, Eilerts DF, Bailey ST, Vinauger C, Benoit JB. Do Mosquitoes Sleep? *Trends Parasitol* [Internet]. 2020;36(11):888–97. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.08.004>
  111. Cabrera M, Jaffe K. An aggregation pheromone modulates lekking behavior in the vector mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Am Mosq Control Assoc.* 2007;23(1):1–10.
  112. Cator LJ, Arthur BJ, Harrington LC, Hoy RR. Harmonic convergence in the love songs of the dengue vector mosquito. *Science* (80- ). 2009;323(5917):1077–9.
  113. Degner EC, Harrington LC. Polyandry depends on postmating time interval in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;94(4):780–5.
  114. Hausermann W, Nijhout HF. Permanent loss of male fecundity following sperm depletion in *Aedes aegypti* (L.). *J Med Entomol.* 1975;11(6):707–15.
  115. Gonçalves RLS, Machado ACL, Paiva-Silva GO, Sorgine MHF, Momoli MM, Oliveira JHM, et al. Blood-feeding induces reversible functional changes in flight muscle mitochondria of *aedes aegypti* mosquito. *PLoS One.* 2009;4(11).
  116. Pinheiro VCS, Tadei WP. Frequency, diversity, and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the City of Manaus, Amazonas, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2002;44(5):245–50.
  117. Colton YM, Chadee DD, Severson DW. Natural skip oviposition of the mosquito *Aedes aegypti* indicated by codominant genetic markers. *Med Vet Entomol.* 2003;17(2):195–204.
  118. Haddow AJ, Gillett JD, Corbet PS. Laboratory Observations on Pupation and Emergence in the Mosquito *Aedes* (*Stegomyia*) *Aegypti* (Linnaeus). *Ann Trop Med Parasitol* [Internet]. 1959 Jun 1;53(2):123–31. Available from: <https://doi.org/10.1080/00034983.1959.11685909>
  119. Gentile C, Meireles-Filho ACA, Britto C, Lima JBP, Valle D, Peixoto AA. Cloning

- and daily expression of the timeless gene in *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *Insect Biochem Mol Biol*. 2006;36(11):878–84.
120. Meireles-Filho ACA, Amoretty PR, Souza NA, Kyriacou CP, Peixoto AA. Rhythmic expression of the cycle gene in a hematophagous insect vector. *BMC Mol Biol*. 2006;7:1–10.
  121. Rivas GBS, Teles-de-Freitas R, Pavan MG, Lima JBP, Peixoto AA, Bruno RV. Effects of Light and Temperature on Daily Activity and Clock Gene Expression in Two Mosquito Disease Vectors. *J Biol Rhythms*. 2018;33(3):272–88.
  122. Teles-De-Freitas R, Rivas GB, Peixoto AA, Bruno RV. The summer is coming: nocte and timeless genes are influenced by temperature cycles and may affect *Aedes aegypti* locomotor activity. *Front Physiol*. 2020;11:1–14.
  123. Teles-de-Freitas R, Barboza L, Bruno R V. Off with their heads: analysis of the circadian clock genes expression in the body of *Aedes aegypti*. *Chronobiol Int* [Internet]. 2021;38(7):994–1001. Available from: <https://doi.org/10.1080/07420528.2021.1903030>
  124. Craig GB. Mosquitoes: Female monogamy induced by male accessory gland substance. *Science* (80- ). 1967;156(3781):1499–501.
  125. Clifton ME, Correa S, Rivera-Perez C, Nouzova M, Noriega FG. Male *Aedes aegypti* mosquitoes use JH III transferred during copulation to influence previtellogenic ovary physiology and affect the reproductive output of female mosquitoes. *J Insect Physiol* [Internet]. 2014;64(1):40–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.03.006>
  126. Villarreal SM, Pitcher S, Helinski MEH, Johnson L, Wolfner MF, Harrington LC. Male contributions during mating increase female survival in the disease vector mosquito *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol* [Internet]. 2018;108(May):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.05.001>
  127. Fuchs MS, Craig GB, Despommier DD. The protein nature of the substance inducing female monogamy in *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol*. 1969;15(4):701–9.

128. Sirot LK, Hardstone MC, Helinski MEH, Ribeiro JMC, Kimura M, Deewatthanawong P, et al. Towards a semen proteome of the dengue vector mosquito: Protein identification and potential functions. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(3):1–11.
129. Gentile C, Rivas GB uen. da S, Lima JBP, Bruno RV ieir., Peixoto AA frani. Circadian clock of *Aedes aegypti*: effects of blood-feeding, insemination and RNA interference. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108:80–7.
130. Alfonso-Parra C, Ahmed-Braimah YH, Degner EC, Avila FW, Villarreal SM, Pleiss JA, et al. Mating-Induced Transcriptome Changes in the Reproductive Tract of Female *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016;10(2):1–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004451>
131. Alonso DP, Campos M, Troca H, Kunii R, Tripet F, Ribolla PEM. Gene expression profile of *Aedes aegypti* females in courtship and mating. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–9.
132. Camargo C, Ahmed-Braimah YH, Amaro IA, Harrington LC, Wolfner MF, Avila FW. Mating and blood-feeding induce transcriptome changes in the spermathecae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71904-z>
133. Valzania L, Mattee MT, Strand MR, Brown MR. Blood feeding activates the vitellogenic stage of oogenesis in the mosquito *Aedes aegypti* through inhibition of glycogen synthase kinase 3 by the insulin and TOR pathways. *Dev Biol* [Internet]. 2019;454(1):85–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.05.011>
134. Degner EC, Harrington LC. A mosquito sperm's journey from male ejaculate to egg: Mechanisms, molecules, and methods for exploration. *Mol Reprod Dev*. 2016;83(10):897–911.
135. Carvalho DO, Nimmo D, Naish N, McKemey AR, Gray P, Wilke ABB, et al. Mass production of genetically modified *Aedes aegypti* for field releases in Brazil. *J Vis Exp*. 2014;(83).

