

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

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

*RAYANE TELES DE FREITAS*

**A SINERGIA ENTRE GENÉTICA E AMBIENTE NO CONTROLE DA ATIVIDADE  
DO MOSQUITO *Aedes Aegypti***

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

**Orientadora:** Dra. Rafaela Vieira Bruno

Rio de Janeiro

2021

Teles de Freitas, Rayane.

A SINERGIA ENTRE GENÉTICA E AMBIENTE NO CONTROLE DA ATIVIDADE DO MOSQUITO *Aedes Aegypti* / Rayane Teles de Freitas. - Rio de Janeiro, 2021.

110 f.; il.

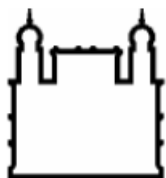
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

Orientadora: Rafaela Vieira Bruno.

Bibliografia: f. 62-78

1. *Aedes aegypti*. 2. relógio circadiano. 3. ambiente. 4. temperatura. 5. mosquitos. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

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

*RAYANE TELES DE FREITAS*

### **A SINERGIA ENTRE GENÉTICA E AMBIENTE NO CONTROLE DA ATIVIDADE DO MOSQUITO *Aedes Aegypti***

**Orientadora:** Dra. Rafaela Vieira Bruno

**Examinadores:**

Prof. Dr. Fernando Ariel Genta – Fiocruz (Presidente)

Prof. Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira – UFRJ (Membro Titular)

Prof. Dr. Horacio de la Iglesia – University of Washington - EUA (Membro Titular)

Prof. Dr. Ademir de Jesus Martins Junior – Fiocruz (Revisor / Suplente)

Profa. Dra. Gisele Akemi Oda – USP (Suplente)

16 de julho de 2021

Dedico essa tese a Alexandre Peixoto,  
Ezilete Teixeira, Fernando Soares  
de Freitas e Janaina Teles.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Foram utilizados recursos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e Howard Hughes Medical Institute (HHMI).

## Agradecimentos

O meu carinhoso agradecimento àqueles que acreditaram em uma pequena pessoa que vem crescendo nos últimos anos. Após quimioterapias, internações e passar dias sem nem mesmo poder comer, eu desenvolvi a tese mais importante da minha vida e curiosamente não há uma linha sobre ela nesse documento. Exceto essa: o relógio está correndo para todos, que o tempo dedicado ao trabalho seja um investimento para horas em melhor qualidade com aqueles que amamos.

Ao **Dr. Alexandre Peixoto**: De certa forma você sempre esteve presente como uma grande inspiração. Hoje, fecha-se um ciclo, assim como fechamos a porta do laboratório na véspera daquele carnaval tão triste. O último artigo com o seu nome, que é parte dessa tese, tem muito das ideias brilhantes do seu último debate científico na Fiocruz.

Ao **Fernando Soares**: Meu velhinho, você sempre me chamou de minha doutora; vai fazer muita falta o seu abraço nessa defesa.

À **Janaina Teles** e **Ezilete Teixeira**: Mãe e avó, duas fortalezas que me mantiveram em pé. Que me perdoem os leitores, mas aqui eu não vou poupar os clichês. Porque não devo apenas ter nascido, como se estou viva ainda é graças a essas duas. Obrigada pelas suas orações, obrigada por serem tão leas, o meu maior título é descender de vocês.

Aos **amigos e equipe de trabalho**: Achei que seria mais carinhoso não citar todos os nomes e sim três pessoas que representam esse grupo tão importante. Aqui o meu muito obrigado às revisões, dicas, colaborações e tudo que contribuiu para essa tese; em especial a **Dra. Rafaela Bruno**, a **Liliane Barbosa** e a **Lorena Bezerra**. A primeira, minha orientadora, foi fundamental tanto na orientação científica como ao apoio emocional após a quimioterapia. Liliane e Lorena, me ensinaram muito sobre como orientar e torcer para um ser humano. Meu profundo agradecimento a todos os amigos e equipe de trabalho.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar  
novas paisagens, mas em ter novos olhos”.  
(Marcel Proust)

## Índice

Agradecimentos .....	V
Lista de figuras.....	IX
Lista de tabelas .....	XI
Lista de siglas e abreviaturas .....	XII
Resumo .....	XVI
Abstract .....	XVII
<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 – Propriedades do relógio circadiano .....	1
1.2- O relógio circadiano em insetos.....	8
1.2.1- Genes do relógio circadiano.....	8
1.2.2- O relógio circadiano em diferentes tecidos.....	15
1.2.3- Sincronizadores do relógio circadiano.....	17
1.2.4- Condições naturais / seminaturais vs. Artificiais.....	22
1.2.5 - O relógio circadiano em mosquitos.....	25
<b>2 – OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
2.1 – Objetivos Gerais.....	29
2.2 – Objetivos Específicos.....	29
<b>3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
3.1 – Artigo 1.....	31
3.1 – Artigo 2.....	46



<b>4 – DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>56</b>
<b>5 – CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>6 – REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>
<b>7 – ANEXO.....</b>	<b>79</b>
7.1 – Material suplementar do Artigo 1.....	81
7.2 – Artigo 3.....	91
7.3 – Artigo 4.....	92
7.4 – Artigo 5.....	93
7.5 – Artigo 6.....	94

## Lista de Figuras

### Introdução

<b>Figura 1.1:</b> Relógio das Flores.....	2
<b>Figura 1.2:</b> Ilustração representando o experimento conduzido por de Mairan.....	3
<b>Figura 1.3:</b> Propriedades do relógio circadiano.....	5
<b>Figura 1.4:</b> Esquema diferenciando arrastamento e mascaramento.....	6
<b>Figura 1.5:</b> Diferenciando entre sincronização e mascaramento.....	7
<b>Figura 1.6:</b> Organização molecular do relógio circadiano de <i>Drosophila</i> .....	11
<b>Figura 1.7:</b> Alça de retro-alimentação de <i>Clk</i> .....	13
<b>Figura 1.8:</b> Esquema representando a distribuição dos neurônios do relógio em <i>D. melanogaster</i> .....	15
<b>Figura 1.9:</b> Ciclos de temperatura de diferentes períodos.....	19
<b>Figura 1.10:</b> Alguns possíveis ortólogos da proteína NOCTE de <i>D. melanogaster</i> ...	22
<b>Figura 1.11:</b> Atividade de <i>D. melanogaster</i> na natureza.....	25

### Artigo 1

<b>Figura 1:</b> Natural and simulated temperature cycles.....	35
<b>Figura 2:</b> Activity in light/dark cycles with simulated dawn and dusk or in constant darkness.....	35
<b>Figura 3:</b> Activity profile of <i>Ae. aegypti</i> under seminatural or rectangular TC.....	36
<b>Figura 4:</b> Activity of <i>Aedes aegypti</i> over several days in seminatural or rectangular temperature cycles.....	36

<b>Figura 5:</b> Circadian expression of clock genes in <i>Ae. aegypti</i> under seminatural TC with constant darkness.....	37
<b>Figura 6:</b> Activity in light/dark cycles with temperature cycles in natural phase or out of phase.....	38
<b>Figura 7:</b> Circadian expression of clock genes when Zeitgebers are in phase or conflicting.....	39
<b>Figura 8:</b> Relative RNA abundance of nocte in <i>Aedes aegypti</i> .....	40
<b>Figura 9:</b> Activity of <i>Ae. aegypti</i> injected with dsRNA.....	41
<b>Figura 10:</b> Circadian expression of clock genes in <i>Ae. aegypti</i> injected with dsRNA...	42

## **Artigo 2**

<b>Figura 1:</b> Expression of circadian clock genes in the body of <i>Ae. aegypti</i> in DD 25 °C.....	50
<b>Figura 2:</b> Expression of circadian clock genes in the body of <i>Ae. aegypti</i> in gradual LD 25 °C.....	51
<b>Figura 3:</b> Expression of circadian clock genes in the body of <i>Ae. aegypti</i> in DD with seminatural TC.....	52
<b>Figura 4:</b> Expression of circadian clock genes in the body of <i>Ae. aegypti</i> in gradual LD with seminatural TC.....	53

## **Conclusão**

<b>Figura 5.1:</b> Esquema simplificado dos resultados obtidos nessa tese.....	61
--	----

## Lista de Tabelas

### Artigo 2

**Tabela 1:** Conditions under which mosquitoes were entrained and collect.....49

**Tabela 2:** Statistical analysis of the circadian expression of clock genes in the body of *Ae. aegypti*.....50

## Lista de Siglas e Abreviaturas

a.C. = antes de Cristo

C-terminal = região carboxi-terminal

CK2 = proteína Caseína quinase 2

cDNA = complementar Desoxiribonucleic Acid (sequencia complementar de DNA)

*Clk* = gene *Clock*

CLK = proteína CLOCK

*cry* = gene *cryptochrome*

CRY = proteína CRYPTOCHROME

*cry2* = gene *cryptochrome 2*

CRY2 = proteína CRYPTOCHROME2

*cwo* = gene *clockwork Orange*

CWO = proteína *clockwork Orange*

*cyc* = gene *cycle*

CYC = proteína CYCLE

CT- threshold cycle

*dbt* = gene *double-time*

DBT = proteína DOUBLE-TIME

DN1 = neurônio dorsal 1

DN2 = neurônio dorsal 2

DN3 = neurônio dorsal 3

DNA = Desoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)

ds*LacZ* = RNA dupla-fita de *LacZ*

ds*nocte* = RNA dupla-fita de *nocte*

E-box = Enhancer Box

*E75* = gene *Ecdysone-induced protein 75*

E75 = proteína Ecdysone-induced protein 75

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

IBEx = Instituto de Biologia do Exército

I-LNv = neurônio lateral ventral grande

LNd = neurônio lateral dorsal

LO = lobo ótico

LPN = neurônio lateral posterior

Lux = 1 lumen / m<sup>2</sup>

mRNA = RNA mensageiro

N-terminal = região amino-terminal

*nocte* = gene *no circadian temperature entrainment*

Nocte = proteína No circadian temperature entrainment

*norpA* = gene *no receptor potential A*

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

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

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

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

*Pdp1* = gene *PAR domain protein 1*

*Pdp 1 $\epsilon$ / $\delta$*  = isoformas  $\epsilon$  e  $\delta$  do gene *PAR domain protein 1*

PDP1  $\epsilon$  / $\delta$  = isoformas  $\epsilon$  e  $\delta$  da proteína PAR domain protein 1

*per* = gene *period*

PER = proteína PERIOD

qPCR = PCR em tempo real

RNA = Ribonucleic Acid (ácido ribonucleico)

RNAi = RNA de interferência

SGG = SHAGGY

s-LNv = neurônio lateral ventral pequeno

$t$  = valor estatístico do teste *t de student*

*tim* = gene *timeless*

TIM = proteína TIMELESS

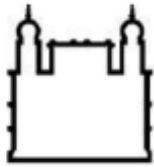
V/P-box = VRI/PDP-box

*vri* = gene *vrille*

VRI = proteína VRILLE

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





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

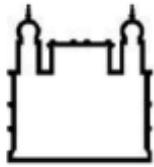
## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### A SINERGIA ENTRE GENÉTICA E AMBIENTE NO CONTROLE DA ATIVIDADE DO MOSQUITO *Aedes aegypti*

#### Resumo

Os mosquitos exibem ritmos de atividade e alimentação sanguínea, que são cruciais para a transmissão de diversos patógenos e estão sob o controle de um relógio circadiano endógeno. Estímulos externos exercem uma importante modulação neste relógio, possibilitando o ajuste das funções endógenas com o ambiente. Um dos principais indicadores ambientais capaz de sincronizar o relógio circadiano é o ciclo de temperatura diário. O *Aedes aegypti*, um dos maiores vetores de arboviroses do mundo, também é um dos mosquitos mais sensíveis aos ciclos de temperatura. Há décadas, diversos estudos associam a elevação da temperatura ambiente ao aumento da atividade desses mosquitos. Agora, nosso trabalho traz uma perspectiva global sobre a sincronização pelos ciclos de temperatura em *Aedes aegypti*. Sugerimos como funciona a percepção deste *Zeitgeber* através do funcionamento de dois genes: *nocte* e *timeless*. Mostramos como a sincronização desse indicador ambiental altera a expressão de genes do relógio circadiano na cabeça e corpo de *Aedes*. E por fim, analisamos as implicações de tal sincronização na atividade desses vetores.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Aedes aegypti*, relógio circadiano, genética, comportamento, atividade, *nocte*, *timeless*, corpo, cabeça, ciclos de temperatura, ciclos de claro/escuro.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### THE SYNERGY BETWEEN GENETICS AND ENVIRONMENT IN CONTROLLING THE ACTIVITY OF THE *Aedes aegypti* MOSQUITO

#### Abstract

Mosquitoes present locomotor activity and blood feeding rhythms, which are crucial for the transmission of many pathogens and are under the control of an endogenous circadian clock. External stimuli play an important modulation in this clock, enabling adjustment of the endogenous functions with the environment. One of the main environmental indicators able to synchronize the circadian clock are temperature cycles. *Aedes aegypti*, one of the largest vectors of arboviruses in the world, is also one of the most sensitive mosquitoes to temperature cycles. For decades, several studies have linked the rise in ambient temperature with the increase in their activity. Now, our work brings a global perspective on the synchronization by the temperature cycles in *Aedes aegypti*. We suggest how the perception of this Zeitgeber works through the functioning of two genes: *nocte* and *timeless*. We show how the synchronization of this environmental indicator alters the expression of circadian clock genes in *Aedes*' head and body. Finally, we analyze the implications of such synchronization in the activity of these vectors.

**KEY-WORDS:** *Aedes aegypti*, circadian clock, genetics, behavior, activity, *nocte*, *timeless*, body, head, temperature cycles, light cycles.

## 1- INTRODUÇÃO

Os movimentos de rotação que a Terra realiza em torno do seu próprio eixo submeteu diversos organismos a variações ambientais diárias desde o surgimento da vida no planeta. Essas pressões seletivas conduziram diferentes criaturas a evoluírem apresentando ritmos diários na sua fisiologia e comportamento. Em 1959, Franz Halberg chamou as oscilações que muitas espécies produziam com um período próximo há 24 horas em condições constantes de ritmos circadianos. O termo tem origem no latim e significa cerca (*circa*) de um dia (*diem*) (Moore-Ede *et al.* 1982; Marques & Menna-Barreto 1999).

Ainda em um contexto histórico, podemos destacar importantes contribuições. Desde a antiguidade, estudiosos como Hipócrates (460 a.C. - 377 a.C.), Aristóteles (384 a.C. - 322 a.C.) e Galeno (129 a.C. -217 a.C.) já sugeriam a importância destes ritmos. Uma das primeiras descrições com um caráter menos empírico foi de Thasos, um historiador acompanhante de Alexandre, o Grande. Thasos, em 325 a.C, observou em detalhes o movimento periódico diário das folhas de *Tamarindus indicus* (tamarindo). Não podemos deixar de citar ainda, uma das mais conhecidas contribuições para o estudo dos ritmos circadianos, o relógio de flores, descrito por Carolus Linnaeus. O pai da taxonomia moderna propôs tal relógio botânico (Figura 1.1) para marcar as horas do dia baseado no horário característico de diversas espécies de plantas abrirem e fecharem as pétalas de suas flores (Moore-Ede *et al.* 1982; Marques & Menna-Barreto 1999). Hoje sabemos que esses ritmos se devem a um relógio biológico, o relógio circadiano.

### 1.1- Propriedades do relógio circadiano

Como pode ser visto, as observações sobre os ritmos circadianos não são recentes e acompanharam os questionamentos e descobertas de grandes cientistas aos longos dos séculos. No entanto, durante muito tempo acreditava-se que os ritmos dos organismos eram dirigidos de forma majoritária pelo ambiente. Então, contrapondo a ideia majoritária, o trabalho de Jean-Jacques d'Ortous de Mairan foi fundamental para tornar evidente a existência de um relógio endógeno. Esse astrônomo francês, em 1729, realizou experimentos sobre o ritmo de *Mimosa pudica*

(“dormideira”) que abre suas folhas durante o dia e as retrai durante a noite. Quando de Mairan expôs estas plantas a condições controladas de escuro constante, pode observar que, mesmo sem a indicação luminosa, persistia o ato de abrir e fechar de folhas de forma similar (Figura 1.2) (Marques & Menna-Barreto 1999).



**Figura 1.1 – Relógio das Flores.** Linnaeus propôs que o tempo poderia ser medido a partir do movimento das plantas, observando o ritmo de certas espécies ao abrirem e fecharem suas flores. Seus estudos foram publicados na revista “*Philosophia Botanica*” e compila as características de abertura de plantas em momentos específicos do dia. Linnaeus propôs que essas plantas fossem organizadas em uma sequência pelo horário de abertura de suas flores ao longo do dia, para a composição de um relógio floral (Modificado de Moore-Ede *et al* 1982).

Em 1832, novamente a planta *Mimosa pudica* foi utilizada em outro importante estudo, dessa vez por Augustin de Candolle. O botânico suíço observou que o ritmo do movimento foliar da dormideira realmente persistia mesmo em escuro constante, mas apresentava avanços diários, evidenciando uma periodicidade de 22 a 23 horas (Figura 1.2). Ele denominou essa característica de “período em livre-curso”, que mais tarde daria inspiração para o nome “circadiano”. Em síntese, o período em livre curso

é aquele próximo, porém não exatamente igual a 24 horas, que é observado nos ritmos dos mais variados espécimes livres de indicadores ambientais. A persistência da ritmicidade em “livre-curso” é atualmente conhecida como a primeira propriedade do relógio circadiano (Figura 1.3-A) (Moore-Ede *et al.* 1982; Marques & Menna-Barreto 1999; Johnson *et al.* 2003).



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

Embora existam variações individuais, o período em livre-curso é específico e ele não se altera em diferentes temperaturas constantes, dentro de uma faixa tolerável para cada espécie. Essa característica se deve a mais uma propriedade do relógio circadiano: a compensação térmica. Pittendrigh, na década de 1950, foi o primeiro a estudar esse fenômeno. Ele observava os ritmos de emergência de *Drosophila pseudoobscura*, quando constatou que essas moscas continuavam eclodindo pela manhã mesmo se a temperatura fosse diminuída em 10°C em escuro constante (Pittendrigh 1954). Tal característica se torna ainda mais interessante se lembrarmos que normalmente variações de temperatura influenciam a cinética de reações

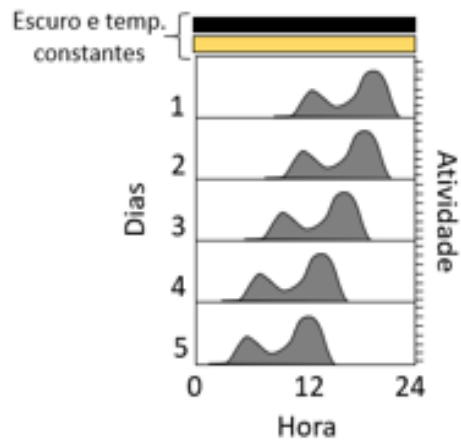
químicas e de processos fisiológicos. No entanto, graças à propriedade de compensação térmica, o período de livre-curso permanece uniforme em escuro constante, sob diferentes temperaturas também constantes, dentro da faixa tolerável para a fisiologia de cada organismo (Figura 1.3-B) (Moore-Ede *et al.* 1982; Johnson *et al.* 2003).

Aqui já se torna mais fácil compreendermos a propriedade do relógio circadiano que mais citaremos ao longo dessa tese: a sincronização. Como mencionamos, os organismos possuem um relógio endógeno, capaz de ditar ritmos diários em condições constantes. Assim, os atrasos ou avanços de fase em cada ciclo (dependendo do período da espécie) levariam o relógio endógeno a sair de fase em relação ao dia solar. Mas isso não acontece porque o período de livre-curso é “acertado” por fatores ambientais que indicam a passagem de tempo (Figura 1.3-C) (Moore-Ede *et al.* 1982; Pittendrigh 1993; Marques & Menna-Barreto 1999; Johnson *et al.* 2003; Foster & Kreitzman 2005). Os sinais ambientais capazes de sincronizar o relógio são os chamados *Zeitgebers* (palavra de origem germânica que significa “indicador ou doador de tempo”), sendo os ciclos de claro/escuro e os ciclos de temperatura os mais bem compreendidos em sua capacidade de sincronização do relógio de diversas espécies (Moore-Ede *et al.* 1982; Marques & Menna-Barreto 1999).

Por fim, devemos diferenciar sincronização de mascaramento. Havia um questionamento na comunidade científica até o século XVIII sobre a influência direta do ambiente para ditar os ritmos dos organismos ou a existência de um relógio endógeno, hoje sabe-se que ocorrem as duas coisas. Como mencionamos, os indicadores ambientais podem influenciar os ritmos dos organismos indiretamente ao modularem o relógio circadiano (genes) e esse, por conseguinte, interferir nos ritmos; como o comportamento de uma espécie, por exemplo (fenótipo). Esse fenômeno é o que chamamos de sincronização. Contudo, fazemos uma ressalva também para a existência do mascaramento; ou seja, a influência direta dos indicadores ambientais sobre os ritmos das espécies sem interferir no relógio circadiano (Pittendrigh & Daan 1976) (Figura 1.4).

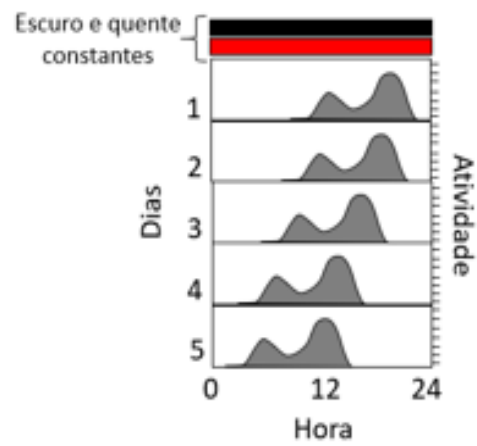
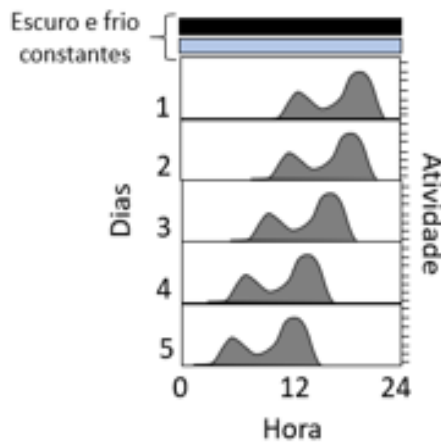
A)

Persistência em livre-curso



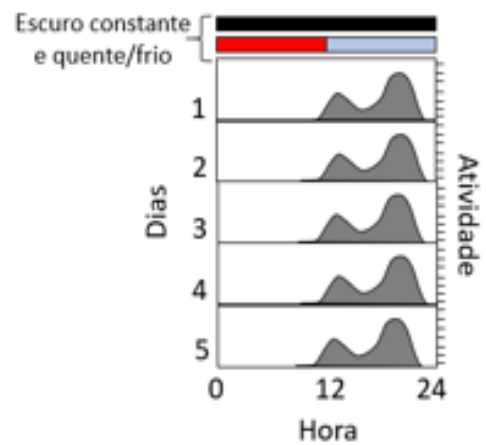
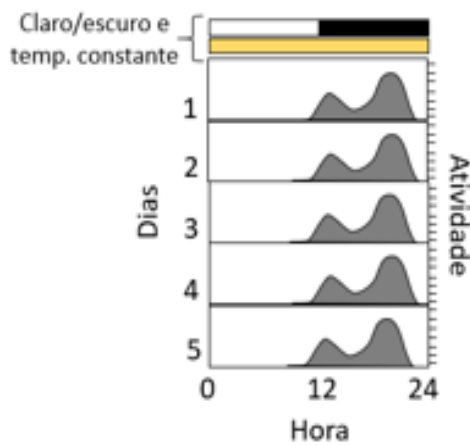
B)

Compensação térmica

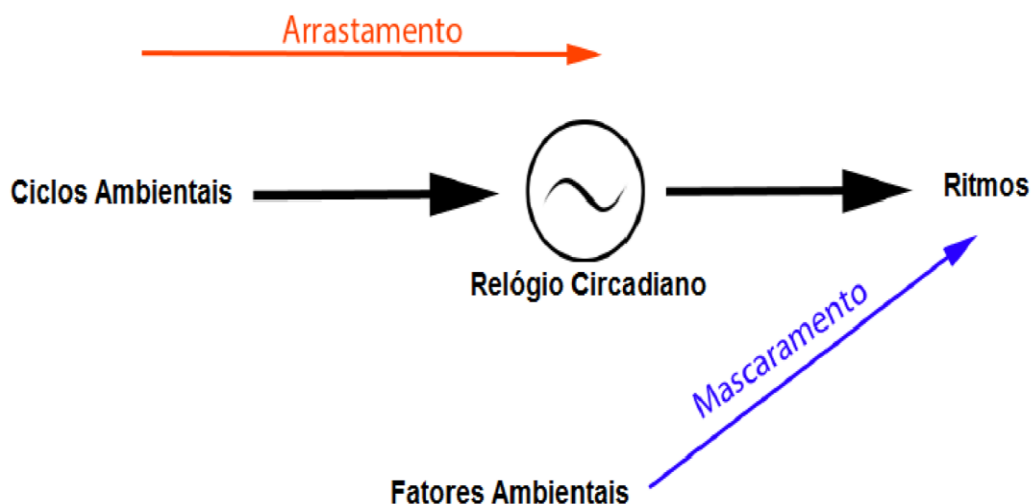


C)

Sincronização



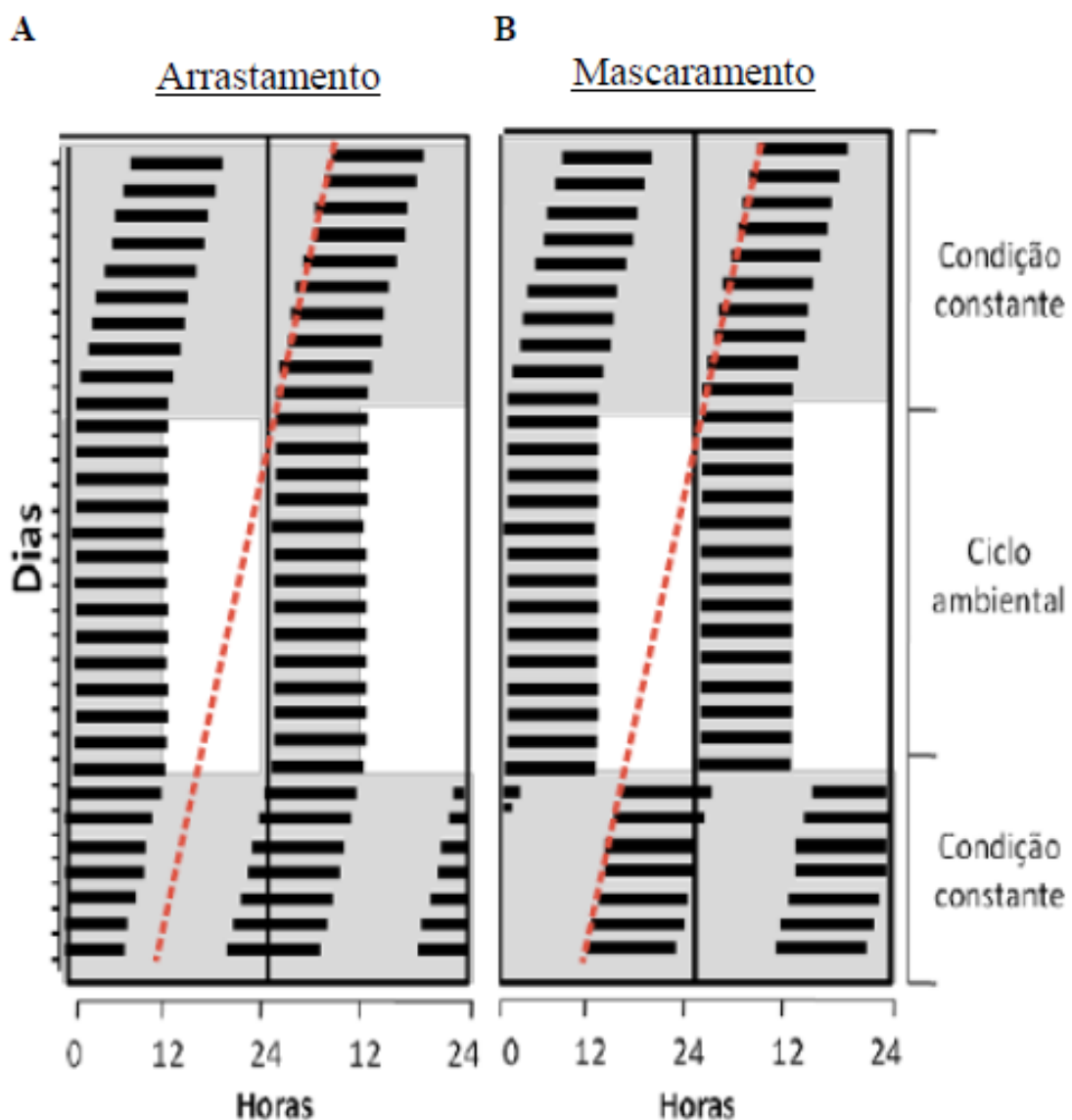
**Figura 1.3 – Propriedades do relógio circadiano.** O Esquema representa um padrão comportamental, neste caso a atividade locomotora de uma espécie hipotética, demonstrando as diferentes propriedades do relógio circadiano. Em cada imagem observa-se o gráfico da atividade (em preto), durante cinco dias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



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



Alguns testes podem ser feitos em condições totalmente controladas, para saber se um fator ambiental está provocando uma sincronização ou mascaramento. Um protocolo clássico consiste em primeiramente deixar o organismo em condições constantes durante alguns dias para que o ritmo possa exercer o seu livre-curso (figura 1.5). Em seguida submete-se esse organismo ao ciclo ambiental que se deseja testar, enquanto as demais variáveis permanecem constantes. Se o ciclo ambiental conseguir promover uma sincronização ou um mascaramento, o ritmo passará a se expressar com o mesmo período do ciclo. Para diferenciar esses dois efeitos, devemos novamente submeter o organismo a condições constantes. Caso o ritmo inicie o seu livre-curso a partir da fase em que estava na presença do ciclo ambiental, consideramos que o ciclo consegue promover uma sincronização. Por outro lado, se a fase for aquela que se esperaria caso o organismo nunca tivesse sido exposto aquele ciclo, é sinal que o efeito corresponde a um mascaramento (figura 1.5) (Aschoff 1960).



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

## 1.2- O relógio circadiano em insetos

### 1.2.1- Genes do relógio circadiano

Atualmente, sabemos que a existência de um relógio circadiano endógeno pode ser explicada pela presença de um conjunto de genes, que variam em cada espécie, embora apresentem uma funcionalidade geral bem semelhante. Em comum, os relógios são formados por alças de retroalimentação que se regulam com um período próximo a 24 horas. Nosso foco, nesta tese, é o mosquito *Aedes aegypti*. Porém, como temos uma compreensão bastante incipiente sobre o relógio dessa espécie, focaremos inicialmente em descrever principalmente o relógio circadiano em insetos como o organismo modelo, *Drosophila melanogaster*, para em seguida compararmos com o que conhecemos em mosquitos.

Trazendo um contexto histórico, a partir da década de 1970, os estudos sobre ritmos circadianos tomaram um rumo novo. Ron Konopka e Seymour Benzer, no Instituto de Tecnologia da Califórnia, submetem drosófilas a mutagênicos químicos e isolaram três linhagens que apresentavam padrões anormais nos ritmos de emergência de pupas em adultos e também nos ritmos de atividade e repouso (Saunders, 2002). Isto é, sabia-se que as linhagens selvagens de *Drosophila*, em livre curso, apresentavam um período de atividade locomotora próximo a 24 horas quando colocadas em condições constantes (Konopka & Benzer 1971). Entretanto, as linhagens mutantes isoladas, sob as mesmas condições, variavam o seu período e

ritmicidade, tendo uma delas período em livre-curso de 19 horas, outra de 29 horas e a terceira possuía indivíduos arrítmicos. Curiosamente, tais alterações no padrão comportamental eram provenientes de mutações no mesmo *locus*, o qual Konopka e Benzer denominaram *period* (*per*), sendo assim identificado o primeiro gene relacionado ao controle de um comportamento em organismos vivos. Os mutantes para as linhagens arrítmicas e para as linhagens com menor ou maior período receberam os nomes de *per*<sup>01</sup>, *per*<sup>short</sup> (*per*<sup>s</sup>) ou *per*<sup>long</sup> (*per*<sup>l</sup>), respectivamente (Konopka & Benzer 1971; Saunders 2002).

Dez anos depois da descoberta, a equipe de Jeffrey Hall, Michael Rosbash e Michael Young conseguiram clonar *per* e identificar as mutações das linhagens de Konopka e Benzer (Konopka & Benzer 1971; Bargiello & Young 1984; Reddy *et al.* 1984; Bargiello *et al.* 1987; Yu *et al.* 1987). Esse trabalho, renderia o prêmio Nobel de Medicina para o trio de pesquisadores em 2017. Em 1994, o grupo de Young também reportou a descoberta de um mutante para outro *locus*, denominado *timeless* (*tim*), para o qual fenótipos mutantes não apenas apresentavam arritmicidade em seu comportamento, como também pareciam alterar a oscilação circadiana da expressão do RNA de *per*. Em seguida, a sequência gênica do alelo selvagem *tim*, de seu mutante e da estrutura de sua proteína foram caracterizados e identificado que TIM seria capaz de se ligar à proteína PER, através do domínio PAS (PER-ARNT-SIM) dessa, formando o heterodímero PER-TIM (Sehgal *et al.* 1994, 1995; Gekakis *et al.* 1995; Myers *et al.* 1995).

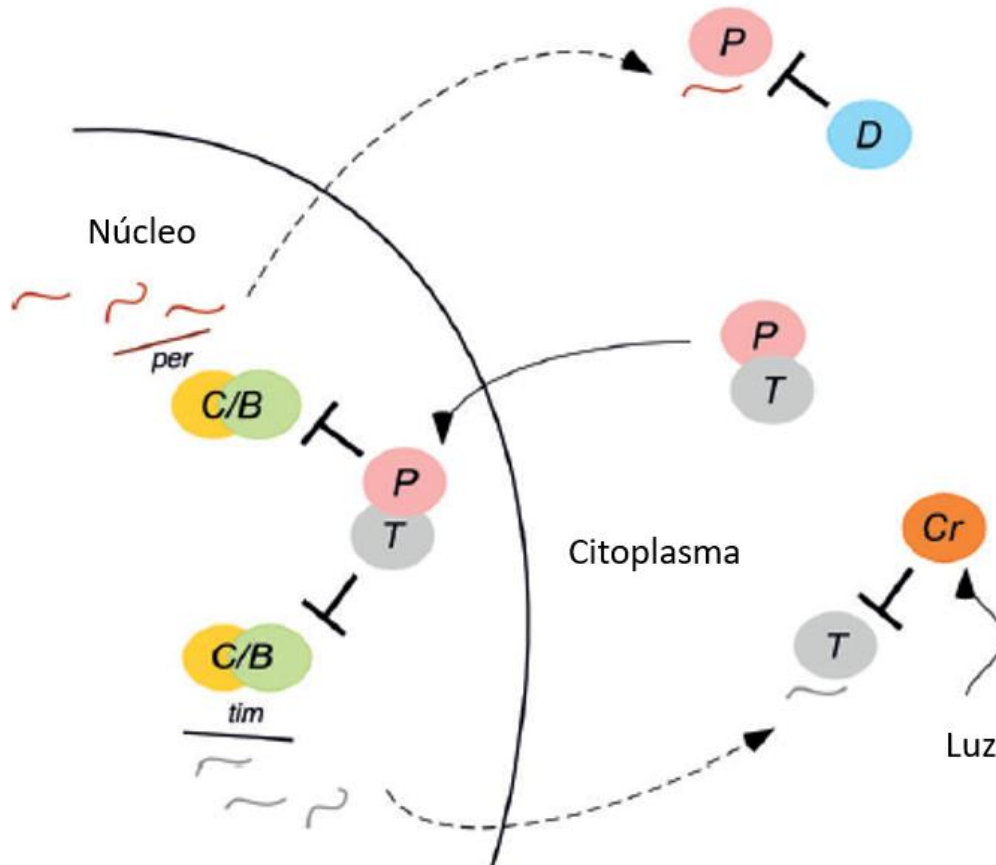
Desde então, com o aumento de grupos trabalhando com genes de controle do comportamento circadiano, multiplicaram-se os números de investigações acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação do marcapasso endógeno. Vários genes que compõem o relógio de *Drosophila* já foram identificados. Além de *period* e *timeless*, os principais e mais bem caracterizados genes são *Clock* (*Clk*) (Allada *et al.* 1998), *cycle* (*cyc*), (Rutila *et al.* 1998), *cryptochrome* (*cry*) (Stanewsky *et al.* 1998), *doubletime* (*dbt*) (Kloss *et al.* 1998; Price *et al.* 1998), *shaggy* (*sgg*) (Martinek *et al.* 2001), *casein kinase 2* (*CK2*) (Lin *et al.* 2002; Akten *et al.* 2003), *vri* (*vri*) (Glossop *et al.* 2003), *PAR domain protein 1 ε e δ* (*Pdp1 ε/δ*) (Cyran *et al.* 2003; Zheng *et al.* 2009) *clockwork orange* (*cwo*) (Kadener *et al.* 2007; Lim *et al.* 2007; Matsumoto *et al.* 2007) e *Ecdysone-induced protein 75* (*E75*) (Kumar *et al.* 2014).

Hoje sabemos que esse conjunto de genes formam alças auto-regulatórias que ciclam com um período próximo a 24 horas mesmo em condições ambientais constantes (revisado em Hardin 2011 e Young 2018). Neste marcapasso endógeno, a transcrição de *per* e *tim* é induzida pelas proteínas CLOCK (CLK) e CYCLE (CYC), que, ao longo do dia e início da noite, formam um heterodímero que se liga ao sítio E-box (CACGTG) nas regiões promotoras desses genes (Figura 1.6). Graças a tal ativação, há um aumento na expressão gênica que atinge seu nível máximo no início da noite (Darlington *et al.* 1998). Em meados do horário noturno, nota-se os níveis mais elevados de TIM. O acúmulo de PER acontece cerca de 2 horas depois e essa diferença se justifica pela estabilização de PER exercida por TIM. A proteína DOUBLETIME (DBT) fosforila PER, marcando-a para degradação via proteossoma (Edery *et al.* 1994; Kloss *et al.* 1998; Price *et al.* 1998; Kloss *et al.* 2001). Entretanto, uma vez que TIM aumenta suas concentrações, PER associa-se a essa proteína. O heterodímero PER-TIM estabiliza PER, protegendo-a da fosforilação e subsequente degradação exercida por DBT (Price *et al.* 1995; Stanewsky, 2002, 2003; Taghert & Lin 2005; Yu *et al.* 2006) (Figura 1.6).

É importante ressaltarmos ainda que DBT associa-se a PER-TIM, formando o complexo PER-TIM-DBT (Kloss *et al.* 2001). A fosforilação de PER e TIM pelas quinases CK2 e SGG, respectivamente, promove a migração de tal complexo para dentro do núcleo (Martinek *et al.* 2001; Lin *et al.* 2002; Akten *et al.* 2003; Chang & Reppert 2003). No núcleo, acontece a fosforilação de CLK por meio de DBT, o que impede a ligação do fator transcricional CLK-CYC às regiões promotoras dos genes controlados por esse heterodímero, como *period* e *timeless* (Figura 1.6) (Yu *et al.* 2006; revisado em Hardin 2011 e Young 2018).

No meio da noite, com a interrupção da transcrição de *per* e *tim*, os níveis de suas proteínas começam a cair. Já no início do dia, a exposição à luz provoca um "acerto" no relógio através da flavoproteína denominada CRYPTOCHROME (CRY). Na presença de luz, CRY sofre uma mudança conformacional que permite sua ligação a TIM. Esse fato desencadeia uma série de eventos envolvendo fosforilação e ubiquitinação de TIM que culmina com sua degradação via proteossoma. (Stanewsky *et al.* 1998; Suri *et al.* 1998; Naidoo *et al.* 1999; Emery *et al.* 2000a; Lin *et al.* 2001; Rieger *et al.* 2003; Busza *et al.* 2004) (Figura 1.6). Graças à ativação de CRY pela luz nas primeiras horas da manhã, TIM alcança seu nível mais baixo no relógio central, o

que resulta também na diminuição de PER até meados do dia. Uma vez cessada a repressão exercida por PER-TIM-DBT, CLK-CYC consegue se ligar e ativar novamente a transcrição de *per* e *tim*, recomeçando o ciclo da primeira alça de retroalimentação (Stanewsky 2003; Taghert & Lin 2005) (Figura 1.6).



**Figura 1.6 – Organização molecular do relógio circadiano de *Drosophila*.** Esquema representando a primeira alça de retroalimentação do relógio circadiano de *Drosophila*. Quando as proteínas Period (PER, P) e Timeless (TIM, T) estão ausentes do núcleo, os dois ativadores transcricionais Clock (CLK, C) e Cycle (CYC, B) conduzem a expressão dos genes *per* e *tim*. PER e TIM formam um complexo no citoplasma e após um atraso de várias horas, ambas as proteínas conseguem se acumular no núcleo. Na ausência de TIM, PER é fosforilado e desestabilizado por Doubletime (DBT, D). Isso retarda o acúmulo citoplasmático de complexos PER e PER / TIM. No núcleo, PER e TIM associam-se a complexos CLK / CYC, inibindo a transcrição posterior dos genes *per* e *tim*. Conforme o RNA de *per* e *tim* e, subsequentemente, os níveis de proteína caem, o ciclo é reiniciado por complexos CLK / CYC desinibidos. Na escuridão constante, os atrasos temporais, como o fornecido pelo DBT, promovem oscilações neste ciclo de feedback molecular. O fotorreceptor Criptocromo (Cr) se liga a TIM na presença de luz, levando à fosforilação e degradação de ambas as proteínas. Na ausência de TIM, PER também será degradado devido a interações com DBT. A perda de PER e TIM induzida pela luz reforça a ritmicidade molecular, com a transcrição *per / tim* permitida durante o dia e inibida à noite. Setas tracejadas e sólidas mostram movimentos de RNA e proteínas, respectivamente. Modificado de Young, 2018.

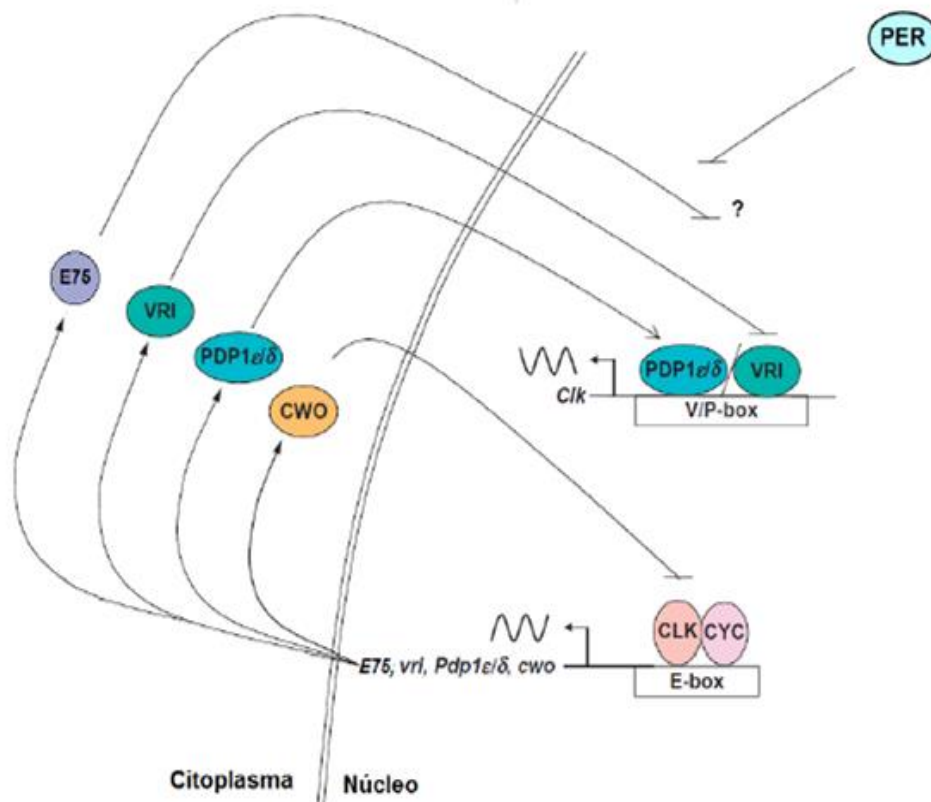
Adicionalmente, além de atuar como um fotorreceptor, CRY também pode ter uma função repressora. Os mamíferos possuem dois CRYs: *mCry1* e *mCry2*, os quais funcionam como componentes principais do relógio (Okamura *et al.* 1999; Van der Horst *et al.* 1999). Muitos insetos também contêm dois CRYs, incluindo o tipo de *Drosophila* (dCRY) e o tipo de mamífero mCRY. O primeiro é principalmente reconhecido pela sua função como um fotorreceptor de luz azul e o segundo como um repressor transcricional (Zhu *et al.* 2005, 2008). *Drosophila* tem um único *cry*, mas algumas pesquisas sugerem que ele poderia desempenhar ambas as funções dependendo do tecido em que se encontra, sendo um fotorreceptor no sistema circadiano central (Stanewsky *et al.* 1998; Helfrich-Förster *et al.* 2001), ou um repressor transcricional de alguns sistemas circadianos periféricos (Collins *et al.* 2006) (falaremos mais sobre relógios centrais e periféricos no próximo capítulo).

Curiosamente, as himenópteras, incluindo as abelhas, apresentam apenas mCRY em seu genoma (Rubin *et al.* 2006; Zhan *et al.* 2011). Como essa ordem de insetos também não possui o gene *tim*, sugere-se que o seu mCRY funcione como parceiro de PER (Rubin *et al.*, 2006). Já mosquitos apresentam dCRY (CRY1) e mCRY (CRY2) (Gentile *et al.* 2009; Rivas *et al.* 2008; Teles-de-Freitas 2020), possivelmente dividindo as funções de fotorreceptor e repressor entre essas proteínas. Assim, é provável que um inseto ancestral tivesse dCRY e mCRY, e que, durante o curso da evolução, algumas espécies tenham retido os dois, enquanto outras perderam dCRY ou o mCRY (Yuan *et al.* 2007).

Além da repressão exercida por PER-TIM-DBT, a proteína CWO também teria a capacidade de inibir CLK-CYC. Há um sítio E-box na região promotora do gene *cwo*, que é ativado por CLK-CYC. Assim, CWO se ligaria a sítios E-boxes na região promotora tanto do seu, quanto de outros genes, o que inibiria por competição a atuação de CLK-CYC (Figura 1.7). Além disso, CWO também atua na manutenção da amplitude de ciclagem de *per* (Kadener *et al.* 2007; Lim *et al.* 2007; Matsumoto *et al.* 2007).

Devemos destacar ainda mais uma alça regulatória, aquela centrada na regulação transcricional de *Clk*. Diferente de *cyc*, que apresenta níveis constitutivos tanto em sua proteína quanto em seu transcrito, *Clk* possui uma expressão cíclica em *Drosophila* (Rutila *et al.* 1998). O mRNA de *Clk* cicla em fase oposta a *per* e *tim*, com

abundância máxima nas primeiras horas do dia. O controle transcricional desse gene é exercido por VRI, PDP1 $\epsilon/\delta$  e E75. Os genes *vri* e *Pdp1*  $\epsilon/\delta$  também apresentam sítios E-boxes nas suas regiões promotoras que serão ativados por CLK-CYC (Zheng *et al.* 2009). No entanto, embora esses genes tenham o mesmo heterodímero como principal ativador, o acúmulo do RNA mensageiro e da proteína de *vri* e *pdp1*  $\epsilon/\delta$  ocorrem com cinéticas distintas (Cyran *et al.* 2003). Isso acontece provavelmente devido a diferenças na meia-vida dos transcritos ou nas regiões promotoras destes genes. De fato, as diferenças no acúmulo de VRI e PDP juntamente com as distintas funções desempenhadas por essas proteínas justificariam a ritmicidade na expressão de *Clk*.



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

A proteína e transcrito de *vri* apresentam fases parecidas, com níveis mais elevados no início da noite. Neste momento, VRI liga-se ao sítio V/P box (VRI/PDP-box) na região promotora de *Clk*, promovendo a inibição desse gene. O RNA mensageiro de *Pdp1*  $\epsilon/\delta$  só atinge sua concentração máxima cerca de três a seis horas depois do de *vri*. Estas diferenças se estendem ao nível proteico, observando-se um atraso médio de quatro horas entre o pico de VRI e o momento em que PDP1  $\epsilon/\delta$  atinge seu nível máximo. Com os aumentos de PDP1  $\epsilon/\delta$ , ocorre uma maior ligação destas proteínas ao sítio V/P box, o que ativa a transcrição de *Clk* (Figura 1.7) (Cyran *et al.* 2003; Zheng *et al.* 2009; revisado em Hardin 2011 e Young 2018).

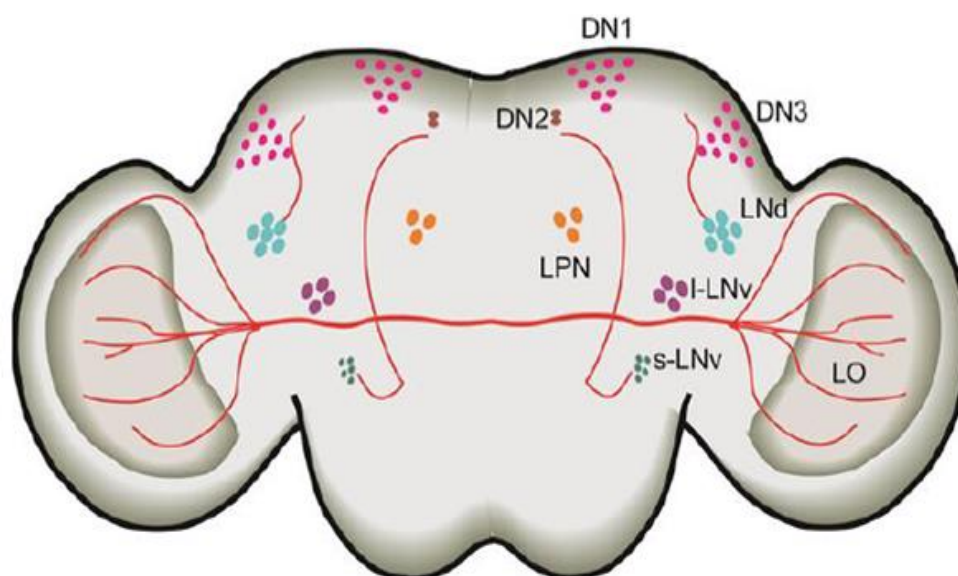
Há ainda um terceiro fator que atuaria na modulação da expressão de *Clk*, denominado *Ecdysone-induced protein 75 (E75)*. E75 é um receptor nuclear hormonal induzido por ecdisona, que inibiria a expressão de *Clk* sozinho ou em combinação com VRI, possivelmente funcionando como um elo entre o relógio e sinais extracelulares (Figura 1.7) (Kumar *et al.* 2014). Interessantemente, a indução de E75 por hormônios esteróides como a ecdisona provavelmente permite ao relógio responder ao sistema endócrino e é possível que o relógio também regule E75, uma vez que experimentos prévios mostraram a ligação de CLK ao promotor desse gene (Abruzzi *et al.* 2011). A proteína PER teria a capacidade de inibir a atividade de E75 no promotor de *Clk*, talvez por afetar diretamente a ligação de E75 ao DNA ou até mesmo desestabilizando essa proteína. Assim, é acrescentado um novo papel a PER, envolvendo-a no controle transcricional de *Clk* (Kumar *et al.* 2014).

Como pode ser visto, VRI, E75, PDP1  $\epsilon/\delta$  e PER apresentam funções antagônicas para a regulação da transcrição de *Clk*. No entanto, embora a diferença no acúmulo dessas proteínas propícia uma modulação rítmica diária no mRNA desse gene, a proteína CLK não cicla (Cyran *et al.* 2003; Houl *et al.* 2006; Yu *et al.* 2006; Zheng *et al.* 2009). O que ocorre é uma variação rítmica no estado de fosforilação de CLK. O padrão hiperfosforilado e menos estável desta proteína diminui ao longo do dia, enquanto o padrão hipofosforilado e mais estável tende a aumentar, no momento de maior transcrição dos genes controlados por CLK-CYC (Kim & Edery 2006; Yu *et al.* 2006).



### 1.2.2- O relógio circadiano em diferentes tecidos

Na mosca de frutas, *D. melanogaster*, o relógio central consiste em cerca de 150 neurônios no cérebro que expressam os chamados genes do relógio circadiano (Taghert & Shafer 2006; Shafer & Yao 2014). O relógio central regula os ritmos comportamentais, incluindo o comportamento locomotor e os ciclos de sono e vigília, e está dividido em dois grupos neurais, neurônios laterais (LNs) e neurônios dorsais (DNs). Os LNs são subdivididos em três grupos, LNs ventrais pequenos (s-LNv), LNs ventrais grandes (l-LNv) e LNs dorsais (LNd). Os DNs são subdivididos em três grupos, DN1, DN2 e DN3 (revisados por Helfrich-Förster 2005; Hermann-Luibl & Helfrich-Förster 2015) (Figura 1.8). Os s-LNv são necessários e suficientes para a manutenção de ritmos locomotores em escuro constante (DD) (Helfrich-Förster 1998; Renn et al. 1999) e são o grupo mais importante na rede circadiana central (Grima et al. 2004; Stoleru et al. 2004, 2005). A rede neuronal dinâmica que conecta os neurônios do relógio é regulada por vários neurotransmissores, incluindo o fator de dispersão de pigmento (PDF), que é expresso nos s-LNv e l-LNv (Yao & Shafer 2014; Hermann-Luibl & Helfrich-Förster 2015) e ajusta o ritmo circadiano para se adaptar aos ciclos ambientais (Miyasako et al. 2007; Yao & Shafer 2014). Além do relógio central, os relógios periféricos residem em vários órgãos e tecidos e provavelmente regulam os ritmos nas funções específicas desses.



**Figura 1.8 - Esquema representando a distribuição dos neurônios do relógio em *D. melanogaster*.** Círculos laranja mostram a localização dos neurônios laterais posteriores (LPN), os azuis apontam os neurônios laterais dorsais (LN<sub>d</sub>), os lilases indicam os neurônios laterais ventrais grandes (l-LN<sub>v</sub>), os verdes exibem a localização nos neurônios laterais ventrais pequenos (s-LN<sub>v</sub>), os rosas apontam os neurônios dorsais 1 e 3 (DN1 e DN3), em marrom são mostrados os neurônios dorsais 2 (DN2) e visualizamos ainda a região do lobo ótico (LO). Imagem meramente ilustrativa, sem relação com o quantitativo de neurônios em cada região (modificado de Amoretty *et al.* 2013).

Os primeiros estudos indicavam que os relógios periféricos eram baseados na oscilação molecular autônoma das células e que responderiam mais diretamente à luz quando mantidos em condições de cultura (Plautz *et al.* 1997). No entanto, investigações adicionais revelam que, embora a maioria dos osciladores periféricos possam manter sua oscilação sob condições de cultura *in vitro*, as oscilações não necessariamente refletem o que aconteceriam *in vivo*, onde essas podem ser influenciadas por vários fatores, incluindo o relógio central. Atualmente, diferentes níveis hierárquicos entre relógios centrais e periféricos são conhecidos em *Drosophila*. Isto é, os relógios periféricos podem ser independentes, dependentes ou dirigidos pelo relógio central (Krishnan *et al.* 1999; Giebultowicz 2000; Ivanchenko *et al.* 2001; Ito *et al.* 2008; Krupp *et al.* 2008, 2013; Morioka *et al.* 2012; Ito & Tomioka 2016).

Os túbulos de Malpighi são exemplos de órgãos com relógios periféricos independentes do central (Giebultowicz & Hege 1997). Giebultowicz e colaboradores (2000) mostraram que a fase original de TIM nos túbulos de Malpighi é mantida em DD quando esses órgãos são transplantados para abdomens de indivíduos que estavam sincronizados em ciclos de claro/escuro fora-de-fase (ou seja, dias escuros e noites claras). Sabe-se também que o relógio circadiano da antena é, de forma semelhante, independente do relógio central. O ritmo olfativo dirigido por esse relógio periférico permanece intacto mesmo quando os LN<sub>v</sub>s do relógio central foram suprimidos (Krishnan *et al.* 1999; Tanoue *et al.* 2004).

Por outro lado, alguns órgãos têm o seu relógio periférico dependente do relógio central. Por exemplo, Krupp e colaboradores (2013) demonstraram que a fase do relógio circadiano nos enócitos, que regulam a produção de feromônios, é controlada pelo relógio central. Eles viram que a expressão de genes do relógio

periférico pode ser afetada quando a sinalização em PDF é interrompida ou em mutantes sem receptores para PDF.

O terceiro tipo de relógio periférico seria aquele dirigido pelo relógio central. O tempo de eclosão, por exemplo, é controlado por um sistema circadiano que consiste em dois osciladores hierarquicamente organizados, localizados nos LNvs e nas glândulas protorácicas (Myers *et al.* 2003; Morioka *et al.* 2012). A interrupção direcionada de qualquer um desses dois osciladores circadianos através de uma super-expressão de *tim* torna a eclosão arritmica. Mas o ritmo de eclosão e as oscilações de TIM nas glândulas protorácicas também são diminuídos quando os LNvs são eliminados (Myers *et al.* 2003). Esses resultados sugerem que tanto o relógio dos LNvs, quanto o das glândulas protorácicas são necessários para o ritmo de eclosão, embora as glândulas protorácicas respondam hierarquicamente aos LNvs do relógio central.

### 1.2.3- Sincronizadores do relógio circadiano

Como mencionamos, os insetos, assim como a maioria dos organismos, possuem relógios circadianos endógenos. Isso permite que eles sejam preparados com antecedência para as mudanças cíclicas no ambiente a cada dia, em vez de simplesmente responderem passivamente a elas. Mas os próprios relógios precisam ser sincronizados (= arrastados) com os ciclos externos de 24 horas para funcionar como marca-passos diários adequados. Os principais sincronizadores ambientais são os ciclos de claro/escuro e ciclos de temperatura.

Para entendermos a importância desses sincronizadores em insetos, focaremos mais uma vez em *D. melanogaster*. Essa espécie é conhecida por apresentar um comportamento bimodal, com um pico de atividade no começo da manhã (pico M, do inglês, *morning peak*) e outro no final da tarde (pico E, do inglês, *evening peak*). Em um contexto histórico, desde a década de 1970, Pittendrigh e Daan, observando a influência dos ciclos de claro/escuro, propunham que o pico M e o pico E seriam o efeito de dois osciladores distintos, influenciados pelo amanhecer e crepúsculo, respectivamente (Pittendrigh e Daan 1976). De fato, hoje sabemos que, dentre os fatores ambientais, o ciclo de claro/escuro se destaca como o mais

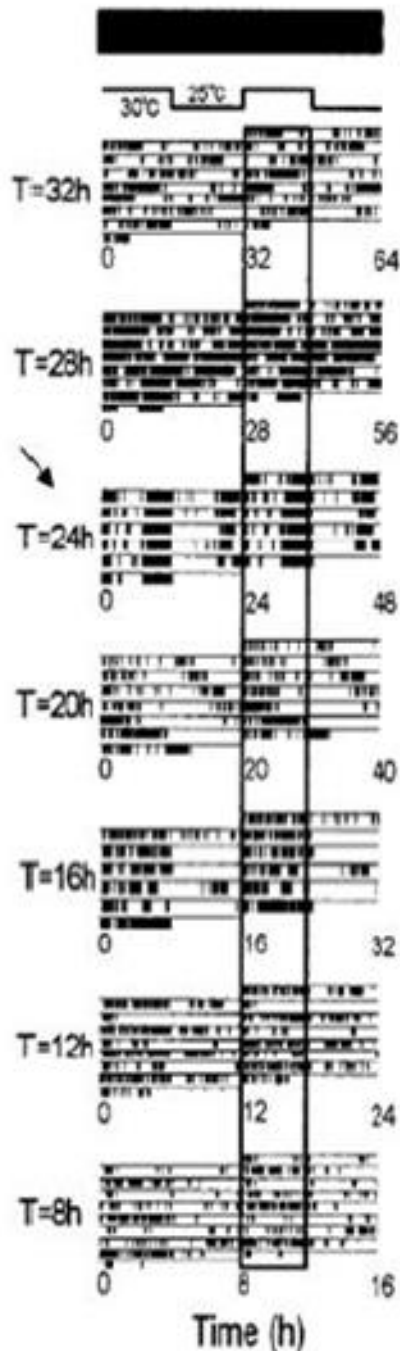
importante para *Drosophila*. A sensibilidade a tal indicador ambiental é tão grande que mesmo ciclos de claro/escuro de baixíssima amplitude (0,03 lux na fase clara, sendo  $1 \text{ lx} = 1 \text{ lm/m}^2$ ) ou de diferentes fotoperíodos são capazes de sincronizar o relógio dessas moscas (Helfrich-Förster 2001; Bachleitner *et al.* 2007).