136. Gentile C, Lima JBP, Peixoto AA. Isolation of a fragment homologous to the rp49 constitutive gene of *Drosophila* in the Neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(6):545–7.
137. Fonseca AB de A, da Costa SM, Mantuano-Barradas M, Alves AM de B, Bruno RV. Characterization of the circadian expression profile of clock genes in Aag2 cell line infected and uninfected by Dengue 2 virus (DENV2). *Sleep Sci*. 2020;13(Special issue):36–40.
138. Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research* 3rd ed. Freeman. 3rd ed. New York: Freeman; 1995.
139. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* [Internet]. 2001;25(4):402–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202301912629>
140. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101–8.
141. Hut RA. *CircWave* [Internet]. Groningen, Netherlands; 2007. Available from: <http://www.rug.nl/fwn/onderzoek/programmas/biologie/chronobiologie/downloads/index>
142. Narasaki-Funo Y, Tomiyama Y, Nose M, Bando T, Tomioka K. Functional analysis of Pdp1 and vrille in the circadian system of a cricket. *J Insect Physiol* [Internet]. 2020;127(October):104156. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104156>
143. Bertolini E, Kistenpfennig C, Menegazzi P, Keller A, Koukidou M, Helfrich-Förster C. The characterization of the circadian clock in the olive fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) reveals a *Drosophila*-like organization. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–12.
144. Liu X, Lorenz L, Yu QN, Hall JC, Rosbash M. Spatial and temporal expression of the period gene in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev*. 1988;2(2):228–38.
145. Hardin PE. Analysis of period mRNA cycling in *Drosophila* head and body tissues

- indicates that body oscillators behave differently from head oscillators. *Mol Cell Biol.* 1994;14(11):7211–8.
146. Clements AN. *The biology of mosquitoes. Volume 1: development, nutrition and reproduction.* London: Chapman & Hall; 1992.
  147. Des Marteaux L, Xi J, Mano G, Goto SG. Circadian clock outputs regulating insect photoperiodism: A potential role for glutamate transporter. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2022;589:100–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.12.014>
  148. Hamasaka Y, Rieger D, Parmentier M-L, Grau Y, Helfrich-Förster C, Nässel DR. Glutamate and its metabotropic receptor in *Drosophila* clock neuron circuits. *J Comp Neurol* [Internet]. 2007 Nov 1;505(1):32–45. Available from: <https://doi.org/10.1002/cne.21471>
  149. Castellanos A, Ramirez CE, Michalkova V, Nouzova M, Noriega FG, Fernández-Lima F. Three dimensional secondary ion mass spectrometry imaging (3D-SIMS) of: *Aedes aegypti* ovarian follicles. *J Anal At Spectrom.* 2019;34(5):874–83.
  150. Rijo-Ferreira F, Acosta-Rodriguez VA, Abel JH, Kornblum I, Bento I, Kilaru G, et al. The malaria parasite has an intrinsic clock. *Science* (80- ). 2020;368(6492):746–53.
  151. Welsh DK, Yoo S-H, Liu AC, Takahashi JS, Kay SA. Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr Biol.* 2004;14(24):2289–95.
  152. CLEMENTS AN, BOOCOOCK MR. Ovarian development in mosquitoes: stages of growth and arrest, and follicular resorption. *Physiol Entomol.* 1984;9(1):1–8.
  153. Clifton ME, Noriega FG. The fate of follicles after a blood meal is dependent on previtellogenic nutrition and juvenile hormone in *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol* [Internet]. 2012;58(7):1007–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.05.005>
  154. Houl JH, Ng F, Taylor P, Hardin PE. CLOCK expression identifies developing

- circadian oscillator neurons in the brains of *Drosophila* embryos. *BMC Neurosci.* 2008;9:1–13.
155. Rook F, Weisbeek P, Smeekens S. The light-regulated *Arabidopsis* bZIP transcription factor gene *ATB2* encodes a protein with an unusually long leucine zipper domain. *Plant Mol Biol.* 1998;37(1):171–8.
  156. Holm M, Ma LG, Qu LJ, Deng XW. Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 2002;16(10):1247–59.
  157. Giebultowicz JM. Peripheral clocks and their role in circadian timing: Insights from insects. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2001;356(1415):1791–9.
  158. Xu J, Gao B, Shi MR, Yu H, Huang LY, Chen P, et al. Copulation exerts significant effects on mRNA expression of cryptochrome genes in a moth. *J Insect Sci.* 2019;19(2):1–6.
  159. George H, Terracol R. The *vri* Gene of *Drosophila* Is a Maternal Enhancer of decapentaplegic and Encodes a New Member of the bZIP Family of Transcription Factors. *Genetics* [Internet]. 1997 Aug 1;146(4):1345–63. Available from: <https://doi.org/10.1093/genetics/146.4.1345>
  160. Kotwica J, Bebas P, Gvakharia BO, Giebultowicz JM. RNA interference of the period gene affects the rhythm of sperm release in moths. *J Biol Rhythms.* 2009;24(1):25–34.