Se observarmos os ritmos de bioluminescência produzidos por *per-luc* (promotor do gene *period* associado a uma luciferase repórter), é possível perceber que mesmo células isoladas são capazes de serem sincronizadas pelos ciclos de claro/escuro. A proteína CRY parece ser o fotorreceptor intracelular responsável por essa sincronização autônoma em diversas células, incluindo tecidos periféricos e no relógio central (Emery *et al.* 1998; Stanewsky *et al.* 1998; Egan *et al.* 1999; Ishikawa *et al.* 1999; Selby *et al.* 1999; Emery *et al.* 2000b; Levine *et al.* 2002; Helfrich-Förster 2020). Moscas *cry<sup>b</sup>*, que apresentam uma mutação pontual e ausência da função fotorreceptora, ou mutantes nulos *cry<sup>0</sup>* permanecem rítmicos quando expostos à luz constantemente, condição em que o tipo selvagem se torna rapidamente arritmico. Possivelmente isso acontece devido à contínua ativação de CRY e degradação de TIM (Emery *et al.* 2000b; Dolezelova *et al.* 2007).

Devemos ressaltar ainda que, embora CRY seja o principal componente capaz de receber a informação luminosa, a ausência dessa flavoproteína não torna as moscas arrítmicas em ciclos de claro/escuro. Isso ocorre porque os ciclos de claro / escuro podem exercer sua sincronização por outras vias como os fotorreceptores externos (olhos compostos e ocelos) e o orifício de Hofbauer-Buchner's (H-B *eyelet*) (Helfrich-Forster *et al.* 2001; Rieger *et al.* 2003; Veleri *et al.* 2003). Assim, apenas a perda conjugada de *cry*, juntamente com os fotorreceptores externos e H-B *eyelet* gera drosófilas com um comportamento arritmico em ciclos de claro/escuro (Helfrich-Forster *et al.* 2001). Dessa forma, pode-se dizer que CRY, os fotorreceptores externos e H-B *eyelet* são fundamentais para a sincronização pelos ciclos de claro/escuro.

O segundo *Zeitgeber* mais importante para a sincronização do relógio circadiano de *Drosophila* são os ciclos de temperatura. Isto é, em *Drosophila*, a força desse *Zeitgeber* parece ser menor do que os ciclos de claro/escuro, já que apenas ciclos de temperatura com duração de 24 horas conseguem sincronizar os ritmos de atividade. Observa-se que essas moscas assumem um comportamento de livre-curso em ciclos maiores ou menores que 24 horas (Figura 1.9) (Yoshii *et al.* 2002). Talvez

justamente pela menor sensibilidade a esse *Zeitgeber* em um organismo modelo como *Drosophila*, até pouco tempo quase nada se sabia sobre os mecanismos moleculares que regiam os ciclos de temperatura em insetos. Nesse capítulo limitamos a descrição dos ciclos de claro/escuro aos tópicos mais importantes e focaremos em reunir o máximo de informações sobre os ciclos de temperatura, devido à importância de tal *Zeitgeber* para os resultados dessa tese.



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

Sabe-se que os ciclos de temperatura certamente recrutam o relógio circadiano. Mutantes com ausência em alguns transcritos do relógio como *dClk<sup>Jrk</sup>*, *cyc<sup>01</sup>*, *per<sup>01</sup>* e *tim<sup>01</sup>* apresentam padrões rítmicos anormais em ciclos de temperatura. Curiosamente, a contribuição desses genes pode ser diferente. Mutações em componentes centrais (*dClk<sup>Jrk</sup>* e *cyc<sup>01</sup>*) provocaram prejuízos maiores à sincronização do que as mutações em *per<sup>01</sup>* e *tim<sup>01</sup>* para *Drosophila* (Yoshii *et al.* 2002). Outro fato relevante é que PER e TIM em claro e temperatura constantes são arrítmicas; no entanto, essas proteínas oscilam em claro constante com ciclos de temperatura (Yoshii *et al.* 2005; Myers *et al.* 1996). Adicionalmente, compreende-se que os ciclos de temperatura são capazes de modular a expressão rítmica de diversos genes, constituintes ou não da maquinaria circadiana (Yoshii *et al.* 2007; Boothroyd *et al.* 2007).

Quanto às mudanças sazonais do meio ambiente, os ciclos de temperatura também podem ter um papel importante na adaptação dos insetos. Drosófilas são mais ativas durante a manhã em dias frios e com uma fotofase curta, característicos do final do outono, inverno e começo da primavera. Por outro lado, em dias quentes com uma fotofase longa, típicos do verão, observa-se um atraso na atividade dessas moscas. Esse fenômeno está associado com a ocorrência de um processamento alternativo que remove um íntron na região 3'UTR de *period*. Tal mecanismo acontece com maior frequência em temperaturas mais baixas, o que aumenta a estabilidade do transcrito e promove um acúmulo prematuro dos níveis da proteína PER, fazendo com que a atividade de *Drosophila* se inicie antecipadamente nessas condições (Majercak *et al.* 1999; Majercak *et al.* 2004; Collins *et al.* 2004; Vanin *et al.* 2012). Além disso, quando essas moscas são geneticamente modificadas para não apresentar a isoforma de *period<sup>cold</sup>*, observa-se que elas demoram mais tempo para se recuperar de estresses causados pelo frio (Pegoraro *et al.* 2014).

TIMELESS (TIM), proteína que forma um heterodímero com PER, possui isoformas também resultantes de *splicing* alternativos sensíveis a diferentes temperaturas. No caso de *tim*, o último íntron da região codificante é mais frequentemente retido em baixas temperaturas. Essa isoforma de *tim* (*tim<sup>cold</sup>*) tem seu pico de expressão antecipado e gera um códon de parada prematuro que origina uma proteína truncada (Boothroyd *et al.* 2007). Embora ainda não esteja claro como ocorre a participação dessas isoformas para a adaptação às mudanças sazonais, sabemos

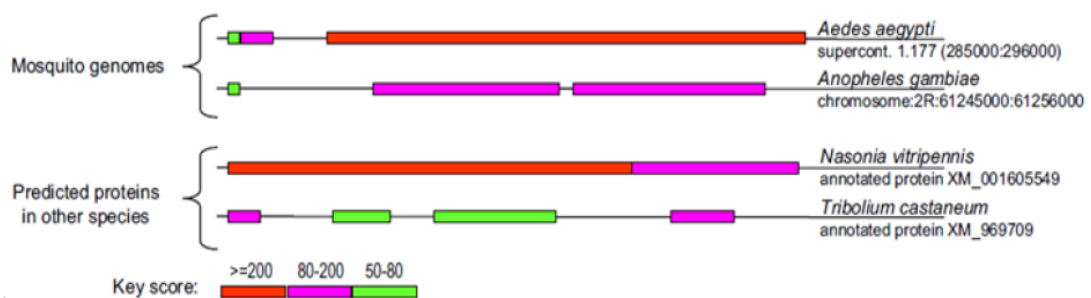
que o gene *norpA* está envolvido na regulação do *splicing* alternativo de *period*. Mutantes deficientes para esse gene apresentam transcritos com a remoção intrônica mesmo em temperaturas quentes. Vale ressaltar ainda que, além da participação na adaptação sazonal, a mutação em *norpA* afeta o padrão rítmico de *per* e a sincronização da atividade locomotora de drosófilas submetidas a ciclos de temperatura (Collins *et al.* 2004; Majercack *et al.* 2004; Glaser & Stanewsky 2005; Breda *et al.* 2020).

Assim, a sincronização pelos ciclos de temperatura possivelmente recruta diversos genes do marcapasso circadiano. Mas teriam os ciclos de temperatura um gene tão importante quanto *cry* é para sincronização do relógio pelos ciclos de claro/escuro? Se fossemos eleger um gene com tamanha importância, esse seria *nocte* (*no circadian temperature entrainment*). O gene *nocte* é expresso nos órgãos cordotonais, principais estruturas capazes de perceber as variações térmicas e transmiti-la aos demais osciladores periféricos (Sehadova *et al.* 2009). Estes componentes atuam como mecanotransdutores, tendo muitos deles sido implicados na propriocepção, na detecção da vibração ou na percepção da gravidade (Kernan 2007; Simoni *et al.* 2014). A importância dessas estruturas é tamanha que, embora diferentes neurônios do oscilador circadiano consigam sincronizar-se aos ciclos de temperatura, em cérebros isolados tal resposta não ocorre, pois a informação recepcionada nos órgãos periféricos não chegaria ao marcapasso central de *Drosophila* (Sehadova *et al.*, 2009). Assim, as alterações estruturais e funcionais nos órgãos cordotonais em mutantes para *nocte* poderia explicar os prejuízos à sincronização da expressão gênica e da atividade pelos ciclos de temperatura (Glaser & Stanewsky 2005; Sehadova *et al.* 2009; Chen *et al.* 2018).

A proteína NOCTE de *Drosophila* não apresenta homologia como qualquer família proteica já conhecida. Sabe-se apenas que é rica em cadeias de poli-glutamina e poli-alanina, com uma discreta similaridade na sua região N-terminal a um domínio presente em BAT2 de mamíferos (semelhança global fraca para os cerca de 70 aminoácidos, incluindo 11 aminoácidos idênticos). Assim, qualquer extrapolação sobre a atuação de NOCTE baseada unicamente no domínio BAT2, pode ser duvidosa. Por outro lado, Sehadova e colaboradores (2009) ao observarem a sequência de aminoácidos dessa proteína, ressaltam a baixa concentração de cisteínas e sugerem uma atuação intracelular. Ainda, segundo eles, a ausência de

domínios de ligação ao DNA, juntamente com a presença de regiões poli-Q e poli-A, suportariam a hipótese de NOCTE funcionar como um cofator transcricional.

De certo, se pouco se sabe sobre essa proteína em *Drosophila*, para outros insetos as informações limitam-se ainda mais com apenas descrições *in silico* de possíveis ortólogos. O estudo realizado por Sehadova e colaboradores (2009) se estendeu apenas para uma análise comparativa com outras espécies, descrevendo ortólogos deste gene em diferentes insetos, incluindo vetores como o *Aedes aegypti* (Figura 1.10) (Sehadova *et al.* 2009).



**Figura 1.10 - Alguns possíveis ortólogos da proteína NOCTE de *D. melanogaster*.** Observados em *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae* (Diptera), na vespa *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera), e no besouro *Tribolium castaneum* (Coleoptera). O Key score mostra o grau de similaridade (modificado de Sehadova *et al.*, 2009).

#### 1.2.4- Condições naturais / seminaturais vs. artificiais

O estudo do comportamento circadiano em organismos modelo é quase exclusivamente confinado ao laboratório, onde os fenótipos rítmicos são estudados em condições altamente simplificadas, como escuridão constante ou ciclos artificiais de claro/escuro e temperatura. Os ciclos ambientais na natureza são muito mais complexos. Trabalhos recentes com moscas ou mesmo mamíferos, revelaram que, quando colocados em situações naturais / seminaturais, o comportamento circadiano mostra características inesperadas que não são consistentes com as observações de laboratório.



Animais geralmente são estudados sob escuridão constante ou sob condições retangulares; com luzes e temperaturas acendendo e apagando (ou aumentando e diminuindo) repentinamente a cada 12 horas, sendo a noite representada pela escuridão e pelo frio. Essas condições de arrastamento simplificadas são artificiais em comparação com às experiências de animais na natureza, mas permitem o estudo de respostas comportamentais e moleculares a uma única variável de *Zeitgeber* enquanto todas as outras são mantidas constantes. Na natureza, no entanto, temperatura, luz, umidade, intensidade da luz lunar, fatores sociais, predadores, recursos alimentares e até mesmo as marés estão mudando de uma maneira dinâmica diária e sazonal que terá impacto no fenótipo circadiano do organismo.

Nos últimos anos, os cronobiologistas começaram a estudar o comportamento circadiano de organismos modelo em seus habitats naturais, ou pelo menos em ambientes seminaturais (Daan *et al.* 2011; De *et al.* 2013; Menegazzi *et al.* 2012; Vanin *et al.* 2012). Os resultados desses (reconhecidamente poucos) estudos foram muito surpreendentes e sugerem que algumas de nossas ideias sobre o que é comportamento circadiano adaptativo podem precisar ser revistas. Por exemplo, trabalhos com ritmos de eclosão mostram que o gênero *Drosophila* apresenta padrões de emergência específicos para diferentes espécies em laboratório, mas em condições menos artificiais, essas diferenças de espécies não eram evidentes e os ciclos de emergência foram ditados pelas condições ambientais prevalentes (Prabhakaran *et al.* 2013).

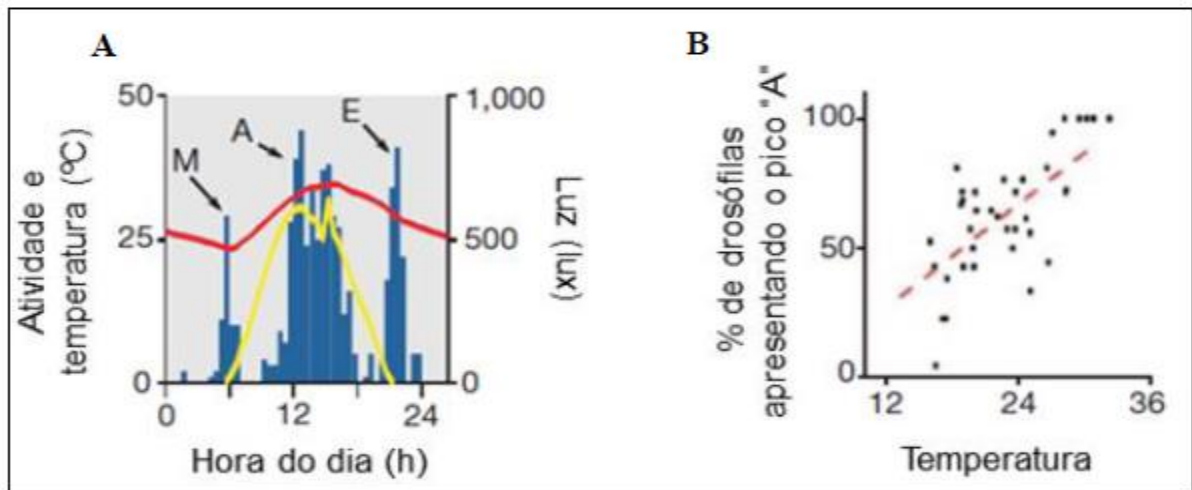
Outro exemplo vem com o trabalho de Vanin e colaboradores (2012). Eles relataram que mutantes *per*<sup>01</sup> e *tim*<sup>01</sup> de *D. melanogaster*, que apresentam padrão arritmico em condições de laboratório, exibem em condições seminaturais uma atividade locomotora praticamente idêntica ao de uma série de cepas de tipo selvagem, sugerindo que as atuações desses genes de relógio não são necessárias para o arrastamento na natureza (Vanin *et al.* 2012). Neste estudo, as moscas foram colocadas no mesmo monitor de atividade TriKinetics usados no laboratório, mas estes foram colocados em posições abrigadas ao ar livre entre abril e novembro em dois locais: Leicester, Reino Unido e Treviso, Itália. Assim, as moscas foram expostas a mudanças naturais diárias, lunares e sazonais de luz, temperatura e umidade. Esse estudo também desafiou outras suposições geradas em laboratório sobre os ritmos das moscas, que incluem características comportamentais fundamentais como a

“antecipação matinal”; ou seja, o aumento da atividade locomotora que antecede o “acendimento” das luzes no laboratório. Na natureza, esse súbito sinal de "acender as luzes" é substituído pela transição gradual de luminosidade ao amanhecer. Quando as moscas foram investigadas em condições naturais, observou-se um aumento no comportamento locomotor matinal que era altamente dependente da temperatura. Essa antecipação efetivamente desaparecia sob temperaturas mais frias ao amanhecer, quando a atividade era então atrasada.

Além disso, a “sesta”, período durante o qual as moscas descansavam nas partes mais quentes do dia de verão, foi substituída por uma grande explosão de atividade à tarde (pico A); este componente “A” nunca havia sido observado no paradigma de laboratório, mesmo sob altas temperaturas constantes (Figura 1.11). Observaram também que o comportamento das moscas na natureza não era "crepuscular" como frequentemente citado (por exemplo, Rieger *et al.* 2007), mas diurno, e a crença de longa data de que os ciclos de claro/escuro fornecem o *Zeitgeber* ambiental mais importante não foi apoiada. Na natureza a temperatura parece ser componente mais importante para estabelecer a fase dos principais picos de atividade em *D. melanogaster* (Vanin *et al.* 2012).

Os trabalhos de Vanin e Menegazzi, ambos de 2012, sugeriram que o pico A pode ser uma resposta de escape regulada por relógio à alta temperatura (Vanin *et al.* 2012; Menegazzi *et al.* 2012). Conclusões semelhantes foram tiradas sobre o componente A em quatro espécies de *Drosophila*, incluindo *D. melanogaster* (Prabhakaran & Sheeba 2014). De fato, trabalhos mais recentes revelam que o pico A é mediado pelo canal TrpA1 (Green *et al.* 2015), que responde a estímulos nocivos, como altas temperaturas (Neely *et al.* 2011).

Menegazzi e colaboradores (2013) também examinaram, em condições naturais, a ciclagem de PER e TIM em neurônios de relógio. Inesperadamente, eles observaram que durante o verão italiano, o ciclo de PER e TIM foram desacoplados, de modo que, enquanto o TIM ainda atingia o pico à noite, PER poderia estar até 8 h fora de fase com relação a TIM, tanto na natureza quanto no simulador de ambientes naturais em laboratório. Esses resultados são bem diferentes do que era conhecido para regimes retangulares em laboratório, em que os níveis de PER e TIM geralmente aumentam aproximadamente ao mesmo tempo (por exemplo, Saez & Young 1996).



**Figura 1.11 - Atividade de *Drosophila* na natureza. A)** Atividade locomotora individual de um macho de *D. melanogaster* em um dia de verão, média diária de temperatura de 28,7 °C, máxima de 34,4°C e mínima de 23,4°C. “M”, “A” e “E” representam os picos M, A e E; respectivamente. Em azul, observa-se a atividade locomotora; em amarelo, a intensidade de luz e em vermelho de temperatura. **B)** Pico da tarde é associado com a temperatura ( $R^2 = 0,34$ ;  $F_{1,32} = 17,7$ ;  $P < 0,0002$ ) (modificado de Vanin et al., 2012).

### 1.2.5 - O relógio circadiano em mosquitos

Mesmo *D. melanogaster* sendo o principal modelo, concentrando grande parte do entendimento sobre a genética molecular do relógio circadiano, evidências apontam que os relógios de insetos podem ser bastante distintos entre si (Tomioka & Matsumoto 2010), demonstrando que o que é compreendido em *Drosophila* não pode ser totalmente extrapolado para as demais espécies. Por exemplo, análises de expressão gênica ou de *locus* de característica quantitativa (do inglês, *quantitative trait locus* - QTL) sugerem que o gene *cryptochrome 2* (*cry2*) pode ser um dos componentes do relógio circadiano mais importantes para a diferenciação de cronotipos em mosquitos. No entanto, este gene não tem nem mesmo um ortólogo em *Drosophila* (Gentile et al. 2009; Rund et al. 2011; Rund et al. 2013; Leming et al. 2014; Rivas et al. 2018; Hickner et al. 2019).

De fato, se a cada dia a comunidade científica se surpreende com novos componentes circadianos ou como as diferentes condições ambientais podem atuar no relógio de *D. melanogaster*, para organismos não modelo o conhecimento é ainda mais escasso. No entanto, o entendimento sobre o relógio circadiano de insetos como

mosquitos, poderia até mesmo ajudar a elucidar a dinâmica de transmissões de patógenos. Isso porque esses hematófagos apresentam ritmos de atividade e alimentação sanguínea que estão sob o controle de um relógio circadiano endógeno (revisado em Clements 1999; Saunders 2002). O mesmo pode ser observado para diferentes aspectos da fisiologia, que desempenham um papel importante na competência vetorial e também para a resposta imune e metabolismo (Das & Dimopoulos 2008).

Nessa tese investigamos os ritmos de atividade e a expressão de genes do relógio circadiano da espécie *Aedes aegypti*. Tal mosquito de hábitos diurnos é considerado vector de patógenos causadores de doenças graves, como dengue, febre amarela, Zika e chikungunya. Segundo dados do Ministério da Saúde, apenas em 2020, foram registrados mais de 1 milhão de casos das doenças associadas a vírus transmitidos pelo *Ae. aegypti* (Brasil, 2020; <https://www.gov.br/saude>).

Nosso grupo vem procurando entender o relógio circadiano desses importantes vetores. Observamos que aspectos da fisiologia e comportamento do *Ae. aegypti* poderiam ser modulados de formas diferentes de acordo com os tipos de arbovírus que infectam os mosquitos. Por exemplo, a infecção por DENV2 aumentou a atividade locomotora, enquanto a infecção por ZIKV e CHIKV parece causar a diminuição na sua atividade (Lima-Camara *et al.* 2011; Padilha *et al.* 2018; Padilha *et al.* 2020). Além disso, verificamos que a postura de ovos pelas fêmeas, característica fisiológica que também parece ser regulada pelo relógio, é afetada pelo tipo viral que o mosquito foi infectado. Quando a infecção ocorre por DENV2, diminui-se o número de ovos postos pelas fêmeas, mas a infecção com ZIKV e CHIKV não afeta esse parâmetro (Clements 1999; Maciel-de-Freitas *et al.* 2011; Farnesi *et al.* 2018; Padilha *et al.* 2018; Resck *et al.* 2020).

De fato, a maioria dos estudos sobre comportamentos associados ao relógio circadiano de *Ae. aegypti* enfoca as características da fêmea, incluindo o comportamento de busca do hospedeiro, a fisiologia da transmissão do vírus e a escolha do local para a oviposição. No entanto, nosso grupo também procurou observar o comportamento dos machos, pois compreendemos que os fatores que levam ao sucesso reprodutivo desses pode ajudar a construir novas estratégias para restringir o crescimento populacional. Araripe e outros colaboradores (2018) observaram que os machos de *Ae. aegypti* são capazes de alterar significativamente seu perfil de atividade quando percebem a presença de fêmeas. Além disso, notaram

que as batidas das asas das fêmeas não são as únicas pistas percebidas pelos machos; sinais químicos e / ou visuais também podem estar em jogo para provocar a mudança no pico de atividade nos machos. De fato, a comunicação entre machos e fêmeas é o primeiro aspecto que garante um encontro bem-sucedido. Por exemplo, diversos estudos sugerem que as fêmeas inseminadas de *Aedes* apresentam mudanças em seus padrões de atividade porque as glândulas acessórias dos machos produzem proteínas específicas que são transferidas para as fêmeas durante o acasalamento (Klowden 1996 1999; Gillott 2003; Lima-Camara *et al.* 2013).

Assim, cada vez mais notamos que a atividade locomotora de mosquitos é uma manifestação de uma coleção de comportamentos associados a funções básicas como forrageamento, acasalamento, infecção, busca de hospedeiro e oviposição. Essas funções são apresentadas em ciclos, representando ritmos diários, característicos da espécie e reguladas por um relógio circadiano (Clements 1999; Lima-Camara *et al.* 2014). Mas, se ainda estamos longe dos avanços metodológicos que permitiram estudar organismos como *D. melanogaster*, também é verdade que atualmente técnicas como o PCR quantitativo em tempo real, hibridização *in situ*, microarranjos, QTL ou RNA de interferência permitiram começarmos a entender como o relógio de mosquitos funciona molecularmente (Gentile *et al.* 2009; Yang *et al.* 2010; Ptitsyn *et al.* 2011; Rund *et al.* 2011; Chahad-Ehlers *et al.* 2013; Gentile *et al.* 2013; Rund *et al.* 2013; Leming *et al.* 2014; Rivas *et al.* 2018; Hickner *et al.* 2019; Teles-de-Freitas *et al.* 2020; 2021).

Por exemplo, Gentile e colaboradores (2013), usando a técnica de RNA de interferência (RNAi), confirmaram que o *knockdown* do ortólogo de *tim* pode afetar o comportamento de *Aedes aegypti*. Curiosamente, o grupo de Yang e seus colaboradores (2010) também utilizando o silenciamento por RNAi, demonstraram que o *knockdown* do ortólogo de *per* reduz a resistência à permetrina, um composto largamente utilizado como repelente e inseticida para *Ae. aegypti*. De fato, estudos de microarranjos demonstram que diversos genes envolvidos não apenas na resposta a inseticidas, como também no desenvolvimento e imunidade de *Ae. aegypti*, apresentaram um padrão de expressão rítmico e poderiam estar sendo modulados pelo relógio (Ptitsyn *et al.* 2011; Leming *et al.* 2014).

Em um dos primeiros estudos a investigar as bases moleculares do relógio circadiano em *Ae. aegypti*, nosso grupo fez uma análise comparativa da expressão de genes do relógio circadiano entre *Ae. aegypti*, sabidamente diurno, e o mosquito noturno *Culex quinquefasciatus* (Gentile *et al.* 2009). Ambas as espécies parecem ter um padrão de expressão bastante conservado para os principais genes do relógio circadiano (*Clk*, *cyc*, *per*, *tim*, *vri*, *Pdp1* e *cry1*), com exceção de *cry2* que apresenta um único pico de expressão em *Culex* e um padrão bimodal em *Aedes* (Gentile *et al.* 2009). A proteína CRY2 está ausente em *Drosophila*, mas é encontrada em diversos insetos, como borboletas, besouro e abelhas; por exemplo, onde atua como um repressor do fator transcricional CLK-CYC (Shearman *et al.* 2000; Zhu *et al.* 2005; Yuan *et al.* 2007). Especula-se que as diferenças observadas na expressão de *cry2* poderiam contribuir para os distintos padrões de atividade encontrados entre *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* (Gentile *et al.* 2009).

Nós também estendemos a análise comparativa entre as duas espécies para melhor compreender o papel de indicadores ambientais na sincronização da atividade desses mosquitos e conseguimos observar diferentes hierarquias para cada espécie. Isto é, *Cx. quinquefasciatus* parece ter uma sensibilidade maior à luz do que *Ae. aegypti*, enquanto *Aedes* mostra-se mais influenciado pela temperatura do que *Culex*. A exposição de ambas as espécies a um regime de luz constante ajudou a entender essas diferenças (Rivas *et al.* 2018). Tal regime é conhecido por diminuir drasticamente a funcionalidade do relógio circadiano em insetos devido à constante ativação de CRY1 e subsequente degradação de TIM (Glaser e Stanewsky 2005). De fato, vimos que *Cx. quinquefasciatus* parece ser mais sensível ao regime de claro constante do que *Aedes*, sendo a expressão de genes no relógio do primeiro mosquito consideravelmente mais afetada pelo regime de claro constante que a do segundo (Rivas *et al.* 2018). Outro fato curioso que pôde reforçar a diferença de hierarquia entre esses *Zeitgebers* para mosquitos foi a exposição de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* a ciclos de claro/escuro e de temperatura retangulares em fase (dias quentes e noites frias) ou fora de fase (dias frios e noites quentes). Sob os ciclos em fase, *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* mantêm os padrões característicos de uma espécie diurna e noturna, concentrando suas atividades durante a fase clara-quente e a fase escura-fria, respectivamente. No entanto, quando os ciclos são colocados em fases opostas, as duas espécies ficam mais ativas durante à noite (fase escura-quente), sugerindo que os ciclos de temperatura possam exercer uma influência maior

nos padrões de atividade locomotora em *Ae. aegypti* do que em *Cx. quinquefasciatus* (Rivas *et al.* 2018).

Assim, diante da evidente importância dos ciclos de temperatura para *Aedes aegypti*, levantamos alguns questionamentos nessa tese. Primeiramente, a hierarquia dos *Zeitgebers* seria a mesma se esses mosquitos estivessem expostos a ciclos seminaturais em vez de retangulares? Segundo, de que forma os genes de relógio são expressos no corpo de *Ae. aegypti*? Como citamos, a sincronização realizada pelos ciclos de temperatura em *Drosophila*, precisaria primeiramente ser captada pelo marca-passo periférico no corpo (Sehadova *et al.* 2009). Apesar disso, nenhum gene de relógio havia tido sua expressão caracterizada, ao longo do dia, no corpo de *Ae. aegypti*. Terceiro, teria *nocte* um papel importante para a sincronização pelos ciclos de temperatura nesses mosquitos? Quais os impactos do *knockdown* desse gene?

## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1 – Objetivos Gerais**

Avaliar os efeitos dos ciclos de claro/escuro e, em especial, ciclos de temperatura seminaturais sobre a atividade locomotora e expressão de genes do relógio circadiano de *Aedes aegypti*.

### **2.2 – Objetivos Específicos**

- Avaliar a hierarquia de ciclos de claro/escuro e de temperatura seminaturais para *Aedes aegypti*.
- Entender quais genes participam da “captação da informação” inicial passada pelos ciclos de temperatura para a sincronização dos relógios circadianos (Input) de *Aedes aegypti*.
- Analisar como genes do relógio são expressos no corpo de *Ae. aegypti*.

### 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta tese foram divididos em dois artigos científicos, já publicados. O artigo 1 contempla os dois primeiros objetivos específicos, enquanto o artigo 2 contempla o objetivo de análise da expressão dos genes de relógio no corpo.

**Artigo 1: The Summer Is Coming: nocte and timeless Genes Are Influenced by Temperature Cycles and May Affect *Aedes aegypti* Locomotor Activity.** Rayane Teles-de-Freitas, Gustavo Bueno da Silva Rivas, Alexandre Afrânio Peixoto, Rafaela Vieira Bruno (Frontiers in Physiology 2020, 23;11:614722. DOI: 10.3389/fphys.2020.614722)

**Artigo 2: Off with their heads: analysis of the circadian clock genes expression in the body of *Aedes aegypti*.** Rayane Teles-de-Freitas, Liliane Barboza & Rafaela Vieira Bruno (Chronobiology International 2021, 26;1-8. DOI: 10.1080/07420528.2021.1903030)



### **3.1 – Artigo 1**

**Artigo 1: The Summer Is Coming: nocte and timeless Genes Are Influenced by Temperature Cycles and May Affect *Aedes aegypti* Locomotor Activity.**

Autores: Rayane Teles-de-Freitas, Gustavo Bueno da Silva Rivas, Alexandre Afranio Peixoto, Rafaela Vieira Bruno.



# The Summer Is Coming: *nocte* and *timeless* Genes Are Influenced by Temperature Cycles and May Affect *Aedes aegypti* Locomotor Activity

Rayane Teles-de-Freitas<sup>1</sup>, Gustavo B. S. Rivas<sup>2</sup>, Alexandre A. Peixoto<sup>1,3†</sup> and Rafaela Vieira Bruno<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil,

<sup>2</sup>Department of Biology, Center for Biological Clocks Research, Texas A&M University, College Station, TX, United States,

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM)/CNPq, Rio de Janeiro, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Maria Fernanda Ceriani, IIBBA-CONICET Leloir Institute Foundation, Argentina

### Reviewed by:

Ralf Stanewsky, University of Münster, Germany  
Kenji Tomioka, Okayama University, Japan

### \*Correspondence:

Rafaela Vieira Bruno  
rafaelav@ioc.fiocruz.br;  
rafaelabruno@gmail.com

†In memoriam

### Specialty section:

This article was submitted to Chronobiology, a section of the journal Frontiers in Physiology

**Received:** 06 October 2020

**Accepted:** 23 November 2020

**Published:** 23 December 2020

### Citation:

Teles-de-Freitas R, Rivas GBS, Peixoto AA and Bruno RV (2020) The Summer Is Coming: *nocte* and *timeless* Genes Are Influenced by Temperature Cycles and May Affect *Aedes aegypti* Locomotor Activity. *Front. Physiol.* 11:614722. doi: 10.3389/fphys.2020.614722

Mosquitoes exhibit activity rhythms, crucial for the transmission of pathogens, under the control of a circadian clock. *Aedes aegypti* is one of the world's leading vectors. For decades, several studies have linked the rise in ambient temperature with the increase in their activity. Here, we identify candidate genes whose expression is influenced by temperature cycles and may affect *Aedes* locomotor activity. We observed that *timeless* completely lost its rhythmic expression in light/dark, with out-of-phase temperature cycles, and by RNAi mediated knockdown of *nocte*, an important gene for *Drosophila* circadian synchronization by temperature cycles. Thus, *timeless* and *nocte* are important genes for synchronization by temperature cycles in *Aedes aegypti*. To reinforce our findings, we simulated in the laboratory the gradual temperature fluctuations that were as close as possible to daily temperature variations in Brazil. We observed that the activity and the expression of the molecular circadian clock of *Ae. aegypti* differs significantly from that of mosquitoes subjected to constant or rectangular abrupt changes in temperature. We suggest that for understanding the circadian behavior of *Aedes* with possible implications for intervention strategies, the seminatural paradigm needs to replace the traditional laboratory study.

**Keywords:** circadian rhythms, *Aedes aegypti*, seminatural cycles, temperature cycles, circadian gene expression, clock genes

## INTRODUCTION

Most organisms are exposed throughout the day to multiple cycling environmental cues. They are able to adapt and anticipate these changes due to the presence of an endogenous circadian clock that regulates their behavioral and physiological rhythms in accordance with external factors, such as light or temperature. Among the insects, the circadian clock of the model *Drosophila melanogaster* is the best studied so far. In fruit flies, the clock is generated by a set of genes that are linked through transcriptional and translational feedback loops. Two of the main components of *Drosophila* pacemaker—*Clock (Clk)* and *cycle (cyc)*—encode transcription factors that together

form the heterodimer CLK-CYC, which activates the expression of *period* (*per*), *timeless* (*tim*), *clockwork orange* (*cwo*), *PAR domain protein 1+* (*Pdp1+*) and *vriille* (*vr*) (Hardin, 2011; Rivas et al., 2016).

In *Drosophila*, these molecular cycles are self-sustained but able to use external cues to synchronize with the environment. Light/dark cycles and temperature fluctuations are the major agents of entrainment (Hardin, 2011; Rivas et al., 2016). In *Drosophila*, Cryptochrome (CRY) synchronizes the molecular feedback loop with the light-dark cycle. This flavoprotein binds directly to TIM in a light-dependent manner, which irreversibly commits TIM to degradation via the proteasome (Emery et al., 1998; Stanewsky et al., 1998; Lin et al., 2001; Busza et al., 2004; Dissel et al., 2004). For temperature entrainment however, *no circadian temperature entrainment* (*nocte*) plays the major role in the synchronization of clock gene expression and activity and is expressed in the chordotonal organs (ChOs, peripheral thermo-mechano sensors) (Glaser and Stanewsky, 2005; Sehadova et al., 2009; Chen et al., 2018).

However, what we understand about *Drosophila* cannot be fully extrapolated to other insects. For instance, gene expression or quantitative trait locus (QTL) analyses suggest that *cryptochrome 2* might be important for the differentiation of chronotypes in mosquitoes. However, this gene does not have an ortholog in *Drosophila* (Gentile et al., 2009; Rund et al., 2011, 2013; Leming et al., 2014; Rivas et al., 2018; Hickner et al., 2019). Knowledge about the clock of other insects is relatively poor compared to *Drosophila* and this lack of understanding aggravates public health problems involving the transmission of pathogens by insect vectors such as *Aedes aegypti*, where the clock determines several characteristics of pathogen transmission, such as locomotor activity, blood feeding, insecticide resistance and oviposition (Clements, 1999; Saunders, 2002; Yang et al., 2010).

Much of what is known about mosquito behavior is based on field studies (Clements, 1999; Saunders, 2002). By using RNA interference, we have observed that the knockdown of *Aetim* affected behavior under standard laboratory conditions (Gentile et al., 2013). We also observed a differential hierarchy of light and temperature as *Zeitgebers* in *Culex quinquefasciatus* and *Ae. aegypti*, where the former is more sensitive to light while the latter is more responsive to temperature (Rivas et al., 2018).

The mosquito *Ae. aegypti* is the main vector of Dengue, Chikungunya, and Zika arboviruses. The importance of temperature for the circadian clock of this species has been studied in the laboratory using rectangular temperature conditions (Rivas et al., 2018). More recent studies in *Drosophila* and other insects in natural and seminatural conditions have revealed that circadian behavior is very different from the traditional laboratory profiles (Currie et al., 2009; Yoshii et al., 2009, 2010; Menegazzi et al., 2012, 2013; Vanin et al., 2012; De et al., 2013; Green et al., 2015). We have therefore studied circadian behavior and gene expression of *Ae. aegypti* under seminatural conditions in the laboratory and observe some interesting changes compared to previous more artificial studies. We focus on temperature cycles and the role of *nocte*.

## MATERIALS AND METHODS

### Mosquitoes

Eggs of *Ae. aegypti* (Rockefeller strain) were kindly donated by IBEx (Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro, Brazil). Mosquitoes were reared from egg stage in LD 12:12 under constant 25 C. The females were separated from males while newly emerged and still virgins. In all experiments, we used 1 to 3 days old virgin females.

### Simulation of Light/Dark and Temperature Cycles

To simulate the light/dark cycles with gradual increase and decrease of luminosity during dawn and dusk, we used a computer controlled LED lighting system (HLT Powerbus USB station, Hoenig Lichttechnik Ltd.). All controls followed the manufacturer's specifications. Light had an increase from 0 to 1,000 lux, from ZT0 to ZT1.5, and remained stable in 1,000 lux from ZT1.5 to ZT10.5. Then it gradually decreased to 0 lux from ZT10.5 to ZT12, and continued in 0 lux from ZT12 to ZT24. Simulations of both seminatural and rectangular temperature cycles were possible due to the system of temperature ramps coupled to the equipment Solab—SL225/334 (Brazil).

### Locomotor Activity Recording

Each mosquito was placed in a 17 cm glass tube with cotton soaked in a 10% sucrose solution at one end. Additionally, both ends of the tubes were sealed with Parafilm <sup>®</sup> M (Sigma-Aldrich). As described in previous studies (Gentile et al., 2009, 2013; Rivas et al., 2018), the circadian locomotor activity rhythms of *Ae. aegypti* were recorded automatically using the DAM10 system, a larger version of the *Drosophila* Activity Monitoring system (Trikinetics, Waltham, MA). The movement of each mosquito was detected by the interruption of an infrared sensor on the monitor. Daily locomotion was recorded during 30 min intervals. As the mosquito activity data was especially variable, we first transformed the data into logarithm values. In fact, because we had many zeros in the data series, we used log (n C 1) and then calculated the mean of the two experiments. We have been using this practice to minimize distortions due to the high activity of some specimens (Padilha et al., 2018). The graphs and double-plotted actograms were made with Excel<sup>TM</sup> (Microsoft<sup>®</sup>) and ActogramJ Software (Schmid et al., 2011), respectively.

We measured the free-running period of 10 consecutive days in constant darkness conditions and we used  $\$2$  periodogram algorithm with ActogramJ, as previously described (Liu et al., 1991; Rund et al., 2013; Rivas et al., 2018). For our analysis, we considered only mosquitoes that presented rhythmicity with a power greater than 10. The power has been used as an efficient method to evaluate the consistency of the rhythm. It was defined as the difference between the top of the peak and the confidence level in the  $\$^2$  periodogram (Liu et al., 1991).

### Expression of Circadian Clock Genes

Female mosquitoes were kept for 3 days in the chosen regimen and on the third day we collected 10 individuals every 4 h

for a 24 h period. Each experiment represented six time-point samples, and this procedure was repeated three or four times. The total RNA of the heads was extracted with the TRIzol method (Invitrogen, Carlsbad, CA), and the cDNA was synthesized with TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA) following the methods described by Gentile et al. (2009). The final cDNA concentration was 1 ng/mL. Then, we made a relative quantification via real-time PCRs (qPCRs), using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher, Waltham, MA) in the StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher, Waltham, MA). We amplified *per*, *tim*, *cry2*, *cyc*, *Pdp1*, *vri*, *Clk*, and *rp49* genes using oligonucleotides designed by Gentile et al. (2009). For the genes *E75*, *cwo* and *nocte* we designed new ones, as described in **Supplementary Table 1**. We used *rp49* gene as a constitutive control and measured the relative mRNA abundance with the comparative *C<sub>T</sub>* method (Pfaffl, 2001). The values obtained for the relative abundance of mRNA were illustrated by Excel graphs.

## RNA Interference (RNAi) Experiments

To promote the knockdown of the *Ae. aegypti nocte*, we followed the RNAi methodology described by Gentile et al. (2013). We amplified and cloned 762 bp of the coding sequence of this gene into a pGEM-T Easy vector (Promega), in accordance with the manufacturer's protocol (**Supplementary Figure 3**). Then, we performed a polymerase chain reaction (PCR) with the plasmid containing the cloned *nocte* fragment and oligonucleotides complementary to *nocte* with a sequence of T7 promoter (see **Supplementary Table 1**), generating a fragment of 540 bp (**Supplementary Figure 3**). We purified the reaction product with the GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Then we synthesized the double-stranded RNA (dsRNA) with the MEGAscript kit (Life Technologies). The dsRNA was purified with lithium chloride. Both procedures were in accordance with the manufacturer's protocols. We quantified the material in the NanoDrop 3300 (Thermo Scientific). To generate the dsRNA of the control *LacZ* gene, the same procedure was conducted, as described by Gentile et al. (2013). The dsRNA, in a concentration of 3.0 mg/ml, was injected into one 3 days old virgin female *Ae. aegypti* using the Nanoject II micro-injector (Drummond Scientific). Each mosquito was injected with 207 nl of material. After injection, the recovered mosquitoes were used in the experiments of locomotor activity or analysis of the *nocte* expression with quantitative real-time PCR. The molecular analyses were performed on the fourth day after the injection with the dsRNAs. For more details, please see **Supplementary Figure 3** and **Supplementary Table 1**.

## Statistical Analysis

First, we tested if all parameters of activity followed a Gaussian distribution with the Shapiro-Wilk normality test ( $p < 0.05$ ). The E peaks of activity in constant darkness (DD) with seminatural or rectangular temperature cycles (TC) were analyzed using the Mann-Whitney *U*-test ( $p < 0.05$ ). The percentage of activity in photophase (ZT0.5–12) and darkphase (ZT12.5–24) of *Aedes aegypti* in different conditions was calculated with the Student's *t*-test.

We also calculated if the expression relative abundance of each gene varied significantly throughout the 24 h period of each regimen. We considered that a gene would have a rhythmic expression if the mRNA abundance differed significantly among the six time-point samples using a One-Way ANOVA ( $p < 0.05$ ). The expression of *nocte* in mosquitoes injected with dsRNA of *nocte* or dsRNA of *LacZ* was statistically evaluated using the Student's *t*-test. All statistical analyses were conducted with the GraphPad Prism 5 (Prism, La Jolla, CA).

## RESULTS

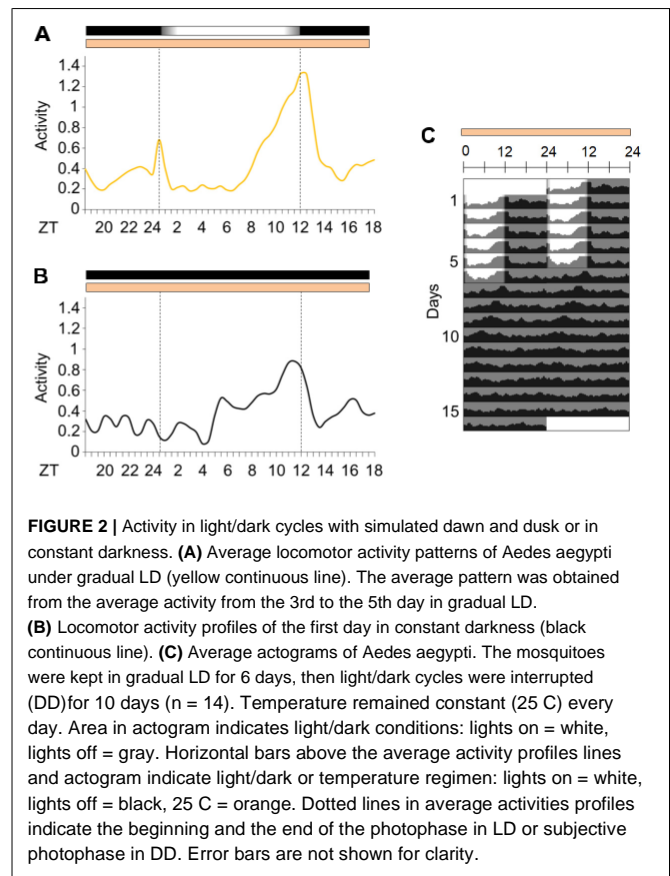
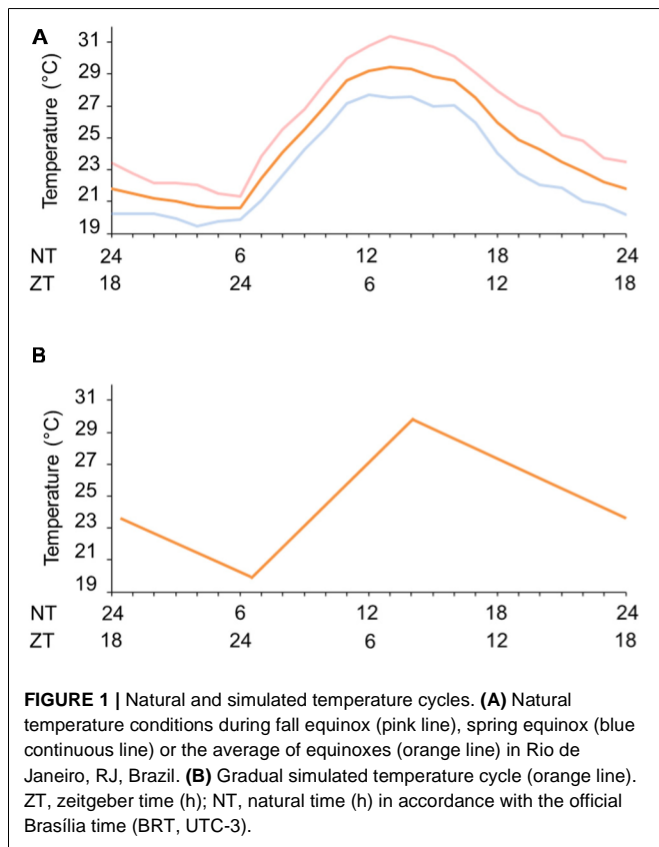
### Simulating Natural Temperature and Light/Dark Cycles

We first set a natural temperature cycle reference with the aid of the National Institute of Meteorology (INMET/Brazil). We obtained the temperature measurements in Rio de Janeiro, RJ, Brazil (A621 weather station, Vila Militar) for average March and September equinoxes from 2008 to 2013. We observed a minimum average temperature of 20.6 ± 1.24 C at 6 a.m. (ZT 0, ZT = *Zeitgeber* time. ZT is the temporal relation of the circadian rhythm to entraining signals such as dawn or the first introduction of light, i.e., wake time) and a maximum average temperature of 29.3 ± 4.92 C at 2 p.m. (ZT 8) (**Figure 1A**). With this information we were able to simulate seminatural temperature cycles in the laboratory and, based on the gradual temperature fluctuation, we set a minimum of 20 C at ZT 0 and a maximum of 30 C at ZT 8 (**Figure 1B**).

Defining a natural light/dark cycle reference was more complex because of brightness variations, which involve a range of spectral changes. Secondly, because brightness intensity varies from 0 to 10,000 lux, depending not only on the time of the day, but also on the weather conditions (sunny or cloudy days) and the place (opened or shaded areas), we used as reference a light/dark cycle previously established to analyze *Drosophila* activity under conditions similar to that of an equinox (Rieger et al., 2007; Currie et al., 2009; Yoshii et al., 2009, 2010; Menegazzi et al., 2012, 2013; Vanin et al., 2012; De et al., 2013; Green et al., 2015). Then, we applied an artificial regimen of 12 h of light and 12 h of dark. Light transitions, which mimic dawn and dusk, were conducted using gradual increases or decreases of light. We used a maximum light intensity of 1,000 lux (Gentile et al., 2009; Rund et al., 2011, 2013; Leming et al., 2014; Rivas et al., 2018; Hickner et al., 2019).

### Locomotor Activity Assays in Light/Dark Cycles With Simulated Dawn and Dusk

We decided to observe the locomotor activity of *Ae. aegypti* under light/dark cycles with simulated dawn and dusk (from now on considered as "gradual" LD cycle) and constant temperature—LD12:12, 25 C. The mosquitoes were kept in gradual LD cycles for 6 days. They maintained 54% of locomotor activity in the photophase (**Supplementary Figure 1A**) and showed a bimodal activity pattern with a morning peak (M peak) at dawn, and an evening peak (E peak) at dusk (**Figures 2A,C**). After 6 days, the LD cycles were interrupted, and the insects were



kept under constant darkness and temperature (DD25 C) for additional 10 days. In such conditions, the average locomotor activity apparently became unimodal with a large and broader E peak and a free-running period of approximately 22.2  $\pm$  0.87 h (**Figures 2B,C**). However, the individual profile showed that 57% of the rhythmic mosquitoes maintained the bimodality even in constant conditions (see **Supplementary Figures 2A–D** for examples of bimodal and unimodal individuals). The average activity appeared to be unimodal in free-running conditions because the M peak of bimodal individuals was much weaker than the E peak.

## Comparing Seminal and Rectangular Temperature Cycles

We then compared *Aedes* daily activity in cycles under seminal temperature conditions to those in rectangular conditions. Mosquitoes were kept in constant darkness (DD) under seminal or rectangular temperature cycles (TC) for 6 days (**Figures 3A–C**). Then, each TC was phase-delayed by 6 h and kept in this new condition for 7 days (**Figures 3, 4**).

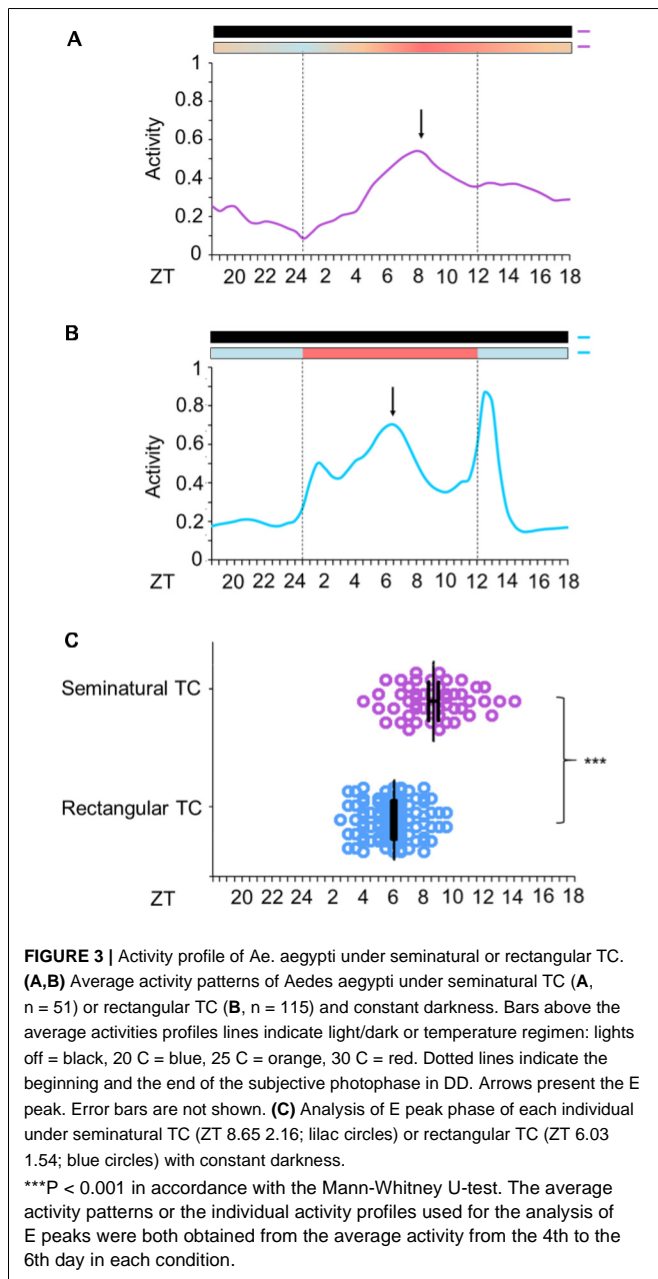
Just as the well-known rectangular TC (**Figure 3B**; Rivas et al., 2018), the seminal TC was also able to entrain the locomotor rhythms of *Ae. aegypti*. However, there were dissimilarities regarding the locomotor activity profile in each condition. Under the seminal TC, we observed a single peak of activity (E peak) that remained stable around ZT8 (**Figure 3A**). On the other hand, in the regimen of rectangular TC, the E peak occurred a little

earlier (ZT6). Moreover, a small peak is visible as soon as the warm phase starts and a strong peak following the beginning of the cold phase can be observed (**Figure 3B**). We believe that the two peaks after the temperature transitions are startle responses induced by the abrupt changes, since they are not observed when the temperature changes gradually (**Figures 3A,B**).

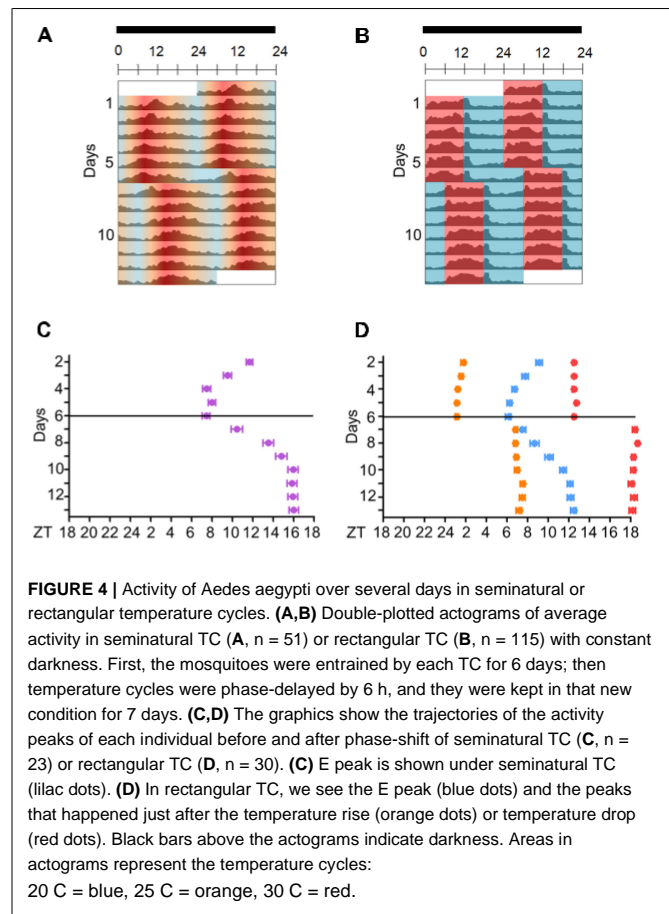
In addition, when seminal or rectangular temperature cycles were phase-delayed by 6 h, both TCs were able to re-entrain the locomotor activity. In both conditions, the phase of the main peak of activity indicated that the insects needed about 4 days to be re-entrained to the new phase (**Figure 4**). In contrast, the other two peaks immediately followed the temperature transitions after the phase-shift of rectangular TC (**Figures 4B,D**), reinforcing the assumption that they were a clock-independent response to the abrupt transitions.

Thus, a seminal temperature cycle was able to entrain the activity of *Ae. aegypti*. Our seminal TC seems to abolish the masking effects of sudden temperature transitions, and may reproduce natural daily rhythms of activity. The entrainment of the behavior are driven by the temporal changes of clock gene expression so we examined the circadian expression of *per*, *tim*, *cryptochrome 2 (cry2)*, *cyc*, *Pdp1*, *vri*, *Clk*, *E75*, and *cwo* mRNAs in the head of *Ae. aegypti* females under seminal TC with constant darkness.

The results revealed that the expression patterns are similar to those observed in previous studies for the majority of clock



genes (**Figure 5**; Gentile et al., 2009). The statistical analysis confirmed the rhythmicity of *per*, *tim*, *cry2*, *cyc*, *vri* and *Pdp1* (**Supplementary Table 2**). *per* showed a peak of expression at ZT17 and a trough at ZT5. *tim* expression is broader than *per* and exhibited a peak at ZT13 and a trough at ZT5. The expression of *cry2* showed a trough at ZT9 and two peaks; the first at ZT1 and the second at ZT17. *cyc* expression exhibited a peak at ZT1 and a trough at ZT13. *Pdp1* and *vri* also presented a cycling profile with a trough at ZT5, but the maximum expression of *vri* occurred earlier. *Pdp1* showed a peak at ZT17, while *vri* peak expression occurred at ZT9. The statistical analysis suggested that *Clk*, *E75* and *cwo* have no evident rhythmic expression in the whole head (**Figure 5** and **Supplementary Table 2**). Then, as well



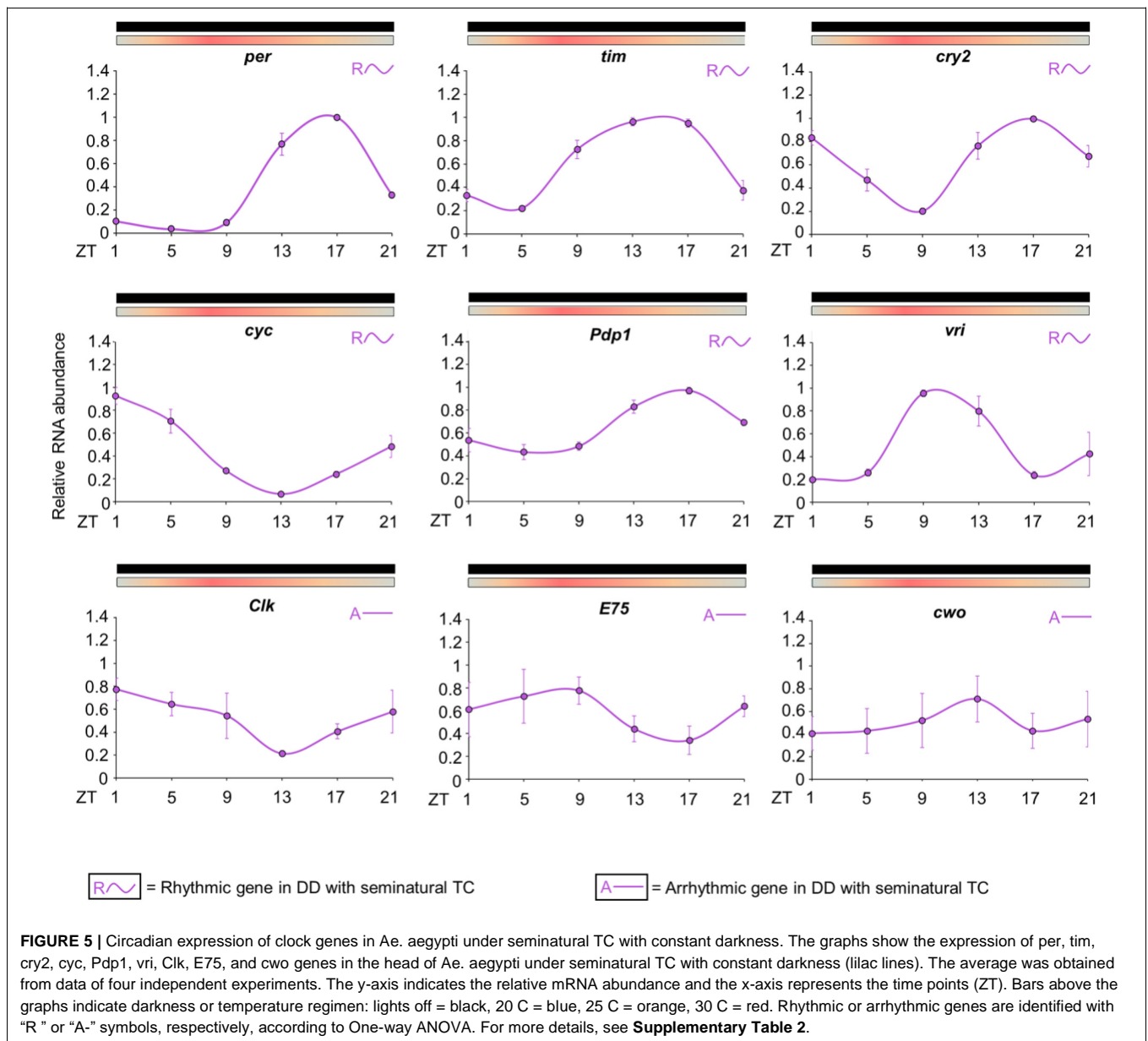
as observed in the behavioral profile, the circadian expression of clock genes in seminatural TC was not identical to what we knew in rectangular TC. To corroborate this observation, we reanalyzed the expression profile described by Rivas et al. (2018) for rectangular TC. Thus, we could compare the peak and trough expression of the clock genes in seminatural or rectangular TC (**Supplementary Tables 3, 4**. For more details, see section “Discussion”).

## Synergic Entrainment by Light/Dark and Temperature Cycles

In nature, light/dark or temperature cycles act synergistically to entrain the circadian clock (Rieger et al., 2007; Gattermann et al., 2008; Currie et al., 2009; Yoshii et al., 2009, 2010; Vanin et al., 2012; Green et al., 2015). Thus, we wondered how seminatural light/dark and temperature cycles would simultaneously entrain the circadian clock of *Aedes aegypti*. To address this question, the mosquitoes were entrained for 6 days in seminatural LD with TC combined in the same phase. On the seventh day, temperature cycles were shifted by 12 h and the mosquitoes were kept in that “out-of-phase” condition for 7 days (**Figures 6A,B**).

Under LD with in-phase TC, the mosquitoes maintained 56% of their activity during the day (**Supplementary Figure 1B**), and we could see the onset of an intense activity at ZT8. This activity progressively increases until its maximum at ZT12 (E peak). After





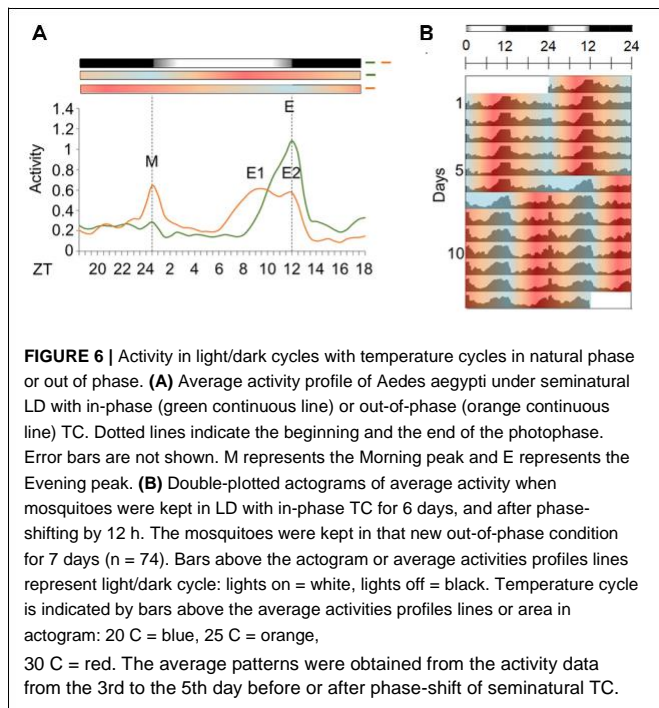
lights-off, the activity decreased and remained low throughout the dark phase. Moreover, the mosquitoes exhibited a robust E peak and an almost imperceptible M peak (**Figures 6A,B**).

A previous report showed that *Ae. aegypti* has a prominent and unexpected nocturnal activity under rectangular light/dark with out-of-phase temperature cycle (Rivas et al., 2018). We investigated if it occurred when seminatural light/dark and temperature cycles are conflicting. The results demonstrated that activity remained diurnal even in seminatural conflicting conditions (66% of activity during the photo phase, **Supplementary Figure 1C**). On the other hand, the pattern of activity changed remarkably. More specifically, there was an increase in the M peak and a decrease in the E peak, when we compared the graphs for both regimens. Furthermore, the former E peak splits into two peaks. One shifts to a little earlier,

at ZT8.5 (E1 peak), while the other remains at ZT12 (E2 peak). This made the onset of the E peak occur earlier than usual, while the offset was not modified (**Figures 6A,B**).

Our group recently showed that the circadian expression of clock genes can be modified when rectangular LD and TC are conflicting, compared to rectangular in-phase conditions (Rivas et al., 2018). We speculate whether the same expression changes would be observed under more natural conditions. Thus, we compared the circadian expression of *per*, *tim*, *cry2*, *cyc*, *Clk*, *vri*, *Pdp1*, *E75*, and *cwo* in the head of females when seminatural cycles of light/dark and temperature were combined in-phase or out-of-phase (**Figure 7**).

The statistical analysis confirmed the rhythmicity of *per*, *cry2*, *cyc*, *vri*, and *Pdp1*, while *Clk*, *E75*, and *cwo* appeared to be arrhythmic in either seminatural conditions (in-phase or



out-of-phase) (**Supplementary Table 2**). We did not observe significant differences regarding the expression profiles of *per*, *cry2*, *vri*, *Clk*, *E75*, and *cwo* under conflicting and reinforcing conditions (**Figure 7**). In both circumstances, *per* has an expression peak at ZT17 and a trough at ZT5. We noted only an increased expression at ZT21 under seminatural conflicting conditions. *per*, *cry2* and *vri* had their phase unaltered when we compared the regimens. The rhythmic abundance of *cry2* mRNA presented one peak at ZT1, another one at ZT17 and a trough at ZT9. *vri* exhibited a peak at ZT9 and a trough at ZT21 (**Figure 7**).

In contrast, the circadian expression of *cyc* and *Pdp1* was phase-shifted. *cyc* transcription presented a trough at ZT13 and a peak at ZT5 when the insects were under seminatural LD with in-phase TC. In seminatural conflicting conditions, *cyc* rhythmic abundance remained with a trough at ZT13, but advanced its peak to ZT1. The circadian expression of *Pdp1* was phase-delayed under the out-of-phase regimen compared to in-phase conditions. *Pdp1* mRNA exhibited a peak at ZT17 and a trough at ZT5 under seminatural LD with in-phase TC. When LD and TC were out-of-phase, *Pdp1* showed a peak at ZT21 and a trough at ZT9 (**Figure 7**).

However, *tim* expression shows the most dramatic changes under the different conditions. When the mosquitoes were under seminatural LD with in-phase TC, *tim* showed a peak at ZT13 and a trough at ZT5. Though, *tim* rhythmic expression was completely abolished under seminatural LD with out-of-phase TC (**Figure 7**).

## *nocte* and the Entrainment by Temperature Cycles in Mosquitoes

Since seminatural temperature cycles could directly affect the circadian clock of *Ae. aegypti*, we wondered which input pathways

are responsible for entraining the mosquito clock oscillators by temperature cycles. One possible candidate is *nocte*. As already mentioned, this gene is pivotal for the entrainment by temperature cycles and for the functionality of the chordotonal organs in *D. melanogaster* (Sehadova et al., 2009; Chen et al., 2018). Therefore, we decided to evaluate the role of *nocte* in temperature entrainment using RNA interference.

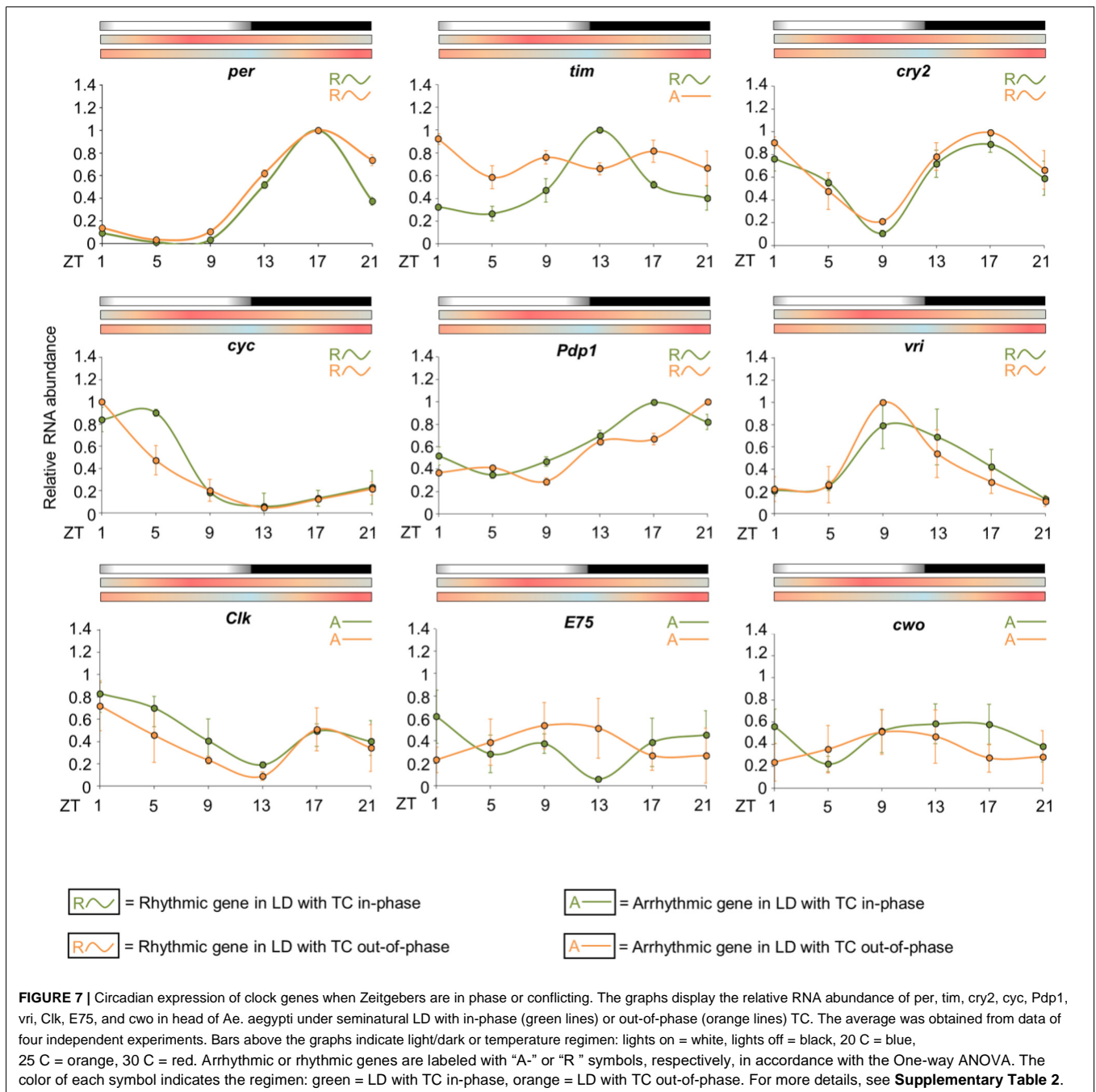
Before confirming the silencing of *nocte*, we carefully analyzed its expression profile in uninjected mosquitoes. *nocte* expression was arrhythmic in the head and in the body under the conditions to which the mosquitoes were subjected, i. e., LD with out-of-phase TC (**Figures 8A,B**). It was also observed in the head of under LD or DD with constant temperatures (Leming et al., 2014). Next, we compared mosquitoes injected with *dsnocte* to the control group (*dsLacZ*) on the fourth day after injection at ZT21. We confirmed the efficacy of the RNAi in reducing *nocte* expression in the body (Student's *t*-test,  $t = 5.8$ ;  $p < 0.05$ ), but not in the head (Student's *t*-test,  $t = 0.37$ ;  $p = 0.74$ ) of mosquitoes injected with *nocte* dsRNA (**Figure 8C**).

Subsequently, we evaluated the activity of mosquitoes injected with *nocte* or *LacZ* dsRNAs under seminatural LD with out-of-phase TC. This regimen might reveal how the silencing of *nocte* could affect the amplitude of activity and onset of the E peak, two characteristics highly influenced by seminatural temperature cycles in *Ae. aegypti* (**Figure 6A**). Both groups remained with a diurnal profile, since there was 59 or 61% of activity in photophase for mosquitoes injected with *LacZ* dsRNA or *nocte* dsRNA, respectively (**Supplementary Figures 1D,E**). The mosquitoes injected with *nocte* dsRNA exhibited the same offset of the E peak as those injected with *LacZ* dsRNA (**Figure 9**). The onset of the E peak was not modified either, although there was a greater individual variability in the group injected with *nocte* dsRNA (data not shown). On the other hand, the amplitude of activity was reduced in silenced mosquitoes (**Figure 9**).

*nocte* and chordotonal organs may be crucial to the entrainment by temperature cycles of *Ae. aegypti*, but how would the chordotonal organs communicate with the central pacemaker? We investigated this by comparing the circadian expression of *per*, *tim*, *cry2*, *cyc*, *Clk*, *vri*, *Pdp1*, *E75*, and *cwo* in the head of females injected with dsRNA of *nocte* or *LacZ* under seminatural LD with out-of-phase TC.

Interestingly, the expression profile of clock genes was very similar in both groups, with the exception of *tim*. The statistical analysis confirmed rhythmicity of *per*, *cry2*, *cyc*, *vri*, and *Pdp1*, whereas *Clk*, *E75* and *cwo* were arrhythmic in mosquitoes injected with *LacZ* dsRNA and in those injected with *nocte* dsRNA (**Supplementary Table 2**). In both groups, *per* and *Pdp1* presented a peak at ZT17 and a trough at ZT5. The *cry2* gene had a trough at ZT9 and showed two peaks at ZT1 and ZT17. *cyc* exhibited a peak at ZT5 and trough at ZT13, and *vri* presented a peak at ZT9 and a trough at ZT21 (**Figure 10**). It is worth noting that the mosquitoes injected with *nocte* dsRNA were able to present a rhythmic expression for *tim* even in LD with out-of-phase TC, while the mosquitoes injected with *dsLacZ* lost rhythmicity. The gene *tim* exhibited a peak at ZT9 and a trough at ZT21 when *nocte* was





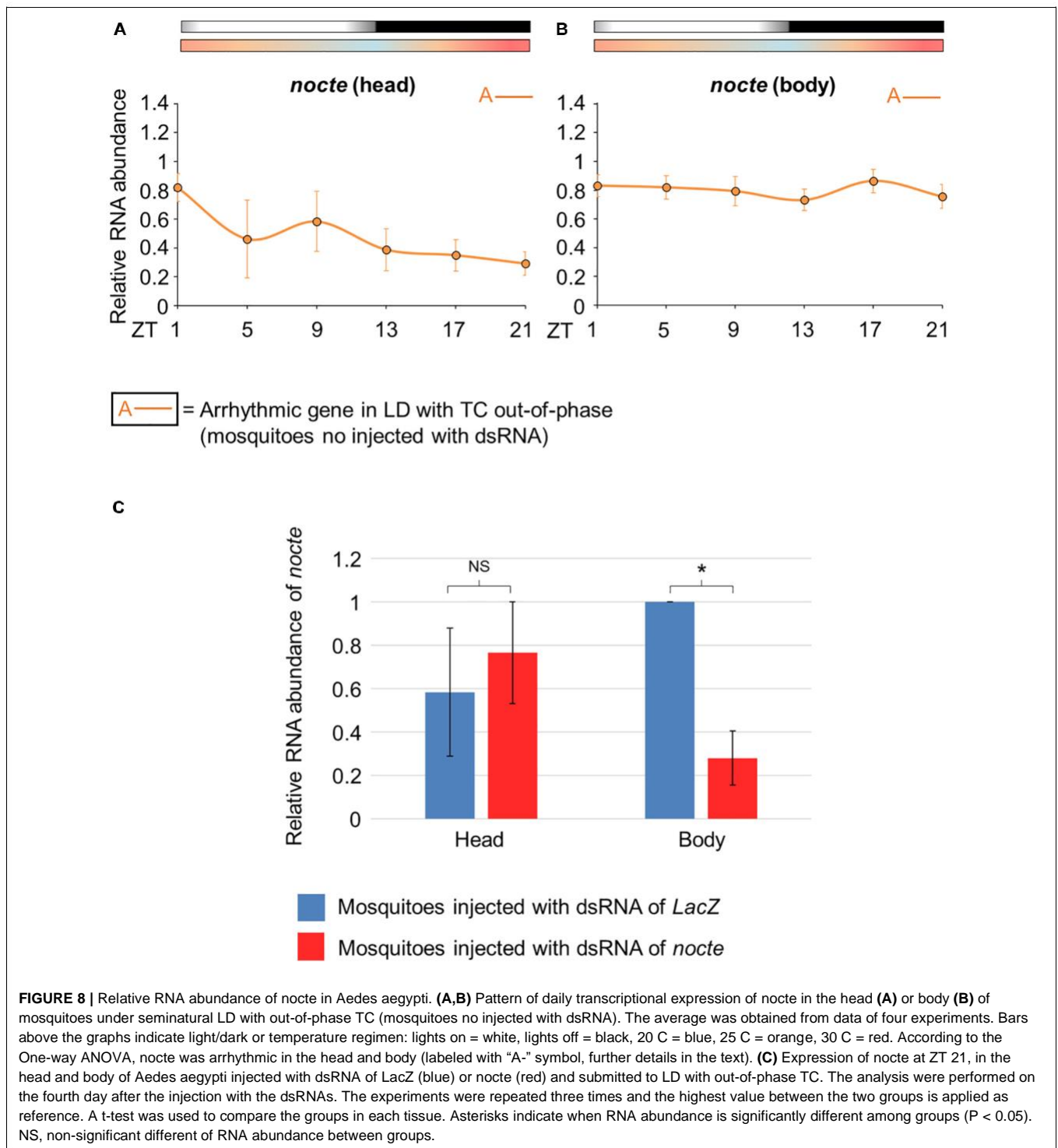
silenced (**Figure 10**). This was a further indication that *tim* could be crucial for the entrainment of the circadian clock by temperature cycles.

## DISCUSSION

For decades, the behavior of insect vectors, like mosquitoes have been conducted in the field, where a correlation between the capture rates and the activity at a particular time was established (reviewed by Clements, 1999; Saunders, 2002; Taya

et al., 2016). Although those studies contributed significantly to our current knowledge, they had some limitations and one of them was the population density throughout the year. In addition, with such methodological approaches, the average activity of a population could conceal individual variations and it would be more difficult to investigate the entrainment by each *Zeitgeber* individually.

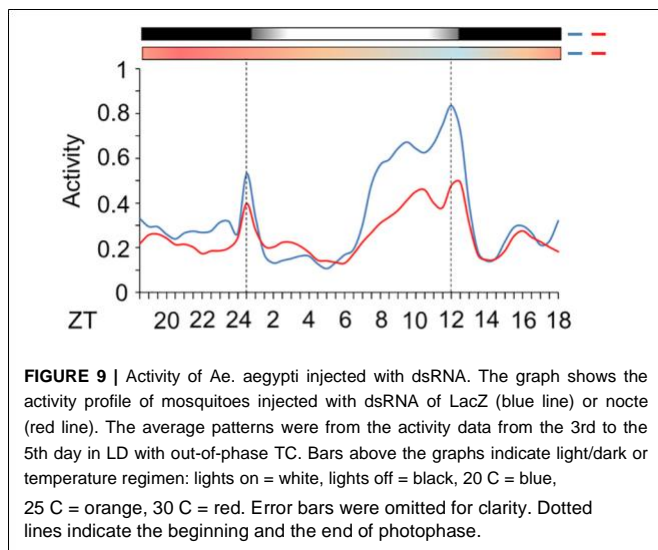
In order to mitigate these problems, several techniques were developed to evaluate individual mosquito activity in the laboratory (Taylor and Jones, 1969; Jones, 1981; Gentile et al., 2009; Padilha et al., 2018). However, the majority of



studies were conducted in light/dark conditions with constant temperature. In addition, in the reports in which the activity of mosquitoes in temperature cycles was evaluated, such conditions were conducted using cycles with abrupt changes of temperature (Rivas et al., 2018; Upshur et al., 2019). In this study, we simulated the gradual increase or decrease of light at dawn and dusk, and standardized a seminatural regimen to be used in laboratory

conditions, which would be as close as possible to the natural temperature cycles of Rio de Janeiro (**Figures 1A,B**).

We noticed that female *Ae. aegypti*, which were kept in a simulated dawn and dusk LD conditions, sustained their diurnal behavioral rhythms with morning and evening peaks of activity (**Figures 2A,C**). This pattern is similar to what has been seen for locomotor activity of *Ae. aegypti* in LD with abrupt changes



of light (Gentile et al., 2009). Observing the activity of these mosquitoes in simulated dawn and dusk LD is relevant since in *D. melanogaster* the moments of light transition presumably are the most critical hours of the day for the synchronization. For instance, pulses of light coinciding with these moments are enough to entrain activity rhythms of *D. melanogaster* (Pittendrigh, 1964; Sheppard et al., 2014). In a simulation of dawn and dusk with their respective gradual changes of light intensity, the flies adjust their morning and evening peaks of activity when the light is close to 7.5 lux. Furthermore, gradual transitions at dawn and dusk eliminate the undesirable startle responses induced by the abrupt changes in rectangular light/dark cycles (Rieger et al., 2007; Yoshii et al., 2009).

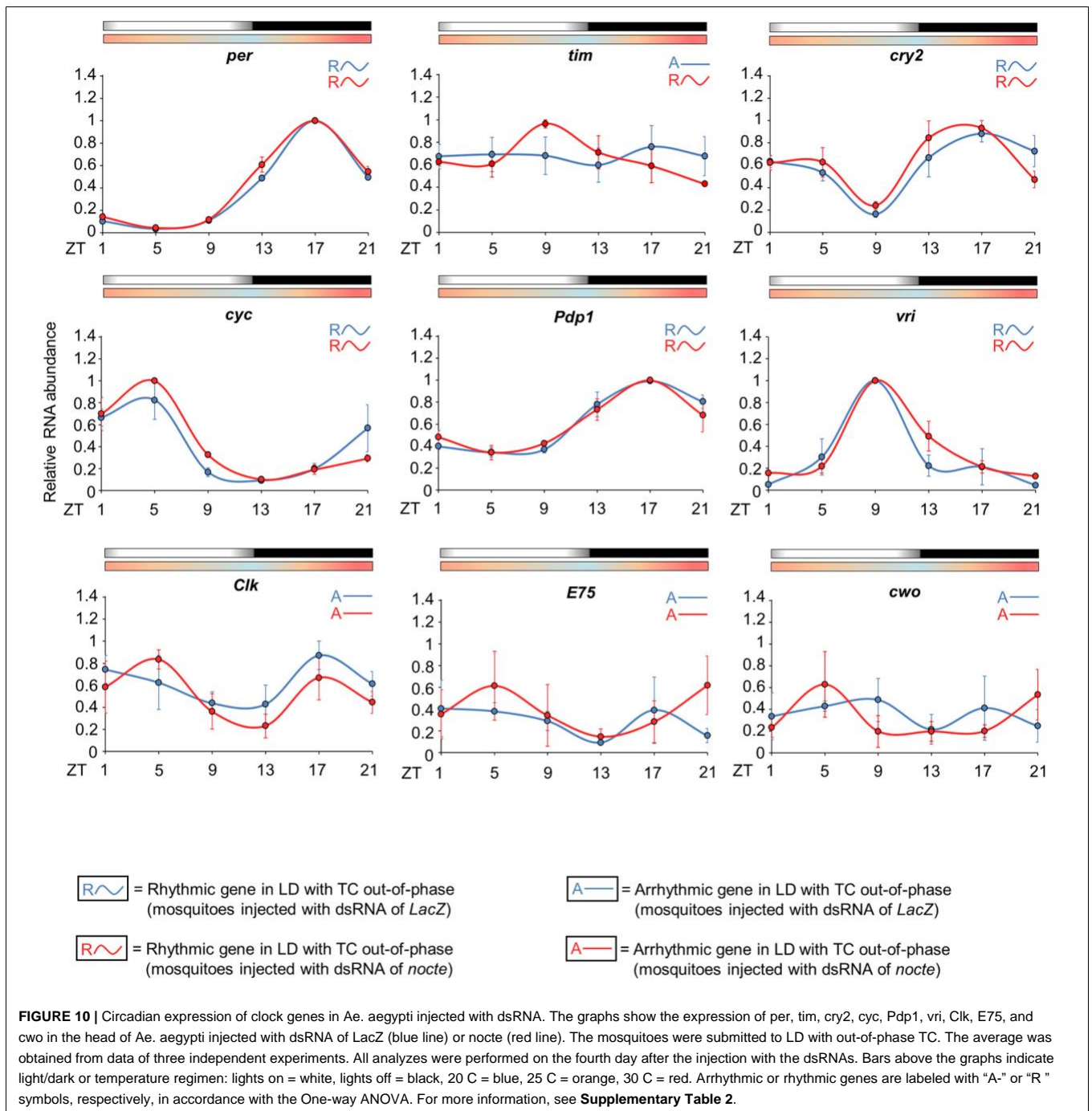
Thus, as in *Drosophila*, we noticed that the gradual LD used could yield the characteristic bimodality pattern in *Aedes*. After this regimen, the period of activity in constant conditions was very much like the period of locomotor and flight activities of female *Ae. aegypti* in DD (Taylor and Jones, 1969; Jones, 1981; Gentile et al., 2009; **Figures 2B,C**). In addition, we observed that about half of the individuals presented a bimodal activity pattern even in DD. This proportion had also been found in virgin females of *D. melanogaster* (Canton-S strain) (Helfrich-Forster, 2000). Curiously, the studies that investigated the locomotor and flight activities of female *Ae. aegypti* described a unimodal pattern in DD (Taylor and Jones, 1969; Jones, 1981; Gentile et al., 2009). We suppose there are two possible reasons for this. Firstly, the authors of the previous studies probably did not observe a bimodal profile because their analysis was focused on the evaluation of the activity patterns of the mosquito based on actograms or graphs using the mosquito average activity, which is similar to our average activity pattern that is also unimodal (**Figures 2B,C**). Secondly, as in previous conditions, the days preceding the constant darkness were rectangular LDs (Taylor and Jones, 1969; Jones, 1981; Gentile et al., 2009) and here we simulated dusk and dawn days before transferring the mosquitoes to DD, we do not rule out the hypothesis that the bimodal activity in DD observed by us is influenced by the gradual LD.

In order to understand how seminatural temperature cycles could affect the activity and clock gene expression in *Ae. aegypti*, we combined seminatural TC with constant darkness conditions. This was sufficient to entrain activity as it normally occurs under the traditional rectangular temperature cycles, but with the benefit of not producing the artifacts (masking) after abrupt changes of temperature. Regarding the activity peaks, unlike *D. melanogaster* (Yoshii et al., 2009; Bywalez et al., 2012), we did not observe a clear indication of the M peak in mosquitoes subjected to seminatural or rectangular temperature cycles with constant darkness (**Figures 3A,B, 4**). We also observed that the E peak occurred at a different time in seminatural TC in comparison to the rectangular TC (**Figures 3A–C, 4**). This peak occurs earlier in rectangular TC (ZT6) than in seminatural TC (ZT8), while it is coinciding under gradual LD conditions (ZT12) or rectangular LD conditions (ZT12) (**Figures 3A–C, 4**; Gentile et al., 2009).

It is also important to note that the E peak is controlled by clock synchronization effect and it is not just a masking in LD. This is because the phase of this peak persists quite similarly in the early days of DD, compared to activity when mosquitoes were in LD (**Figures 2A–C**, for more details of classic chronobiology protocols, see Clements, 1999). Therefore, considering that the E peak is under circadian control, we come to believe that LD and seminatural TC promote clock synchronization with greater synergy than LD and rectangular TC. This was supported by our molecular results. We carefully compared the phases of peak and trough among the genes analyzed in DD with seminatural TC (**Figure 5**), rectangular LD with constant temperature (Gentile et al., 2009), and DD with rectangular TC (Rivas et al., 2018). Most of their phases in seminatural TC were similar to LD. In contrast, the majority of those under rectangular TC regimens were different from those under LD conditions (**Supplementary Tables 3, 4**). In addition, gene expression appeared to occur earlier in rectangular TC than in seminatural TC. This would probably justify the advance of activity in rectangular TC (**Figure 3** and **Supplementary Tables 3, 4**).

We also observed that the M peak had low amplitude in the gradual LD with seminatural TC (**Figures 6A,B**). Thus, morning temperatures of about 20 C tend to inhibit the M peak of activity. It should be remembered that the seminatural TC cycles we produced represent mean variations found during the equinoxes in Rio de Janeiro. However, during the winter the minimum temperature in Rio de Janeiro falls below 20 C, while during the summer it remains almost always above these levels (according to the INMET meteorological measurements). Therefore, it seems very likely that these mosquitoes present a bimodal pattern of activity in the summer and a crepuscular profile in the winter of Rio de Janeiro. Similar to what we speculated about Rio de Janeiro, Suwannachote et al. (2009) collected less *Ae. aegypti* in the field, in the early hours of winter mornings, in a region of Thailand where the minimum temperatures are approximately 21 C.

To better assess the influence of gradual LD with seminatural TC cycles, we subjected mosquitoes to these out-of-phase environmental indicators (**Figures 6A,B**). Under these conditions, we observed both an increase of the M peak and a



decrease of the E peak, in comparison to the LD with in-phase TC. It reinforces the importance of temperature cycles on the amplitude of activity peaks. However, the activity of *Ae. aegypti* remained diurnal even in seminatural conflicting conditions (**Supplementary Figure 1C**), different from what was observed in rectangular conflicting conditions (Rivas et al., 2018).

In rectangular LD with out-of-phase TC we had used the same maximum and minimum temperatures as in seminatural LD with out-of-phase TC (30 and 20 C, respectively). It was expected that, as a diurnal species, *Ae. aegypti* had a preference

to be more active during the photophase. However, in this rectangular conflicting condition, the mosquitoes were exposed to 20 C during the entire photophase and it may be the reason why the daily activity of *Ae. aegypti* changed from the photophase to scotophase: as an "escape" from the low temperatures of the photophase (Rivas et al., 2018).

On the other hand, when the mosquitoes were in seminatural conflicting conditions, the minimum temperature (20 C) that normally inhibits their activity did not remain constant during 12 h. It momentarily reached this value—specifically



at ZT12—which was the time of occurrence of the E peak (Figures 6A,B). Interestingly, we observed that the E peak was split into two peaks (E1 and E2 peaks). E1 advanced to ZT8.5, and E2 remained at ZT12. Consequently, the onset of the E peak occurred earlier (Figures 6A,B). Wild-type fruit flies show a similar advanced profile in LD with seminatural out-of-phase TC, but arrhythmic mutant flies did not, suggesting that the advance of evening activity onset is a clock-dependent response in *Drosophila* (Currie et al., 2009).

Based on the studies on clock genes in *Ae. aegypti* conducted by our group (Gentile et al., 2009; Rivas et al., 2018), we compared the recent results to different regimens (Supplementary Tables 3, 4). The mosquitoes seem to anticipate the phase of expression of several clock genes in the rectangular temperature cycles conditions (square symbols). This reinforces that the rectangular temperature cycles may not reflect what occurs in nature. Then, we have some questions about current research with *Ae. aegypti*. We remember that the clock of this mosquito can control several genes involved in growth, development, oviposition, immunity, response to insecticides, among other phenotypes (Ptitsyn et al., 2011; Leming et al., 2014). Thus, perhaps the use of the seminatural conditions we proposed could guarantee results in lab conditions that are closer to what occurs in the environment for several search fields.

Additionally, very little is known about the molecular pathways that lead to synchronization by temperature cycles in insects. In this study, even with the methodological limitations of using mosquitoes as a model of study, we suggest that one core clock gene plays a role in the synchronization by the temperature cycles: *timeless*. In LD with constant temperature, *tim* presented an expression peak at ZT13 (with a borderline statistical difference) (Supplementary Table 3; Gentile et al., 2009). Conversely, in DD with rectangular TC, the expression peak of this gene occurred at ZT9 (Supplementary Table 3; Rivas et al., 2018). In LD with TC out of phase, the temperature cycles start at ZT12 (here we take the lights on as a reference for ZT0). This means that in rectangular LD with TC out of phase, while the LD cycles “advised” the clock that the peak of *tim* must occur at ZT13, the temperature cycles synchronize to the ZT21 (12 C 9). Interestingly, the peak of *tim* in rectangular LD with TD out of phase occurred at ZT17, an intermediate time for the pressure of the two oscillators (Rivas et al., 2018).

We saw a different scenario in seminatural cycles. In DD with seminatural TC, as well as in LD with constant temperature, *tim* has a peak of expression at ZT13 (Figure 5 and Supplementary Table 3; Gentile et al., 2009). This is equivalent to saying that, in LD with seminatural TC out of phase, the two oscillators exert forces at perfectly antagonistic times. In other words, while the LD cycles would synchronize the *tim* peak at ZT13, the temperature cycles would adjust the peak at ZT1 (12 C 13). Just because there is a “tug-of-war” of similar forces, *tim* becomes arrhythmic in LD with seminatural TC out of phase (Figure 7 and Supplementary Table 3). However, when we did the knockdown of *nocte*, *tim* not only returned to being rhythmic but also showed a peak of expression in the ZT9. That is, with the reduction of *nocte*, the expression of this gene was closer to the synchronization exerted by the LD cycles (ZT13), than by

the temperature cycles (ZT1). This strongly suggests that *nocte* has an important role in the synchronization by temperature cycles, especially on the expression of *tim* in *Ae. aegypti*. This would be similar to removing *Cry* in *Drosophila* during light/dark with temperature cycles out of phase, which made the flies follow the temperature regime rather than becoming arrhythmic (Harper et al., 2016).

Curiously, the silencing of *tim* via dsRNA affected the activity of *Aedes* (Gentile et al., 2009; Gentile et al., 2013). In *Drosophila*, the alternative splicing of *tim* has been implicated in behavioral adaptation to seasonal temperature changes (Boothroyd et al., 2007; Montelli et al., 2015). Thus, future studies about possible RNA isoforms of *tim* in *Aedes* may be an interesting line of research to understand the circadian clock of these mosquitoes.

In addition to what was observed for *tim*, we also highlight the importance of the *nocte* gene. Here, we show that *nocte* affects the levels of activity in these vectors (Figure 9). Interestingly, the silencing of *nocte* via dsRNA caused a reduction in the expression of this gene in the body, but not in the head, which was enough to affect behavior (Figures 8, 9). Curiously, in *Drosophila* different neurons of the circadian pacemaker can synchronize to temperature cycles, but in isolated brains this response does not occur, since the information is passed through the peripheral organs (Sehadova et al., 2009). The main structure capable of perceiving the thermal variations and transmitting it to the other peripheral oscillators are the chordotonal organs (Sehadova et al., 2009). As mentioned, a mutation in *nocte* causes structural and functional changes in the ChOs of *Drosophila*, hindering the synchronization of gene expression and activity by temperature cycles (Glaser and Stanewsky, 2005; Sehadova et al., 2009; Chen et al., 2018). Thus, since our injection of *nocte* dsRNA did not cause a reduction in the expression of this gene in the head of *Aedes*—only in the body—the peripheral tissues are probably crucial for the synchronization by temperature cycles through *nocte* in these mosquitoes, as occurs in *Drosophila*.

Chen et al. (2018) reported that, in *Drosophila*, *nocte* mutants show normal levels of DD rhythmicity after LD entrainment in constant temperature, but reduced DD rhythmicity after temperature entrainment. Thus, we agree that the analysis of the behavior of these mosquitoes in constant condition to estimate the free-running period and level of rhythmicity would be interesting for us to better understand the role of *nocte* in *Ae. aegypti*. However, RNAi is the method most often used in mosquitoes for functional analysis of the genes of interest but does not allow a prolonged knockdown for a considerable number of days (Gentile et al., 2013). Therefore, unfortunately, it would not be possible to estimate how the elimination of *nocte* affects *Aedes* in DD with RNAi. Future studies that use techniques such as CRISPR/Cas9 will probably be able to answer our questions. Even though, here, the role of *nocte* for the entrainment was not fully explored due to the limitations of the technique, the only condition used (LD with TC out of phase) was sufficient to reveal interesting effects of *nocte* gene knockdown on behavior (reduction of amplitude on activity) and gene expression (*tim* rhythmic expression is rescued in *nocte*-depleted mosquitoes). These results are solid in the sense of showing the importance of *nocte* for the temperature

perception in mosquitoes and suggest that the role of this gene is conserved between these insects and fruit flies. Lastly, the scientific community has been speculating on the influence of temperature on the behavior of mosquitoes for decades (Clements, 1999). In this study, we finally present candidate genes that were influenced by temperature cycles and affect *Aedes* activity: *timeless* and *nocte*. Therefore, we believe that further studies involving the role of these genes in mosquitoes under different physiological conditions can contribute significantly to reveal important epidemiological aspects of these vectors.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

RT, GR, RB, and AP: conceptualization and design of study. RT, GR, and RB: performance, formal analysis, writing, revision, and editing. RT: writing original draft. RB: supervision. RB and AP: funding acquisition. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## REFERENCES

- Boothroyd, C. E., Wijnen, H., Naef, F., Saez, L., and Young, M. W. (2007). Integration of light and temperature in the regulation of circadian gene expression in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 3:e54. doi: 10.1371/journal.pgen.0030054
- Busza, A., Emery-Le, M., Rosbash, M., and Emery, P. (2004). Roles of the two *Drosophila* CRYPTOCHROME structural domains in circadian photoreception. *Science* 304, 1503–1506. doi: 10.1126/science.1096973
- Bywalez, W., Menegazzi, P., Rieger, D., Schmid, B., Helfrich-Förster, C., and Yoshii, T. (2012). The dual-oscillator system of *Drosophila melanogaster* under natural-like temperature cycles. *Chronobiol. Int.* 29, 395–407. doi: 10.3109/07420528.2012.668505
- Chen, C., Xu, M., Anantaprakorn, Y., Rosing, M., and Stanewsky, R. (2018). *nocte* is required for integrating light and temperature inputs in circadian clock neurons of *Drosophila*. *Curr. Biol.* 28, 1595–1605. doi: 10.1016/j.cub.2018.04.001
- Clements, A. N. (1999). *The Biology of Mosquitoes Vol. 2: Sensory Reception and Behaviour*. New York: CABI Publishing.
- Currie, J., Goda, T., and Wijnen, H. (2009). Selective entrainment of the *Drosophila* circadian clock to daily gradients in environmental temperature. *BMC Biol.* 7:49. doi: 10.1186/1741-7007-7-49
- De, J., Varma, V., Saha, S., Sheeba, V., and Sharma, V. K. (2013). Significance of activity peaks in fruit flies, *Drosophila melanogaster*, under seminatural conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 8984–8989. doi: 10.1073/pnas.1220960110
- Dissel, S., Codd, V., Fedic, R., Garner, K. J., Costa, R., Kyriacou, C. P., et al. (2004). A constitutively active cryptochrome in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Neurosci.* 7, 834–840. doi: 10.1038/nn1285
- Emery, P., So, W. V., Kaneko, M., Hall, J. C., and Rosbash, M. (1998). CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95, 669–679. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81637-2
- Gattermann, R., Johnston, R. E., Yigit, N., Fritzsche, P., Larimer, S., Ozkurt, S., et al. (2008). Golden hamsters are nocturnal in captivity but diurnal in nature. *Biol. Lett.* 4, 253–255. doi: 10.1098/rsbl.2008.0066

## FUNDING

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001. It was also supported by Howard Hughes Medical Institute (# 55005956) and CNPq (# 477367/2010-0 and 401857/2014-0).

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Maria I. L. Bersot and Robson C. da Silva for the technical support; Dr. Charalambos Kyriacou (University of Leicester) for critical reading of the manuscript; Drs. Luciana Araripe and Alejandra S. Araki (IOC/FIOCRUZ) for the results analysis. We also thank CNPq, FAPERJ and FIOCRUZ for the financial support to RT, GR, AP, and RB.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2020.614722/full#supplementary-material>

- Gentile, C., Rivas, G. B. S., Lima, J. B. P., Bruno, R. V., and Peixoto, A. A. (2013). Circadian clock of *Aedes aegypti*: effects of blood-feeding, insemination and RNA interference. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 80–87. doi: 10.1590/0074-0276130471
- Gentile, C., Rivas, G. B. S., Meireles-Filho, A. C., Lima, J. B. P., and Peixoto, A. A. (2009). Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: *cry2* is different. *J. Biol. Rhythms* 24, 444–451. doi: 10.1177/0748730409349169
- Glaser, F. T., and Stanewsky, R. (2005). Temperature synchronization of the *Drosophila* circadian clock. *Curr. Biol.* 15, 1352–1363. doi: 10.1016/j.cub.2005.06.056
- Green, E. W., O'Callaghan, E. K., Hansen, C. N., Bastianello, S., Bhutani, S., Vanin, S., et al. (2015). *Drosophila* circadian rhythms in seminatural environments: Summer afternoon component is not an artifact and requires TrpA1 channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 8702–8707. doi: 10.1073/pnas.1506093112
- Hardin, P. E. (2011). Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. *Adv. Genet.* 74, 141–173. doi: 10.1016/B978-0-12-387690-4.00005-2
- Harper, R. E. F., Dayan, P., Albert, J. T., and Stanewsky, R. (2016). Sensory conflict disrupts activity of the *Drosophila* circadian network. *Cell Rep.* 17, 1711–1718. doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.029
- Helfrich-Forster, C. (2000). Differential control of morning and evening components in the activity rhythm of *Drosophila melanogaster* - sex-specific differences suggest a different quality of activity. *J. Biol. Rhythms* 15, 135–154. doi: 10.1177/074873040001500208
- Hickner, P. V., Mori, A., Rund, S. S. C., Sheppard, A. D., Cunningham, J. M., Chadee, D. D., et al. (2019). QTL determining diel flight activity in male *Culex pipiens* mosquitoes. *J. Hered.* 110, 310–320. doi: 10.1093/jhered/esz003
- Jones, M. D. R. (1981). The programming of circadian flight-activity in relation to mating and the gonotrophic cycle in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Physiol. Entomol.* 6, 307–313. doi: 10.1111/j.1365-3032.1981.tb00275.x
- Leming, M. T., Rund, S. S., Behura, S. K., Duffield, G. E., and O'Tousa, J. E. (2014). A database of circadian and diel rhythmic gene expression in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *BMC Genomics* 15:1128. doi: 10.1186/1471-2164-15-1128

- Lin, F. J., Song, W., Meyer-Bernstein, E., Naidoo, N., and Sehgal, A. (2001). Photoc signaling by cryptochrome in the *Drosophila* circadian system. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7287–7294. doi: 10.1128/MCB.21.21.7287-7294.2001
- Liu, X., Yu, Q. A., Huang, Z. S., Zwiebel, L. J., Hall, J. C., and Rosbash, M. (1991). The strength and periodicity of *D. melanogaster* circadian rhythms are differentially affected by alterations in period gene expression. *Neuron* 6, 753–766. doi: 10.1016/0896-6273(91)90172-V
- Menegazzi, P., Vanin, S., Yoshii, T., Rieger, D., Hermann, C., Dusik, V., et al. (2013). *Drosophila* clock neurons under natural conditions. *J. Biol. Rhythms* 28, 3–14. doi: 10.1177/0748730412471303
- Menegazzi, P., Yoshii, T., and Helfrich-Förster, C. (2012). Laboratory versus nature: the two sides of the *Drosophila* circadian clock. *J. Biol. Rhythms* 27, 433–442. doi: 10.1177/0748730412463181
- Montelli, S., Mazzotta, G., Vanin, S., Caccin, L., Corrà, S., De Pittà, C., et al. (2015). period and timeless mRNA splicing profiles under natural conditions in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms* 30, 217–227. doi: 10.1177/0748730415583575
- Padiilha, K. P., Resck, M. E. B., Cunha, O. A. T. D., Teles-de-Freitas, S. S., Campos, M. H. F., Sorgine, R., et al. (2018). Zika infection decreases *Aedes aegypti* locomotor activity but does not influence egg production or viability. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113:e180290. doi: 10.1590/0074-02760180290
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- Pittendrigh, C. S. (1964). The entrainment of circadian oscillations by skeleton photoperiods. *Science* 144:565. doi: 10.1126/science.144.3618.565-b
- Ptitsyn, A. A., Reyes-Solis, G., Saavedra-Rodriguez, G. K., Betz, J., Suchman, E. L., Carlson, J. O., et al. (2011). 4th. Rhythms and synchronization patterns in gene expression in the *Aedes aegypti* mosquito. *BMC Genomics* 12:153. doi: 10.1186/1471-2164-12-153
- Rieger, D., Fraunholz, C., Popp, J., Bichler, D., Dittmann, R., and Helfrich-Förster, C. (2007). The fruit fly *Drosophila melanogaster* favors dim light and times its activity peaks to early dawn and late dusk. *J. Biol. Rhythms* 22, 387–399. doi: 10.1177/0748730407306198
- Rivas, G. B., Bauzer, L. G., and Meireles-Filho, A. C. (2016). "The environment is everything that isn't me": molecular mechanisms and evolutionary dynamics of insect clocks in variable surroundings. *Front. Physiol.* 6:400. doi: 10.3389/fphys.2015.00400
- Rivas, G. B. S., Teles-de-Freitas, R., Pavan, M. G., Lima, J. B. P., Peixoto, A. A., and Bruno, R. V. (2018). Effects of light and temperature on daily activity and clock gene expression in two mosquito disease vectors. *J. Biol. Rhythms* 33, 272–288. doi: 10.1177/0748730418772175
- Rund, S. S., Bonar, N. A., Champion, M. M., Ghazi, J. P., Houk, C. M., Leming, M. T., et al. (2013). Daily rhythms in antennal protein and olfactory sensitivity in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Sci. Rep.* 3:2494. doi: 10.1038/srep02494
- Rund, S. S., Ward, S. M., Collins, F. H., and Duffield, G. E. (2011). Genome-wide profiling of diel and circadian gene expression in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, E421–E430. doi: 10.1073/pnas.1100584108
- Saunders, D. S. (2002). *Insect Clocks*, 3rd Edn. Amsterdam: Elsevier.
- Schmid, B., Helfrich-Förster, C., and Yoshii, T. (2011). A new ImageJ plug-in "ActogramJ" for chronobiological analyses. *J. Biol. Rhythms* 26, 464–467. doi: 10.1177/0748730411414264
- Sehadova, H., Glaser, F. T., Gentile, C., Simoni, A., Giesecke, A., Albert, J. T., et al. (2009). Temperature entrainment of *Drosophila's* circadian clock involves the gene nocte and signaling from peripheral sensory tissues to the brain. *Neuron* 64, 251–266. doi: 10.1016/j.neuron.2009.08.026
- Sheppard, A. D., Hirsch, H. V. B., and Possidente, B. (2014). Novel masking effects of light are revealed in *Drosophila* by skeleton photoperiods. *Biol. Rhythm Res.* 46, 275–285. doi: 10.1080/09291016.2014.985004
- Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, B. K., Kay, S. A., et al. (1998). The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95, 681–692. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81638-4
- Suwannachote, N., Grieco, J. P., Achee, N. L., Suwonkerd, W., Wongtong, S., and Chareonviriyaphap, T. (2009). Effects of environmental conditions on the movement patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) into and out of experimental huts in Thailand. *J. Vector Ecol.* 34, 267–275. doi: 10.1111/j.1948-7134.2009.00035.x
- Taye, B., Lelisa, K., Emanu, D., Asale, A., and Yewhalaw, D. (2016). Seasonal dynamics, longevity, and biting activity of *Anopheles* mosquitoes in Southwestern Ethiopia. *J. Insect. Sci.* 16:6. doi: 10.1093/jisesa/iev150
- Taylor, B., and Jones, M. D. R. (1969). The circadian rhythm of flight activity in the mosquito *Aedes aegypti* (L.). The phase-setting effects of light-on and light-off. *J. Exp. Biol.* 51, 59–70. . https://jeb.biologists.org/content/51/1/59.long.,
- Upshur, I. F., Bose, E. A., Hart, C., and Lahondère, C. (2019). Temperature and sugar feeding effects on the activity of a laboratory strain of *Aedes aegypti*. *Insects* 10:347. doi: 10.3390/insects10100347
- Vanin, S., Bhutani, S., Montelli, S., Menegazzi, P., Green, E. W., Pegoraro, M., et al. (2012). Unexpected features of *Drosophila* circadian behavioural rhythms under natural conditions. *Nature* 484, 371–375. doi: 10.1038/nature10991
- Yang, Y. Y., Liu, Y., Teng, H. J., Sauman, I., Sehna, F., and Lee, H. J. (2010). Circadian control of permethrin-resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 56, 1219–1223. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.03.028
- Yoshii, T., Hermann, C., and Helfrich-Förster, C. (2010). Cryptochrome-positive and -negative clock neurons in *Drosophila* entrain differentially to light and temperature. *J. Biol. Rhythms* 25, 387–398. doi: 10.1177/0748730410381962
- Yoshii, T., Vanin, T., Costa, R., and Helfrich-Förster, C. (2009). Synergic entrainment of *Drosophila's* circadian clock by light and temperature. *J. Biol. Rhythms* 24, 452–464. doi: 10.1177/0748730409348551

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

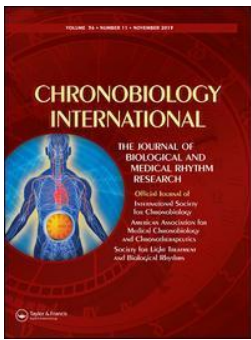
Copyright © 2020 Teles-de-Freitas, Rivas, Peixoto and Bruno. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

### **3.1 – Artigo 2**

**Artigo 2: Off with their heads: analysis of the circadian clock genes expression in the body of *Aedes aegypti*.**

Autores: Rayane Teles-de-Freitas, Liliane Barboza & Rafaela Vieira Bruno





# Chronobiology International

The Journal of Biological and Medical Rhythm Research

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/icbi20>

## Off with their heads: analysis of the circadian clock genes expression in the body of *Aedes aegypti*

Rayane Teles-de-Freitas, Liliane Barboza & Rafaela V. Bruno

To cite this article: Rayane Teles-de-Freitas, Liliane Barboza & Rafaela V. Bruno (2021): Off with their heads: analysis of the circadian clock genes expression in the body of *Aedes aegypti*, Chronobiology International, DOI: [10.1080/07420528.2021.1903030](https://doi.org/10.1080/07420528.2021.1903030)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/07420528.2021.1903030>



Published online: 26 Mar 2021.




Submit your article to this journal 



View related articles 



View Crossmark data 



# Off with their heads: analysis of the circadian clock genes expression in the body of *Aedes aegypti*

Rayane Teles-de-Freitas <sup>a</sup>, Liliane Barboza <sup>a</sup>, and Rafaela V. Bruno <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>b</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM)/CNPq, Rio de Janeiro, Brazil

## ABSTRACT

The circadian clock of mosquitoes can influence physiological and behavioral processes linked to disease transmission. Currently, we know how clock genes are expressed in the head of the *Aedes aegypti* in different light and temperature regimens, but we still do not know anything about the expression of these genes in the body. The present work aims to contribute to this understanding. We observed that the expression of clock genes in the body of *Aedes* can be different from that in the head. Additionally, we found that temperature cycles have greater influence on the clock genes of the body of *Aedes* than light/dark cycles.

## ARTICLE HISTORY

Received 29 November 2020  
Revised 8 March 2021  
Accepted 9 March 2021

## KEYWORDS

*Aedes aegypti*; circadian clock; peripheral tissues; temperature cycles; light/dark cycles; clock genes expression

## Introduction

Since the first organisms appeared on the planet, they have been subjected to daily cycles of light and temperature. These selective pressures have led beings to evolve strategies to adapt to environmental fluctuations. They developed a daily pacemaker for controlling their physiological and behavioral rhythms (Moore-Ede et al. 1982). In the insect model, *Drosophila melanogaster*, this clock is composed of a set of genes that regulate themselves, as well as other genes related to various phenotypes (reviewed by Patke et al. 2020). Microarray studies estimate that 10% of the *Drosophila* genome is cyclically expressed, which underscores the importance of the clock in controlling a broad spectrum of cellular pathways. However, when the rhythmic expression was compared in different tissues, less than 10% of the genes that cycle in the head were found to do so in the body (Ceriani et al. 2002; Claridge-Chang et al. 2001; Keegan et al. 2007; McDonald and Rosbash 2001).

As in *Drosophila*, hematophagous mosquitoes exhibit activity, reproduction, and feeding rhythms under the control of an endogenous circadian clock (Saunders 2002). Mosquitoes are vectors of important tropical diseases. Their activity and blood-feeding rhythms are crucial for the transmission of various pathogens (Clements 1999; Saunders 2002). Our, as well as other groups, have been able to elucidate the expression of the core clock

genes in the central pacemaker (head) of *Aedes aegypti*, the main vector of Dengue, Chikungunya, and Zika arboviruses (Gentile et al. 2009; Leming et al. 2014; Rivas et al. 2018; Teles-de-freitas et al. 2020), but we still do not know how these genes are expressed in the body. Head and body comparative studies have shown differences in clock gene expression in vector insects, such as *Lutzomyia longipalpis* and *Anopheles gambiae* (Meireles-Filho et al. 2006a, 2006b; Rund et al. 2011, 2013). Since synchronization of temperature cycles begins in the peripheral tissues mainly located in the body (based on the *Drosophila* model, Sehadova et al. 2009) and *Aedes aegypti* appears to be more sensitive to temperature cycles than other mosquitoes (Rivas et al. 2018), we were motivated to understand how clock genes are expressed in the body of this vector species. Thus, we now present the expression in the body of the core genes (*period*, *timeless*, *crypto-chrome 2* and *cycle*) of the circadian clock of *Aedes*. Our objective is not to accomplish an exhaustive understanding on *Aedes* clock, but to provide an initial model about the way it functions in peripheral tissues, comparing it to what is already known about the expression of these genes in the head.

## Materials and methods

### Mosquitoes

The IBEx (Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro, Brazil) donated the eggs of *Ae. aegypti*

**CONTACT** Rafaela V. Bruno  rafaellav@ioc.fiocruz.br; rafaellabruno@gmail.com  Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

© 2021 Taylor & Francis Group, LLC

(Rockefeller strain). We raised mosquitoes from the egg stage in LD 12:12 under constant 25°C. Females were separated from males while newly emerged and still virgins. In all experiments, we used 1- to 3-day-old virgin females.

### Simulation of light/dark and temperature cycles

For light/dark cycles we used the HLT Powerbus USB station (Hoenig Lichttechnik Ltd.), with which we were able to simulate LD12:12 conditions with gradual increases and decreases in light intensity during dawn and dusk. Light intensity increased from 0 – to 1000 lux, from ZT0 to ZT1.5, and remained stable in 1000 lux from ZT1.5 to ZT10.5. Establishment of semi-natural temperature cycles was possible due to the data generated by the Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) at the equinoxes in Rio de Janeiro, Brazil; we used the thermal ramp system of the Solab incubator (SL225/334) – of which minimum and maximum temperature were 20°C and 30°C, respectively. Both the simulation of light/dark cycles and temperature cycles were based on the protocol established in our previous studies (Teles-de-freitas et al. 2020).

### Expression of circadian clock genes

Female mosquitoes were kept for two days under set conditions (Table 1). On the third day, we collected ten individuals every 4 h, over 24 h. For almost all regimens the set conditions were the same as those of the day of collection. The only exception was mosquitoes in free running. They were subjected to two days under gradual LD cycles at 25°C and then collected on the first day under DD at 25°C. For each experiment, there were six time points and this procedure was repeated three or four times. Total RNA of the bodies was extracted by the TRIzol method (Invitrogen, Carlsbad, CA), and cDNA was synthesized with TaqMan Reverse Transcription Reagents

**Table 1.** Conditions under which mosquitoes were entrained and collected.

	Synchronization days	Collect days
DD at 25°C	1st and 2nd days under gradual LD 25°C	3rd day under DD 25°C
gradual LD at 25°C	1st and 2nd days under gradual LD 25°C	3rd day under gradual LD 25°C
DD with seminatural TC	1st and 2nd days under DD with seminatural TC	3rd day under DD with seminatural TC
gradual LD with seminatural TC	1st and 2nd days under gradual LD with seminatural TC	3rd day under gradual LD with seminatural TC

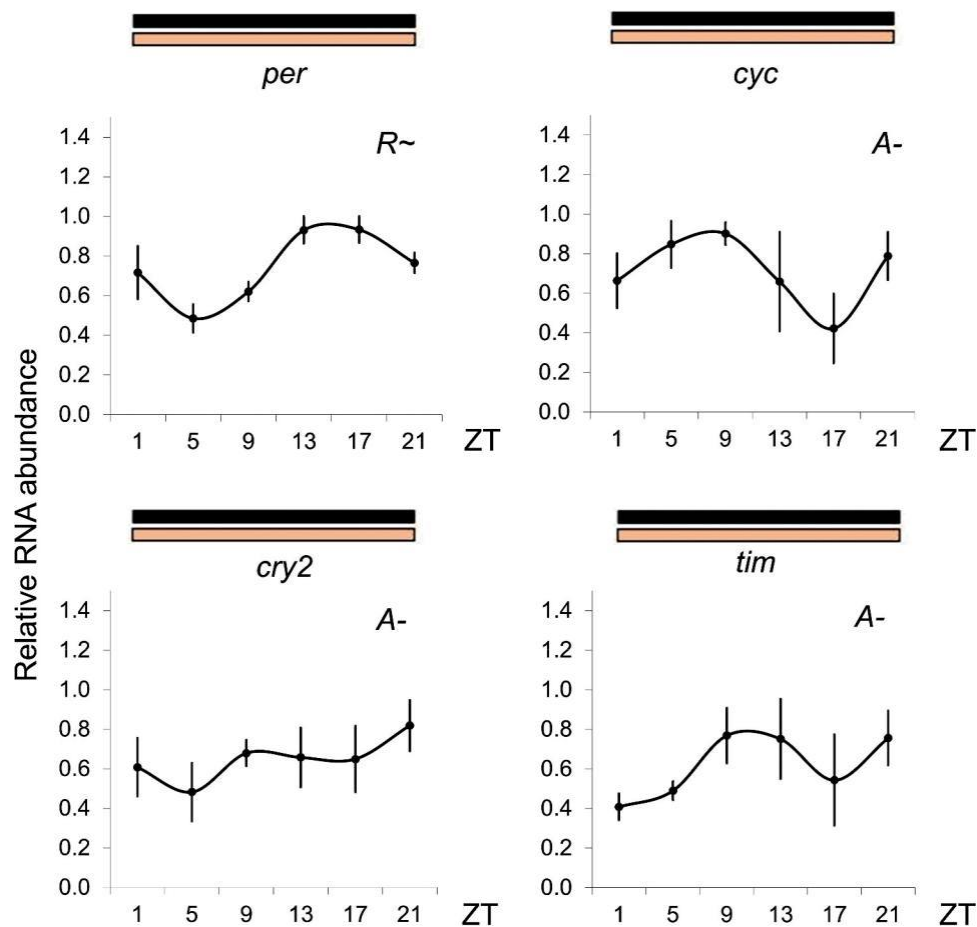
(Applied Biosystems, Foster City, CA) following the methods described by Teles-de-freitas et al. (2020). The final cDNA concentration was 1ng/μL. Then, we made a relative quantification via real-time PCRs (qPCRs), using Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher, Waltham, MA) in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher, Waltham, MA). We amplified *per*, *tim*, *cry2*, *cyc*, and *rp49* genes using oligonucleotides designed by Gentile et al. (2009). We used the *rp49* gene as a constitutive control and calculated the relative mRNA abundance with the comparative C<sub>T</sub> method (Pfaffl 2001). The values obtained for the relative abundance of mRNA were plotted in Excel graphs. We also calculated if the expression of the relative abundance of the genes varied significantly throughout the 24 h period of each regimen. We considered a gene presented rhythmic expression if the mRNA abundance differed significantly among the six time-point samples using a One-Way ANOVA ( $p = .05$ ). All statistical analyses were conducted with GraphPad Prism 5 (Prism, La Jolla, CA).

## Results

The purpose of our research is to understand how clock genes are expressed in the body of *Aedes aegypti*. To this end, we used the same strain (Rockefeller), as well as light/dark and temperature cycles previously used by our group in the study of clock gene expression in the head of *Aedes aegypti* (Teles-de-freitas et al. 2020). We intended to compare the data obtained from the body with the expression described in the head of *A. aegypti*.

Initially, we subjected mosquitoes to a regimen under which their main environmental cues were absent, that is, constant dark and temperature (DD 25°C), in order to observe the expression of *period* (*per*), *timeless* (*tim*), *cryptochrome 2* (*cry2*), and *cycle* (*cyc*) in the body. We noted only *per* presented cyclic expression, with an expression peak at CT13 and trough at CT5. The other clock genes were arrhythmic under this condition (Figure 1, Table 2). When we maintained the temperature constant (25°C), but added the 12 h light/12 h dark cycle (gradual LD 25°C), we observed a pattern very similar to that produced under DD 25°C, that is, the expressions of *tim*, *cry2*, and *cyc* were arrhythmic in the body, but the expression of *per* cycled with a peak in ZT13 and trough at ZT5 (Figure 2, Table 2).

Then we exposed the mosquitoes to constant darkness, but this time we added the temperature cycles to the regimen, which we usually call DD with



**Figure 1.** Expression of circadian clock genes in the body of *Ae. aegypti* in DD 25°C. The graphs show the expression of *per* (*period*), *cyc* (*cycle*); *cry2* (*cryptochrome2*) and *tim* (*timeless*). We used three replicates, with a pool of 10 individuals/group. The vertical bars represent the standard deviation. The black horizontal bars indicate the darkness constants and the orange bars the constant temperature (25°C). Symbols R~ and A- represent rhythmic genes and arrhythmic genes, respectively, in accordance with the One-Way ANOVA statistical test.

**Table 2.** Statistical analysis of the circadian expression of clock genes in the body of *Ae. aegypti*.

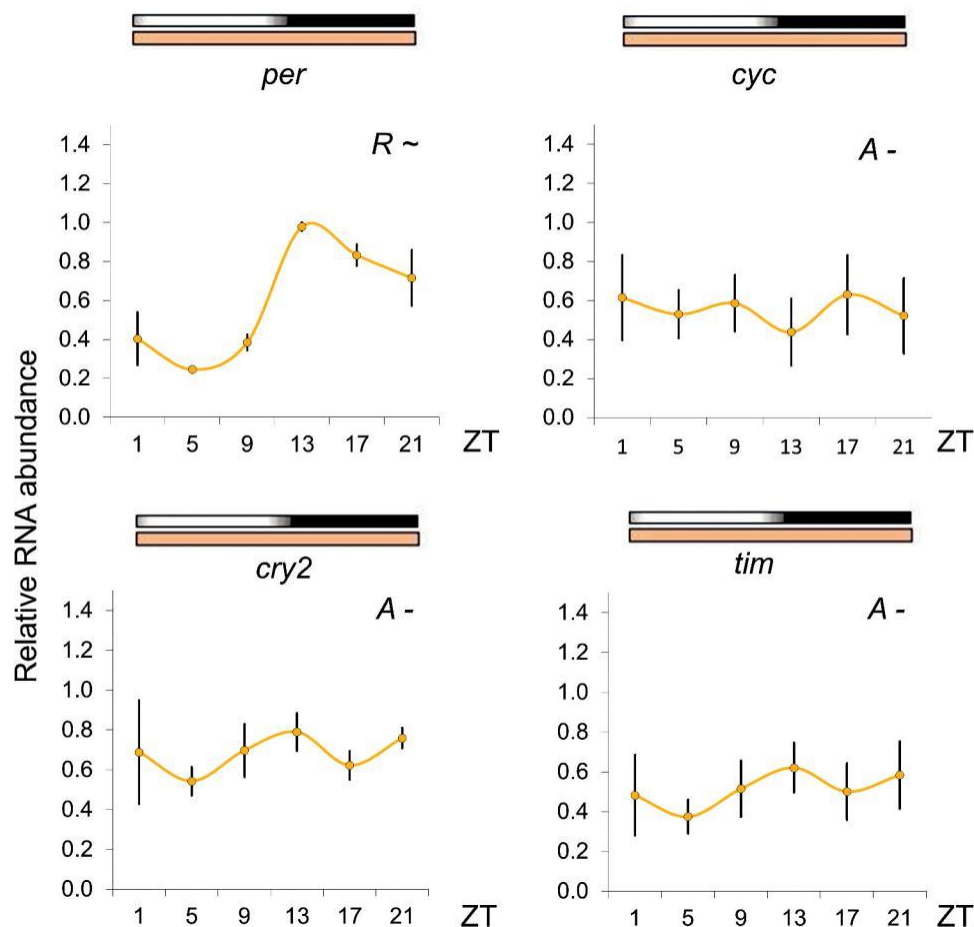
		Gene			
		<i>per</i>	<i>cyc</i>	<i>cry2</i>	<i>tim</i>
DD 25°C	$r_{5,18}^2$	5.02	1.24	0.62	1.09
	$p$	<b>&lt;0.005</b>	0.35 (ns)	0.68 (ns)	0.42 (ns)
gradual LD 25°C	$r_{5,18}^2$	11.45	0.16	0.91	0.84
	$p$	<b>&lt;0.001</b>	0.97 (ns)	0.50 (ns)	0.54 (ns)
DD with seminatural Tc	$r_{5,18}^2$	11.34	1.20	2.02	58.88
	$p$	<b>&lt;0.001</b>	0.37 (ns)	0.15 (ns)	<b>&lt;0.001</b>
gradual LD with seminatural Tc	$r_{5,24}^2$	31.06	24.38	14.60	18.24
	$p$	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>

One-way analysis of variance. ns = non-significant rhythmicity of mRNA transcription. We highlighted in bold the rhythmic gene expressions.

seminatural TC. Under these conditions, we observed some differences in the expression of the analyzed genes when compared to the DD 25°C and gradual LD 25°C regimens. Under DD with seminatural TC, although *cry2* and *cyc* maintained the arrhythmic pattern, *tim* presented cyclic expression in the body with a peak between ZT9 and ZT13, and a trough between ZT1 and ZT5. We also noted that *period*

continued to present cyclic expression in DD with seminatural TC. However, interestingly, this gene had a peak of expression at ZT17 and a trough at ZT 1 under these conditions (Figure 3, Table 2).

Our next step was to unite the two environmental indicators. We subjected mosquitoes to 12 h light/12 h dark cycles and temperature cycles simultaneously (gradual LD with seminatural TC). Under these conditions,



**Figure 2.** Expression of circadian clock genes in the body of *Ae. aegypti* in gradual LD 25°C. The graphs show the expression of *per* (*period*), *cyc* (*cycle*); *cry2* (*cryptochrome2*) and *tim* (*timeless*). We used three replicates, with a pool of 10 individuals/group. The vertical bars represent the standard deviation. In the horizontal bars, white, black, and orange colors indicate the light phase, dark phase, and constant temperature (25°C), respectively. R- represents rhythmic genes and A- represents in accordance with the One-Way ANOVA statistical test.

all of the genes analyzed curiously exhibited cyclic expression in the body of *Aedes aegypti*; *per* had a peak of expression at ZT17 and a trough at ZT5, while *tim* presented a peak of expression at ZT13 and a trough at ZT5. The expression of *cry2* produced a trough at ZT9 and a unique peak at ZT1, and *cyc* exhibited a peak of expression between ZT1 and ZT5 and a trough at ZT13 (Figure 4, Table 2).

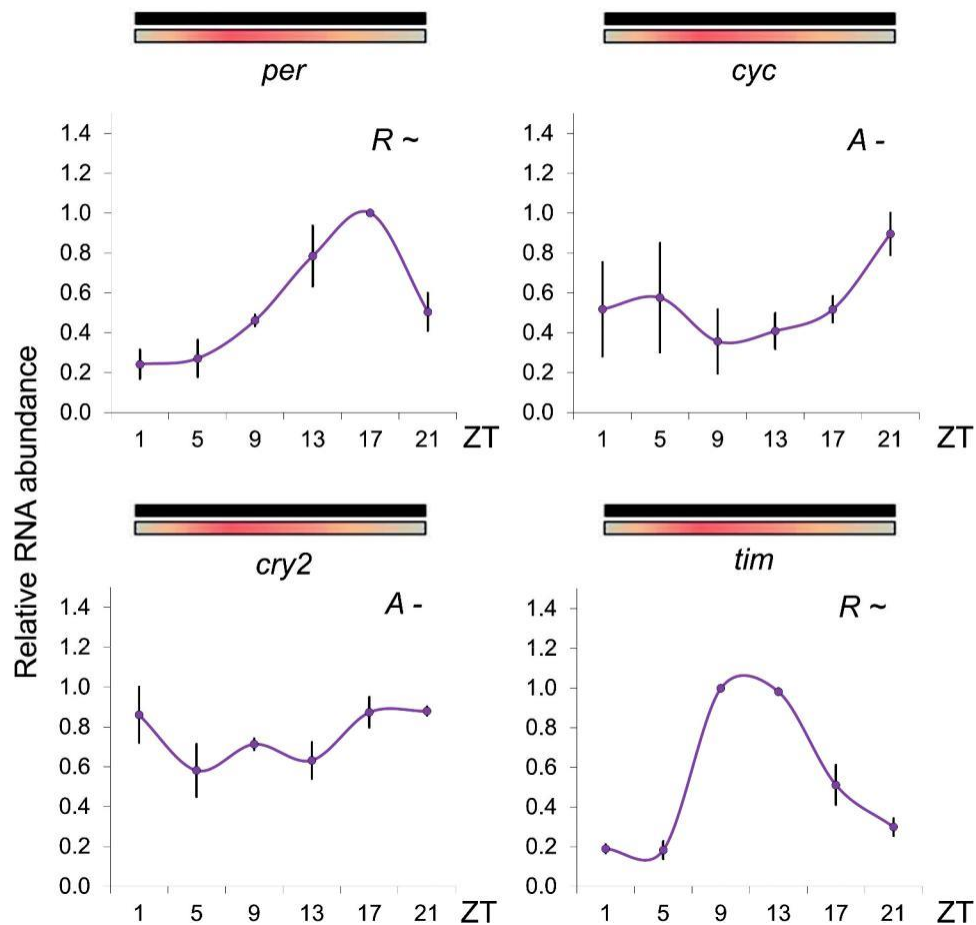
## Discussion

Circadian clocks impose daily periodicity on many physiological and behavioral processes in a wide variety of organisms. In animals, several tissues are known to contain circadian pacemakers. In mammals, coordination is performed in the head by the central clock of the suprachiasmatic nucleus (SCN) by means of pathways that include endocrine, neural, and even thermal signals (Albrecht 2012; Buhr et al. 2019; Schibler et al. 2015; Yoo

et al. 2004). In insects, the knowledge about central and peripheral clocks is almost exclusively derived from studies done on *Drosophila*. Unlike mammals, most peripheral pacemakers in *Drosophila* are autonomous, and their synchronization is accomplished through exposure to signals such as light – which can penetrate the translucent exoskeleton – or temperature (Ito and Tomioka 2016). However, before this study, nothing was known about the expression of clock genes in peripheral tissues of *Aedes aegypti*, an insect so important for the transmission of various diseases.

We selected four of the most important clock genes in *Aedes aegypti* and observed their expression in the mosquito body. We observe that the expression of the analyzed genes was very similar in DD 25°C and gradual LD 25°C. Under these conditions, only *period* presented cyclic expression, showing a peak and a trough at the same time in both regimens – ZT13 and ZT5, respectively, while the other genes, *tim*, *cyc*, and *cry2*, were





**Figure 3.** Expression of circadian clock genes in the body of *Ae. aegypti* in DD with seminatural TC. The graphs show the expression of *per* (*period*), *cyc* (*cycle*); *cry2* (*cryptochrome2*) and *tim* (*timeless*). We used three replicates, with a pool of 10 individuals/group. The vertical bars represent the standard deviation. The black horizontal bar indicates the constant dark. The bar in gradient colors shows the temperature cycles (red = 30°C, orange = 25°C, blue = 20°C). Symbols R- and A- represent rhythmic genes and arrhythmic genes, respectively, in accordance with the One-Way ANOVA statistical test.

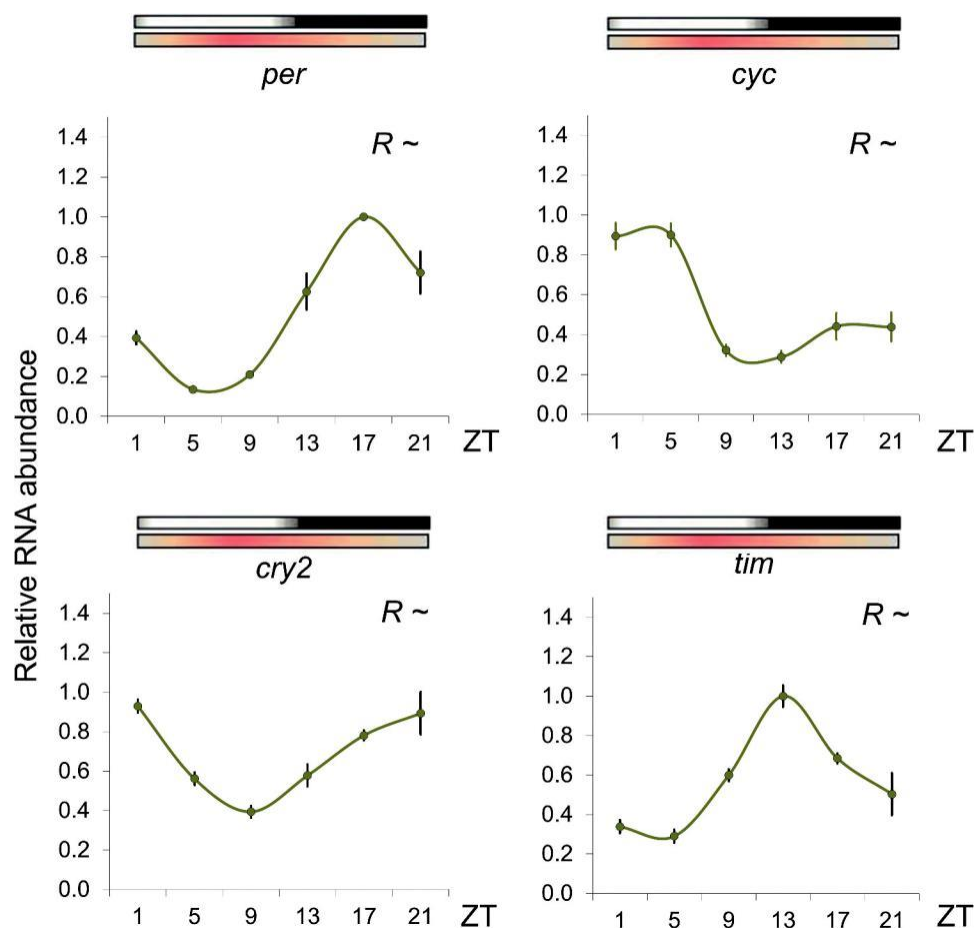
arrhythmic (Figures 1 and 2, Table 2). These results suggest that the expression of *per* in the body is regulated endogenously by the circadian clock even in the absence of environmental factors and that the addition of gradual LD cycles, alone, was not able to alter the expression of any of the analyzed genes.

The expression of the genes in the body was quite similar in LD and DD 25°C. However, we observed many differences when we compared these findings with those of the head under both conditions. Most of the analyzed genes presented cyclical expression in the head under LD and DD at 25°C (except for *tim* in LD, which was of borderline statistical difference) (Gentile et al. 2009), but we found only *period* presented cyclical expression in the body under these conditions (Figures 1 and 2, Table 2). Furthermore, even *period* presented a different expression phase in the body, compared to

the head. This gene showed a peak of expression at ZT17 in LD and DD in the head (Gentile et al. 2009).

The fact that we observed almost no changes in the body of *Aedes* when comparing the gene expression under LD and DD at 25°C suggests that LD cycles are a weak *Zeitgeber* in the body, at least for the clock genes analyzed. On the other hand, in the body of *Anopheles gambiae*, *per*, *tim*, *cyc*, and *cry2* presents cyclical expression under LD with constant temperature and seem to suffer more from the effects of this environmental indicator (Rund et al. 2011, 2013). Hence, it is possible that the lack of sensitivity to synchronize its peripheral clock with the LD cycles is specific to *Aedes aegypti* and should not be extrapolated to other mosquitoes.

Alternatively, we observed that temperature cycles seem to have a greater influence than light/dark cycles on clock genes in the body of *Aedes*. This is



**Figure 4.** Expression of circadian clock genes in the body of *Ae. aegypti* in gradual LD with seminatural TC. The graphs show the expression of *per* (*period*), *cyc* (*cycle*); *cry2* (*cryptochrome2*) and *tim* (*timeless*). We used four replicates, with a pool of 10 individuals/group. The vertical bars represent the standard deviation. The white horizontal bar indicates the light phase, while the black bar shows the dark phase. The bar in gradient colors shows the cycles of temperature (red = 30°C, orange = 25°C, blue = 20°C). Symbols R~ and A represent rhythmic genes and arrhythmic genes, respectively, in accordance with the One-Way ANOVA statistical test.

because the DD with seminatural TC regimen was able to both promote the cyclic expression of *timeless* and shift the expression peak of *period* (Figure 3, Table 2). Under this condition, the expression peaks of *per* and *tim* in the body occurred, respectively, at ZT17 and ZT13-17. Both genes showed the same peak of expression under DD with seminatural TC when we analyzed the head of *Aedes* (Teles-de-freitas et al. 2020).

Moreover, although temperature cycles appear to have greater influence than light/dark cycles on the regulation of the clock in the body of *Aedes*, it is likely that they do not act alone. The fact that all analyzed genes recovered their cyclical expression under gradual LD with seminatural TC (Figure 4, Table 2) suggests that for the full functioning of the clock in the body there must be synergy between temperature cycles and light/dark cycles. To reinforce this hypothesis, when mosquitoes are under LD with seminatural TC, rather than

under the other conditions observed previously, the expression of clock genes in the head and the body is more similar. We highlight only one exception: *cry2*. This gene showed a clear difference when we compared its expression in the head with that in the body of mosquitoes under LD with seminatural TC (Figure 4, Table 2) (Teles-de-freitas et al. 2020). In the head, *cry2* is known to present an expression peak at ZT1 and another one at ZT17 under LD with seminatural TC (Teles-de-freitas et al. 2020). However, we observed only one peak of expression at ZT1 in the body under the same condition (Figure 4, Table 2).

Gentile et al. (2009) had suggested that *cry2* expression in the head of *Ae. aegypti* is controlled by two different circadian response elements, one responsible for the morning peak and the other for the evening peak. They proposed that *cry2* had distinct promoter regions, where different transcriptional factors would bind depending on the time of day. The morning peak of

*cry2* is viewed as being controlled by the same transcriptional factors of *cyc*, while the afternoon peak is viewed as being controlled by factors responsible for the transcription of *per*, *tim*, and other genes. This would justify why, in the head, the morning peak of *cry2* occurred at the same time as the expression peak of *cyc*, while the evening peak of *cry2* was similar to the expression peak of *per*. However, in the body, *cry2* showed only one peak at ZT1, which is similar to the expression of *cyc* in LD with seminatural TC. The fact that *cry2* did not present an afternoon peak, while *period* and *timeless* kept their canonical expressions in LD with seminatural TC, suggests that at least in the body the regulation mechanism of *cry2* is different from the previously proposed model of the clock regulation in the head (Figure 4, Table 2).

In summary, the results obtained from the expression of clock genes in the body of *Aedes aegypti* differ considerably from those in its head. First, because, unlike what occurs in the head, clock genes in the body seem to be more affected by temperature cycles than by light/dark cycles (Rivas et al. 2018; Teles-de-freitas et al. 2020). Secondly, in DD 25°C, all clock genes analyzed cycled in the heads (Gentile et al. 2009). On the other hand, in the body, we observed rhythmicity for all genes only in LD with seminatural TC. Thus, it is possible that, contrasting to the central pacemaker in the brain, peripheral clocks are much more dependent on environmental factors, especially temperature cycles. Due to the epidemiological importance of the vector *Aedes aegypti*, increasingly diverse research groups around the world are studying its peripheral tissues, such as fat bodies, ovaries, testis, etc. But most of these studies are not concerned with the circadian clock of peripheral tissues in *Aedes*. This is at least curious, since for many insects the circadian clock controls genes involved in growth, development, immunity, response to insecticides, among other phenotypes (Leming et al. 2014; Matthews et al. 2016; Price et al. 2011; Ptitsyn et al. 2011; Roberts et al. 1974; Zhang et al. 2017).

Here we show for the first time how clock genes are expressed in the body of *Aedes aegypti*. Our experiments were not designed to provide an exhaustive understanding of the expression the clock genes of *Aedes*; rather, their findings were intended to serve as an initial model of the functioning of the clock genes in the body, in relation to what is already known about the expression of the clock genes in the head. We think that upcoming studies focusing on clock genes in specific tissues in the body will also be interesting.

The clock gene expression in the body not only differs from what is known about the heads of *Aedes* but it also seems to be more sensitive to temperature cycles than to light/dark cycles. It leads us to question why most studies

that investigate peripheral tissues in *Aedes* insist on exposing these mosquitoes to constant temperatures (Matthews et al. 2016; Price et al. 2011; Zhang et al. 2017). We believe investigations using gradual temperature cycles – which are closer to what is found in nature than the constant temperature conditions traditionally used in experiments – will allow us to better perceive the effects on the physiology and development of mosquitoes.

## Acknowledgements

We would like to thank Robson Costa da Silva for technical support. This study was partially financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. We also thank the CNPq and the FAPERJ for the financial support to RTF and RVB.

## Funding

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

## ORCID

Rayane Teles-de-Freitas  <http://orcid.org/0000-0003-2613-0631>

Liliane Barboza  <http://orcid.org/0000-0001-5899-005X>

Rafaela V. Bruno  <http://orcid.org/0000-0002-7082-9768>

## Authors contributions

Conceptualization and design of study, RTF, LBS, RVB; Performance and formal analysis, RTF, LBS, RVB; Writing - original draft, RTF; Writing - revision & editing, RTF, LBS, RVB; Supervision, RVB; Funding acquisition, RVB.

## Declaration of interest statement

The authors report no conflict of interest.

## References

- Albrecht U. 2012. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron*. 74:246–260. doi:10.1016/j.neuron.2012.04.006.
- Buhr ED, Vemmaraju S, Diaz N, Lang RA, Van Gelder RN. 2019. Neuropsin (OPN5) mediates local light-dependent induction of circadian clock genes and circadian photoentrainment in exposed murine skin. *Curr Biol*. 29:3478–3487.e4. doi:10.1016/j.cub.2019.08.063.
- Ceriani MF, Hogenesch JB, Yanovsky M, Panda S, Straume M, Kay SA. 2002. Genome-wide expression analysis in *Drosophila* reveals genes controlling circadian behavior. *J Neurosci*. 22:9305–9319. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-21-09305.2002.



- Claridge-Chang A, Wijnen H, Naef F, Boothroyd C, Rajewsky N, Young MW. 2001. Circadian regulation of gene expression systems in the *Drosophila* head. *Neuron*. 32:657–671. doi:10.1016/s0896-6273(01)00515-3.
- Clements AN. 1999. The biology of mosquitoes Vol. 2: sensory reception and behaviour. New York (NY): CABI Publishing. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19990505183>.
- Gentile C, Rivas GB, Meireles-Filho AC, Lima JB, Peixoto AA. 2009. Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: *cry2* is different. *J Biol Rhythms*. 24:444–451. doi:10.1177/0748730409349169.
- Ito C, Tomioka K. 2016. Heterogeneity of the peripheral circadian systems in *Drosophila melanogaster*: a review. *Front Physiol*. 7:8. doi:10.3389/fphys.2016.00008.
- Keegan KP, Pradhan S, Wang J-P, Allada R. 2007. Meta-analysis of *Drosophila* circadian microarray studies identifies a novel set of rhythmically expressed genes. *PLoS Comput Biol*. 3:e208. doi:10.1371/journal.pcbi.0030208.
- Leming MT, Rund SSC, Behura SK, Duffield GE, O'Tousa JE. 2014. A database of circadian and diel rhythmic gene expression in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *BMC Genomics*. 15:1128. doi:10.1186/1471-2164-15-1128. Matthews BJ, McBride CS, DeGennaro M, Despo O, Vosshall LB. 2016. The neurotranscriptome of the *Aedes aegypti* mosquito. *BMC Genomics*. 6:17–32. doi:10.1186/s12864-015-2239-0.
- McDonald M, Rosbash M. 2001. Microarray analysis and organization of circadian gene expression in *Drosophila*. *Cell*. 107:567–578. doi:10.1016/S0092-8674(01)00545-1.
- Meireles-Filho ACA, Amoretty PR, Souza NA, Kyriacou CP, Peixoto AA. 2006a. Rhythmic expression of the cycle gene in a hematophagous insect vector. *BMC Mol Biol*. 7:38. doi:10.1186/1471-2199-7-38.
- Meireles-Filho ACA, Rivas GBDS, Gesto JSM, Machado RC, Britto C, De Souza NA, Peixoto AA. 2006b. The biological clock of an hematophagous insect: locomotor activity rhythms, circadian expression and downregulation after a blood meal. *FEBS Lett*. 580:2–8. doi:10.1016/j.febslet.2005.11.031.
- Moore-Ede MC, Sulzman FM, Fuller CA. 1982. The clocks that time us: physiology of the circadian timing system. Harvard University Press. doi:10.4271/820832.
- Patke A, Young MW, Axelrod S. 2020. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 21:67–84. doi:10.1038/s41580-019-0179-2.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29:e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45.
- Price DP, Nagarajan V, Churbanov A, Houde P, Milligan B, Drake LL, Gustafson JE, Hansen IA. 2011. The fat body transcriptomes of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*, pre- and post- blood meal. *PLoS One*. 6:e22573. doi:10.1371/journal.pone.0022573.
- Ptitsyn AA, Reyes-Solis G, Saavedra-Rodriguez K, Betz J, Suchman EL, Carlson JO, Black WC. 2011. Rhythms and synchronization patterns in gene expression in the *Aedes aegypti* mosquito. *BMC Genomics*. 12:153. doi:10.1186/1471-2164-12-153.
- Rivas GBS, Teles-de-freitas R, Pavan MG, Lima JBP, Peixoto AA, Bruno RV. 2018. Effects of light and temperature on daily activity and clock gene expression in two mosquito disease vectors. *J Biol Rhythms*. 33:272–288. doi:10.1177/0748730418772175.
- Roberts D, Smolensky MH, Hsi B, Scanlon JE. 1974. Circadian pattern in susceptibility of *Aedes aegypti* (L.) larvae to Dursban. In: Scheving LE, Halberg F, Pauly JE, editors. *Chronobiology*. Tokyo (Japan): Igaku Shoin. p. 612 6.
- Rund SSC, Gentile JE, Duffield GE. 2013. Extensive circadian and light regulation of the transcriptome in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*. 108:E421–30. doi:10.1073/pnas.1100584108.
- Rund SSC, Hou TY, Ward SM, Collins FH, Duffield GE. 2011. Genome-wide profiling of diel and circadian gene expression in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108:E421–30. doi:10.1073/pnas.1100584108.
- Saunders DS. 2002. *Insect clocks*. 3rd ed. Elsevier. <https://www.elsevier.com/books/insect-clocks-third-edition/saunders/978-0-444-50407-4>.
- Schibler U, Gotic I, Saini C, Gos P, Curie T, Emmenegger Y, Sinturel F, Gosselin P, Gerber A, Fleury-Olela F, et al. 2015. Clock-talk: interactions between central and peripheral circadian oscillators in mammals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 80:223–232. doi:10.1101/sqb.2015.80.027490.
- Sehadova H, Glaser FT, Gentile C, Simoni A, Giesecke A, Albert JT, Stanewsky R. 2009. Temperature entrainment of *Drosophila*'s circadian clock involves the gene *nocte* and signaling from peripheral sensory tissues to the brain. *Neuron*. 64:251–266. doi:10.1016/j.neuron.2009.08.026.
- Teles-de-freitas R, Rivas GBS, Peixoto AA, Bruno RV. 2020. The summer is coming: *nocte* and *timeless* genes are influenced by temperature cycles and may affect *Aedes aegypti* locomotor activity. *Front Physiol*. 11:614722. doi:10.3389/fphys.2020.614722.
- Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Sieppka SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, et al. 2004. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:5339–5346. doi:10.1073/pnas.0308709101.
- Zhang X, Aksoy E, Girke T, Raikhel AS, Karginov FV. 2017. Transcriptome-wide microRNA and target dynamics in the fat body during the gonadotrophic cycle of *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114:E1895–E1903. doi:10.1073/pnas.1701474114.

#### 4 – DISCUSSÃO GERAL

Há décadas, diversos estudos associam a elevação da temperatura ambiente ao aumento da atividade de mosquitos vetores (Clements *et al.* 1999). Recentemente nós havíamos percebido que os ciclos de temperatura podem exercer uma influência ainda maior do que os ciclos de claro/escuro nos padrões de atividade de *Ae. aegypti*, comparado a outros mosquitos como o *Cx. quinquefasciatus* (Rivas *et al.* 2018). O *Aedes aegypti* é um dos principais vetores de arboviroses do mundo e exibe ritmos de atividade, cruciais para a transmissão de patógenos, sob o controle de um relógio circadiano. Assim, nosso primeiro questionamento foi se a hierarquia dos *Zeitgebers* (ciclos temperatura vs. ciclos de claro/escuro) seria a mesma caso esses mosquitos estivessem expostos a ciclos seminaturais em vez dos ciclos retangulares tradicionalmente utilizados por nós e outros grupos.

Assim, desenvolvemos ciclos seminaturais, com flutuações graduais da forma mais próxima possível ao que ocorre na natureza. Nosso questionamento quanto a esse ponto residia no fato de que, há décadas, vários estudos vêm tentando entender o comportamento de insetos vetores como mosquitos, mas a maioria desses trabalhos foram feitos no campo, onde se estabelecia uma correlação entre a taxa de captura e a atividade em um determinado momento ou em laboratório sobre condições retangulares (Taylor & Jones 1969; Jones 1981; Clements *et al.* 1999; Saunders 2002; Gentile *et al.* 2009; Taye *et al.* 2016; Padilha *et al.* 2018; Rivas *et al.* 2018; Upshur *et al.* 2019). Para a primeira abordagem, a principal limitação metodológica certamente era a densidade populacional. Como estudar a influência das quatro estações na atividade quando o tamanho de uma população muda ao longo do ano? Além disso, no campo a atividade média de uma população poderia ocultar variações individuais, sendo mais difícil também investigar o arrastamento por cada *Zeitgeber* individualmente.

A fim de mitigar esses problemas, várias técnicas foram desenvolvidas para avaliar a atividade individual do mosquito em laboratório (Taylor & Jones 1969; Jones 1981; Gentile *et al.* 2009; Padilha *et al.* 2018; Rivas *et al.* 2018). No entanto, a maioria dos estudos foi realizada em condições de claro / escuro com temperatura constante. Nos raros trabalhos onde se avaliava a atividade dos mosquitos em ciclos de temperatura, tais condições foram conduzidas por meio de ciclos com mudança

abrupta de temperatura (Rivas *et al.* 2018; Upshur *et al.* 2019). Assim, em um dos nossos trabalhos, nós simulamos o aumento ou diminuição gradativa da luz ao amanhecer e anoitecer, bem como padronizamos um regime seminatural para ser usado em condições de laboratório, que seria o mais próximo possível dos ciclos naturais de temperatura encontrados no Rio de Janeiro (Teles-de-Freitas *et al.* 2020).

Observamos que, mesmo em condições de escuro constante (DD; do inglês, *dark/dark*), o ciclo de temperatura seminatural que produzimos foi capaz de sincronizar a atividade de *Ae. aegypti* como normalmente ocorria em DD com o ciclo de temperatura retangular tradicional, mas com o benefício de não produzir os artefatos após as mudanças abruptas de temperatura (Teles-de-Freitas *et al.* 2020). Além disso, os resultados da expressão na cabeça observados sob regimes seminaturais foram comparados com diferentes regimes retangulares. Notamos que os mosquitos antecipam a fase de expressão para vários genes do relógio em ciclos de temperatura retangulares (seja na presença ou ausência dos ciclos de claro/escuro). Isso reforça que os tradicionais ciclos de temperatura retangulares podem não refletir o que ocorre na natureza.

Para comparar a hierarquia dos *Zeitgebers* seminaturais, submetemos os mosquitos a esses indicadores ambientais fora de fase e observamos suas atividades locomotoras. Nessas condições, notamos tanto o aumento do pico M, quanto a diminuição do pico E, em comparação aos ciclos de claro/escuro com ciclos de temperaturas em fase (Teles-de-Freitas *et al.* 2020). Acreditamos que esses resultados reforçam a importância dos ciclos de temperatura na amplitude dos picos de atividade. No entanto, a atividade do *Aedes aegypti* permaneceu diurna mesmo em ciclos de claro/escuro e temperatura seminatural fora de fase, diferente do que vimos em ciclos fora de fase retangulares (Rivas *et al.* 2018; Teles-de-Freitas *et al.* 2020). Assim, é possível que, enquanto baixas temperaturas em condições retangulares conflitantes “forçam” uma mudança brusca na distribuição da atividade diária, essas mesmas baixas temperaturas desacoplarão o pico E, se aplicadas pontualmente no horário do ZT12, o que ocorre em condições seminaturais conflitantes (Teles-de-Freitas *et al.*, 2020).

Dessa forma, concluímos que a hierarquia dos *Zeitgebers* não é a mesma comparando regimes retangulares e seminaturais. Ciclos de temperatura seminaturais

também exercem forte influência sobre a atividade de *Ae. aegypti*, embora produzindo efeitos diferentes dos ciclos de temperatura retangulares. Isto é, regimes retangulares conflitantes forçam uma mudança de fase da atividade, enquanto regimes seminaturais conflitantes atuam principalmente na amplitude dos picos de atividade (Teles-de-Freitas *et al.* 2020). Tais fatos nos levam a apresentar alguns questionamentos sobre as pesquisas atuais com *Aedes aegypti*, uma vez que, como já mencionamos, o relógio desses mosquitos controla vários genes envolvidos no crescimento, desenvolvimento, oviposição, imunidade, resposta a inseticidas, entre outros fenótipos (Ptitsyn *et al.* 2011; Leming *et al.* 2014). Acreditamos que o uso das condições seminaturais que propomos possa garantir resultados mais próximos ao que ocorre na natureza, para diversos campos de pesquisa.

Assim, utilizamos as condições seminaturais que propomos para responder a segunda pergunta norteadora dessa tese: De que forma genes do relógio são expressos no corpo de *Ae. aegypti*? Para alcançar brevemente a base desse questionamento, devemos lembrar que o ciclo de temperatura é um importantíssimo sincronizador ambiental para o relógio circadiano de *Aedes aegypti* (Rivas *et al.* 2008; Teles-de-Freitas *et al.* 2020) e de que a sincronização realizada pelos ciclos de temperatura em *Drosophila* precisaria primeiramente ser captada pelo marca-passo periférico no corpo (Sehadova *et al.* 2009). Mas que, apesar desses fatos, nenhum gene de relógio havia tido sua expressão caracterizada, ao longo do dia, no corpo de *Ae. aegypti*.

Os resultados obtidos a partir da expressão de genes do relógio no corpo do *Aedes aegypti* diferem consideravelmente do que conhecíamos com relação a expressão desses genes na cabeça. Primeiro, porque, ao contrário do que ocorre na cabeça, os genes do relógio no corpo parecem ser mais afetados por ciclos de temperatura do que por ciclos de claro / escuro (Gentile *et al.* 2009; Rivas *et al.* 2018; Teles-de-Freitas *et al.* 2020). Em segundo lugar, em escuro e temperatura constantes (DD 25 °C), todos os genes do relógio analisados apresentaram expressão cíclica nas cabeças (Gentile *et al.* 2009). Por outro lado, no corpo, observamos ritmicidade na expressão para todos os genes apenas em ciclos de claro/escuro com ciclos de temperatura seminatural. Assim, é possível que, ao contrário do marcapasso central no cérebro, os relógios periféricos sejam muito mais dependentes de fatores ambientais, principalmente dos ciclos de temperatura.

Nossas descobertas nos levam ao seguinte questionamento. É sabido que, devido à importância epidemiológica do vetor *Aedes aegypti*, cada vez mais diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo estão estudando seus tecidos periféricos, como corpos gordurosos, ovários, testículos, etc. Mas a maioria desses estudos não se preocupa com o relógio circadiano de tecidos periféricos em *Aedes*. Esse fato é pelo menos curioso, já que para muitos insetos o relógio circadiano controla genes envolvidos no crescimento, desenvolvimento, imunidade, resposta a inseticidas, entre outros fenótipos (Ptitsyn *et al.* 2011; Price *et al.* 2011; Leming *et al.* 2014; Matthews *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2017).

No segundo estudo dessa tese, mostramos pela primeira vez como genes do relógio são expressos no corpo do *Aedes aegypti* (Teles-de-Freitas *et al.* 2021). Não acreditamos ter esgotado o entendimento sobre o relógio de *Aedes*, mas fornecemos um primeiro modelo de seu funcionamento no corpo, em relação ao que já se sabe sobre a expressão desses genes na cabeça. Incentivamos mais estudos com foco em genes do relógio em tecidos específicos do corpo, acreditando que esses também trarão futuras contribuições importantes para a comunidade científica.

Por último, mas talvez uma das perguntas mais importantes respondidas nesse trabalho, foi quais genes participam da “captação da informação” inicial passada pelos ciclos de temperatura para a sincronização dos relógios circadianos (*Input*) de *Aedes aegypti*. Nosso primeiro candidato foi *nocte*, devido ao fato desse gene desempenhar tal função em *Drosophila* (Sehadova *et al.* 2009). Mas surpreendentemente observamos que o gene de relógio *timeless* também desempenha papel importante na sincronização pelos ciclos de temperatura em *Aedes aegypti* (Teles-de-Freitas *et al.* 2020).

A expressão de *tim* na cabeça de *Aedes aegypti* foi a mais afetada pelas mudanças de temperatura, entre os genes de relógio analisados (*per*, *tim*, *cry2*, *cyc*, *Clk*, *Pdp*, *vri*, *cwo* e *E75*). Vimos que *tim* perdeu totalmente a sua expressão rítmica em ciclos de claro/escuro e temperatura fora de fase e pelo *knockdown* de *nocte*. Curiosamente, *tim* também apresentou uma expressão arrítmica na cabeça de *Aedes*, quando esses mosquitos são expostos a ciclos de claro/escuro com temperatura constantes e o *knockdown* desse gene via dsRNA havia afetado a atividade do *Aedes* (Gentile *et al.* 2009; 2013). Em *Drosophila*, o *splicing* alternativo de *tim* tem sido

implicado na adaptação comportamental às mudanças sazonais de temperatura (Boothroyd *et al.* 2007; Montelli *et al.* 2015). Assim, futuros estudos sobre possíveis isoformas do RNA de *tim* em *Aedes* podem ser uma linha de pesquisa interessante para o entendimento do relógio circadiano desses vetores.

Além do observado para *tim*, também destacamos a importância do gene *nocte* para o *Aedes aegypti*. Aqui, mostramos que *nocte* afeta os níveis de atividade desses vetores. Surpreendentemente, o *knockdown* de *nocte* via dsRNA causou uma redução na expressão desse gene no corpo, mas não na cabeça e isso foi suficiente para afetar o comportamento. Lembramos que em *Drosophila* diferentes neurônios do marcapasso circadiano podem se sincronizar aos ciclos de temperatura, mas em cérebros isolados essa resposta não ocorre, pois a informação é passada através dos órgãos periféricos. A principal estrutura capaz de perceber as variações térmicas e transmiti-las aos demais osciladores periféricos são os órgãos cordotonais (ChOs) (Sehadova *et al.* 2009). Conforme já mencionamos, uma mutação em *nocte* causa alterações estruturais e funcionais no ChOs de *Drosophila*, produzindo prejuízo na sincronização da expressão e atividade gênica pelos ciclos de temperatura (Glaser *et al.* 2005; Sehadova *et al.* 2009; Chen *et al.* 2018). Assim, como nossa injeção do dsRNA de *nocte* não causou redução na expressão desse gene na cabeça de *Aedes*, mas apenas no corpo, provavelmente, os tecidos periféricos são importantes para a sincronização pelos ciclos de temperatura nesses mosquitos tal qual em *Drosophila*.

## 5 – CONCLUSÃO

Concluimos que nosso trabalho traz uma perspectiva global sobre a sincronização pelos ciclos de temperatura em *Aedes aegypti*. Sugerimos como funciona a percepção deste *Zeitgeber* (*input*) através do funcionamento de dois genes: *nocte* e *timeless* (Figura 5.1) (Teles-de-Freitas *et al.* 2020). Mostramos como a sincronização desse indicador ambiental altera a expressão de genes do relógio circadiano na cabeça e corpo de *Aedes* (Figura 5.1) (Teles-de-Freitas *et al.* 2020; 2021). Finalmente, analisamos as implicações de tal sincronização na atividade desses vetores (*output*, Figura 5.1) (Teles-de-Freitas *et al.* 2020).

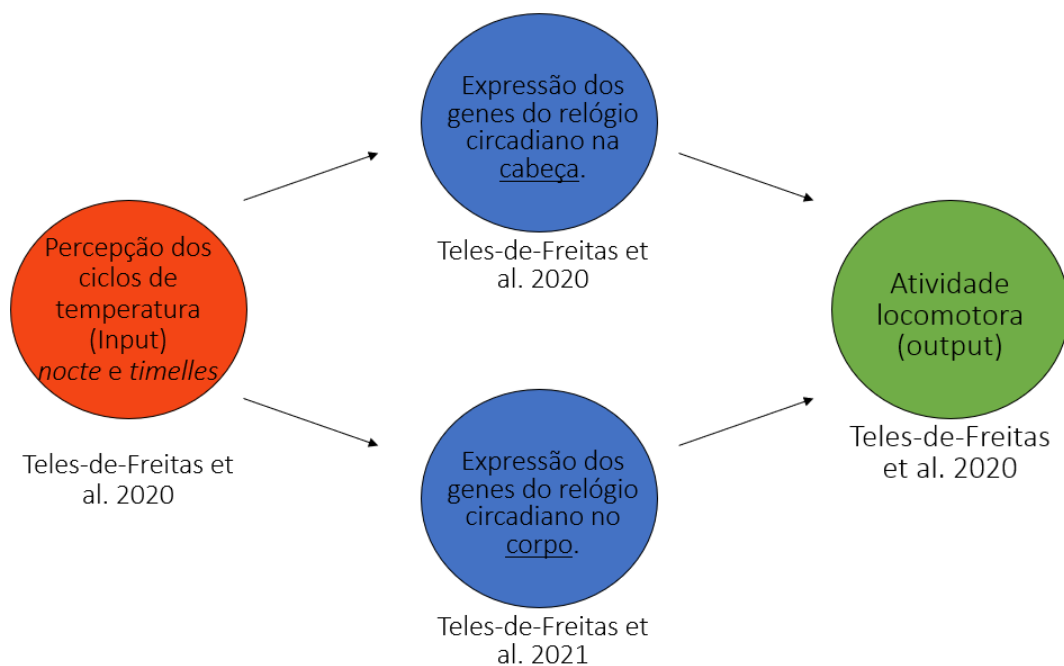


Figura 5.1: Esquema simplificado dos resultados obtidos nessa tese.

## 6 – REFERÊNCIAS

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

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

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, 791–804.

Amoretty PR, Padilha KP, Freitas RT, Bruno RV. Uso de *Drosophila melanogaster* como modelo para o estudo do relógio circadiano em insetos vetores. *Acta Scientiae et Technicae*, 2013; v. 1, p. 1, 2013.

Araripe LO, Bezerra JRA, Rivas GBS, Bruno RV. Locomotor activity in males of *Aedes aegypti* can shift in response to females' presence. *Parasit Vectors*. 2018; 18;11(1):254.

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

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

Bargiello TA, Young MW. Molecular genetics of a biological clock in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984; 81:2142-2146.

Bargiello TA, Saez L, Baylies MK, Gasic G, Young MW, Spray DC. The *Drosophila* clock gene *per* affects intercellular junctional communication. *Nature*. 1987; 328:686-691.



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

Breda C, Rosato E, Kyriacou CP. *Norpa* Signalling and the Seasonal Circadian Locomotor Phenotype in *Drosophila*. *Biology (Basel)*. 2020; 16;9(6):130.

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

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

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*. 2003; 8(1):e52559.

Chen C, Xu M, Anantaprakorn Y, Rosing M, Stanewsky R. *nocte* Is Required for Integrating Light and Temperature Inputs in Circadian Clock Neurons of *Drosophila*. *Curr Biol* 2018; 21;28(10):1595-1605.e3.

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

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

Collins B, Mazzoni EO, Stanewsky R, Blau J. *Drosophila* CRYPTOCHROME is a circadian transcriptional repressor. *Curr Biol*. 2006; 7;16(5):441-9.

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

Daan S, Spoelstra K, Albrecht U, Schmutz I, Daan M, Daan B, Rienks F, Poletaeva I, Dell'Omo G, Vyssotski A, Lipp H. Lab mice in the field: unorthodox daily activity and effects of a dysfunctional circadian clock allele. *J Biol Rhythms* 2011; 26(2):118-29.

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

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

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

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

Ederly I, Zwiebel LJ, Dembinska ME, Rosbash M. Temporal phosphorylation of the *Drosophila period* protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91, 2260-2264.

Egan ES, Franklin TM, Hilderbrand-Chae MJ, McNeil GP, Roberts MA, Schroeder AJ, Zhang X, Jackson FR. An extra retinally expressed insect *cryptochrome* with similarity to the blue light photoreceptors of mammals and plants. *J. Neurosci*. 1999; 19, 3665–3673.

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

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

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

Farnesi LC, Barbosa CS, Araripe LO, Bruno RV. The influence of a light, dark cycle on the egg laying activity of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018; 5;113(4):e170362.

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

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

Gentile C, Rivas GBS, Lima JBP, Bruno RV, Peixoto AA. Circadian clock of *Aedes aegypti*: effects of blood-feeding, insemination and RNA interference. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 108(Suppl. I): 80-87. 2013.

Gekakis N, Saez L, Delahaye-Brown AM, Myers MP, Sehgal A, Young MW, Weitz CJ. Isolation of timeless by PER protein interaction: defective interaction between timeless protein and long-period mutant PERL. *Science* 1995; 3;270(5237):811-5.

Giebultowicz JM. Molecular mechanism and cellular distribution of insect circadian clocks. *Annu Rev Entomol*. 2000; 45:769-93.

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

Glossop NR, 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, 249–261.

Giebultowicz JM, Hege DM. Circadian clock in Malpighian tubules. *Nature*. 1997; 17;386(6626):664.

Gillott C. Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annu Rev Entomol*. 2003; 48:163-84.

Green EW, O'Callaghan EK, Hansen CN, Bastianello S, Bhutani S, Vanin S, Armstrong JD, Costa R, Kyriacou CP. *Drosophila* circadian rhythms in seminatural environments: Summer afternoon component is not an artifact and requires TrpA1 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;14;112(28):8702-7.

Grima B, Chélot E, Xia R, Rouyer F. Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature*. 2004; 14;431(7010):869-73.

Hardin PE. Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. *Adv Genet*. 2011; 74, 141-73.

Helfrich-Förster C. Robust circadian rhythmicity of *Drosophila melanogaster* requires the presence of lateral neurons: a brain-behavioral study of disconnected mutants. *J Comp Physiol A*. 1998;182(4):435-53.

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

Helfrich-Förster C. Neurobiology of the fruit fly's circadian clock. *Genes Brain Behav*. 2005; 4(2):65-76.

Helfrich-Förster C. Light input pathways to the circadian clock of insects with na emphasis on the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. 2020; 206(2):259-272.

Hermann-Luibl C, Helfrich-Förster C. Clock network in *Drosophila*. *Curr Opin Insect Sci*. 2015; 7:65-70.

Hickner PV, Mori A, Rund SSC, Sheppard AD, Cunningham JM, Chadee DD, Duffield GE, Severson DW. QTL Determining Diel Flight Activity in Male *Culex pipiens* Mosquitoes. *J Hered.* 2019; 7;110(3):310-320.

Houl JH, Yu W, Dudek SM, Hardin PE. *Drosophila* CLOCK is constitutively expressed in circadian oscillator and non-oscillator cells. *J Biol Rhythms.* 2006; 21, 93–103.

Ivanchenko M, Stanewsky R, Giebultowicz JM. Circadian photoreception in *Drosophila*: functions of cryptochrome in peripheral and central clocks. *J Biol Rhythms.* 2001; 16(3):205-15.

Ito C, Goto SG, Shiga S, Tomioka K, Numata H. Peripheral circadian clock for the cuticle deposition rhythm in *Drosophila melanogaster*. 2008; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 8446–8451.

Ito C, Tomioka K, Heterogeneity of the Peripheral Circadian Systems in *Drosophila melanogaster*. A Review. *Front Physiol.* 2016; 7: 8.

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

Johnson CH, Elliott JA., Foster R. Entrainment of circadian programs. *Chronobiol Int.* 2003; 20,741-774.

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

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, 1675–1686.

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

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

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

Klowden MJ. Endogenous factors regulating mosquito host-seeking behaviour. Ciba Found Symp. 1996; 200:212-23.

Klowden MJ. The check is in the male: male mosquitoes affect female physiology and behavior. J Am Mosq Control Assoc. 1999;15(2):213-20.

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

Krishnan B, Dryer SE, Hardin PE. Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. Nature. 1999; 22;400(6742):375-8.

Krupp JJ, Kent C, Billeter JC, Azanchi R, So AK, Schonfeld JA, Smith BP, Lucas C, Levine JD. Social experience modifies pheromone expression and mating behavior in male *Drosophila melanogaster*. Curr Biol. 2008; 23;18(18):1373-83.

Krupp JJ, Billeter J, Wong A, Choi C, Nitabach MN, Levine JD. Pigment-dispersing factor modulates pheromone production in clock cells that influence mating in *Drosophila*. Neuron. 2013; 10;79(1):54-68.

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

Leming MT, Rund SSC, Behura SK, Duffield GE, O'Tousa JE. A database of circadian and diel rhythmic gene expression in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. BMC Genomics, 2014; 15:1128.

Levine JD, Funes P, Dowse HB, Hall JC. Advanced analysis of a *cryptochrome* mutation's effects on the robustness and phase of molecular cycles in isolated peripheral tissues of *Drosophila*. BMC Neurosci. 2002; 15:3:5.

Lim C, Chung BY, Pitman JL, McGill JJ, Pradhan S, Lee J, Keegan KP, Choe J, Allada R. *Clockwork orange* encodes a transcriptional repressor important for circadian clock amplitude in *Drosophila*. Curr. Biol. 2007; 17, 1082– 1089.

Lima-Camara TN, Bruno RV, Luz PM, Castro MG, Lourenço-de-Oliveira R, Sorgine MH, Peixoto AA. Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. PLoS One. 2011; 8, e17690.

Lima-Camara TN, Codeço CT, Honório NA, Bruno RV, Peixoto AA, Lounibos LP. Male accessory gland substances from *Aedes albopictus* affect the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108 Suppl 1(Suppl 1):18-25.

Lima-Camara TN, Lima JB, 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. Parasit Vectors. 2014; 2;7:304.

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

Lin JM, Kilman VL, Keegan K, Paddock B, Emery-Le M, Rosbash M, Allada R. A role for *casein kinase 2 alpha* in the *Drosophila* circadian clock. Nature. 2002; 420, 816–820.

Maciel-de-Freitas R, Koella JC, Lourenço-de-Oliveira R. Lower survival rate, longevity and fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus serotype 2. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011;105(8):452-8.

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

Majercak J, Chen WF, Edery I. Splicing of the period gene 30- terminal intron is regulated by light, circadian clock factors, and phospholipase C. *Mol. Biol. Cell.* 2004; 15, 3359–3372.

Marques, N, Menna-Barreto, L. *Cronobiologia: princípios e aplicações*, Universidade de São Paulo, São Paulo; 1999.

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

Matsumoto A, Ukai-Tadenuma M, Yamada RG, Houl J, Uno KD, Kasukawa T, Dauwalder B, Itoh TQ, Takahashi K, Ueda R, Hardin PE, Tanimura T, Ueda HR. A functional genomics strategy reveals *clockwork orange* as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. *Genes Dev.* 2007; 21, 1687–1700.

Matthews BJ, McBride CS, DeGennaro M, Despo O, Vosshall LB. The neurotranscriptome of the *Aedes aegypti* mosquito. *BMC Genomics.* 2016; 17:32.

Menegazzi P, Yoshii T, Helfrich-Förster C. Laboratory versus nature: the two sides of the *Drosophila* circadian clock. *J Biol Rhythms.* 2012;27(6):433-42.

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



Moore-Ede MC, Sulzman FM, Fuller CA. The clocks that time us: physiology of the circadian timing system. Harvard University Press, Cambridge, England. 1982.

Morioka E, Matsumoto A, Ikeda M. Neuronal influence on peripheral circadian oscillators in pupal *Drosophila* prothoracic glands. Nat Commun. 2012; 19;3:909.

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

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

Myers EM, Yu J, Sehgal A. Circadian control of eclosion: interaction between a central and peripheral clock in *Drosophila melanogaster*. Curr Biol. 2003; 18;13(6):526-33.

Montelli S, Mazzotta G, Vanin S, Caccin L, Corrà S, De Pittà C, Boothroyd C, Green EW, Kyriacou CP, Costa R. *period* and *timeless* mRNA Splicing Profiles under Natural Conditions in *Drosophila melanogaster*. J Biol Rhythms. 2015; 30(3):217-27.

Naidoo N, Song W, Hunter-Ensor M, Sehgal A. A role for the proteasome in the light response of the timeless clock protein. Science. 1999; 10;285(5434):1737-41.

Neely GG, Keene AC, Duchek P, Chang EC, Wang QP, Aksoy YA, Rosenzweig M, Costigan M, Woolf CJ, Garrity PA, Penninger JM. TrpA1 regulates thermal nociception in *Drosophila*. PLoS One. 2011; 6(8):e24343.

Padilha KP, Resck MEB, Cunha OATD, Teles-de-Freitas R, Campos SS, Sorgine MHF, Lourenço-de-Oliveira R, Farnesi LC, Bruno RV. Zika infection decreases *Aedes aegypti* locomotor activity but does not influence egg production or viability. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018; 23;113(10):e180290.

Padilha KP, TALYULI OAC, LOURENCO-DE-OLIVEIRA R, FARNESI LC, BRUNO RV. Chikungunya infection modulates the locomotor/flight activity of *Aedes aegypti*. SLEEP SCIENCE (IMPRESSO). 2020; v. 13, p. 74-77.

Pegoraro M, Noreen S, Bhutani S, Tsolou A, Schmid R, Kyriacou CP, Tauber E. Molecular evolution of a pervasive natural amino-acid substitution in *Drosophila* cryptochrome. PLoS One. 2014; 24;9(1):e86483.

Ptitsyn AA, Reyes-Solis G, Saavedra-Rodriguez K, Betz J, Suchman EL, Carlson JO, Black, WC. Rhythms and synchronization patterns in gene expression in the *Aedes aegypti* mosquito. BMC Genomics. 2011; 17, 12-153.

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

Pittendrigh CS. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. Annual review of physiology. 1993; 55,16-54.

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

Plautz JD, Kaneko M, Hall JC, Kay SA. Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. Science. 1997; 28;278(5343):1632-5.

Prabhakaran PM, De J, Sheeba V. Natural conditions override differences in emergence rhythm among closely related drosophilids. PLoS One. 2013; 11;8(12):e83048.

Prabhakaran PM, Sheeba V. Temperature sensitivity of circadian clocks is conserved across *Drosophila* species melanogaster, malerkotliana and ananassae. Chronobiol Int. 2014; 31(9):1008-16.

Price JL, Dembinska ME, Young MW, Rosbash M. Suppression of PERIOD protein abundance and circadian cycling by the *Drosophila* clock mutation *timeless*. 1995; EMBO J. 14, 4044-4049.

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

Price DP, Nagarajan V, Churbanov A, Houde P, Milligan B, Drake LL, Gustafson JE, Hansen IA. The fat body transcriptomes of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*, pre- and post- blood meal. PLoS One. 2011;6(7):e22573.

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

Renn SC, Park JH, Rosbash M, Hall JC, Taghert PH. A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. Cell. 1999; 23;99(7):791-802.

Resck MEB, Padilha KP, Cupolillo AP, Talyuli OAC, Ferreira-de-Brito A, Lourenço-de-Oliveira R, Farnesi LC, Bruno RV. Unlike Zika, Chikungunya virus interferes in the viability of *Aedes aegypti* eggs, regardless of females' age. Sci Rep. 2020; 12;10(1):13642.

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

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

Rivas GB, Souza NA, Peixoto AA. Analysis of the activity patterns of two sympatric sandfly siblings of the *Lutzomyia longipalpis* species complex from Brazil. *Med Vet Entomol.* 2008; 22(3):288-90.

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):272-288.

Rubin EB, Shemesh Y, Cohen M, Elgavish S, Robertson HM, Bloch G. Molecular and phylogenetic analyses reveal mammalian-like clockwork in the honey bee (*Apis mellifera*) and shed new light on the molecular evolution of the circadian clock. *Genome Res.* 2006;16(11):1352-65.

Rund SS, Hou TY, Ward SM, Collins FH, Duffield GE. Genome-wide profiling of diel and circadian gene expression in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 9;108(32):E421-30.

Rund D. Genotyping chronic lymphocytic leukemia in China: East meets West. *Leuk Lymphoma.* 2011;52(6):941-2.

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

Saez L, Young MW. Regulation of nuclear entry of the *Drosophila* clock proteins period and timeless. *Neuron.* 1996;17(5):911-20.

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

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

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

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

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

Shafer OT, Yao Z. Pigment-Dispersing Factor Signaling and Circadian Rhythms in Insect Locomotor Activity. *Curr Opin Insect Sci*. 2014; 1;1:73-80.

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

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

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

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

Stoleru D, Peng Y, Agosto J, Rosbash M. Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*. *Nature*. 2004; 431(7010):862-8.

Stoleru D, Peng Y, Nawathean P, Rosbash M. *Nature*. A resetting signal between *Drosophila* pacemakers synchronizes morning and evening activity. 2005; Nov 10;438(7065):238-42.

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

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

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

Taghert PH, Shafer OT. Mechanisms of clock output in the *Drosophila* circadian pacemaker system. *J Biol Rhythms*. 2006;21(6):445-57.

Tanoue S, Krishnan P, Krishnan B, Dryer SE, Hardin PE. Circadian clocks in antennal neurons are necessary and sufficient for olfaction rhythms in *Drosophila*. *Curr Biol*. 2004; 20;14(8):638-49.

Taye B, Lelisa K, Emanu D, Asale A, Yewhalaw D. Seasonal Dynamics, Longevity, and Biting Activity of *Anopheline* Mosquitoes in Southwestern Ethiopia. *J Insect Sci*. 2016; 21;16(1):6.

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

Teles-de-Freitas R, Rivas GBS, 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; 23;11:614722.

Teles-de-Freitas R, Barboza L, Bruno RV. Off with their heads: analysis of the circadian clock genes expression in the body of *Aedes aegypti*. *Chronobiol Int*. 2021; 26:1-8.

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

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

Upshur IF, Bose EA, Hart C, Lahondère C. Insects. Temperature and Sugar Feeding Effects on the Activity of a Laboratory Strain of *Aedes aegypti*. 2019; 16;10(10):347.

Vanin S, Bhutani S, Montelli S, Menegazzi P, Green EW, Pegoraro M, Sandrelli F, Costa R, Kyriacou CP. Unexpected features of *Drosophila* circadian behavioural rhythms under natural conditions. *Nature*. 2012; 484, 371-376.

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

Yang YY, Liu Y, Teng HJ, Sauman I, Sehnaal F, Lee HJ. Circadian control of permethrin-resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol*. 2010; 56(9):1219-23.

Yao Z, Shafer OT. The *Drosophila* circadian clock is a variably coupled network of multiple peptidergic units. *Science*. 2014; 28;343(6178):1516-20.

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

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

Young MW. Time Travels: A 40-Year Journey from *Drosophila*'s Clock Mutants to Human Circadian Disorders (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 2018; 3;57(36):11532-11539.

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

Yuan Q, Metterville D, Briscoe AD, Reppert SM. Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *Molecular and Biology Evolution*. 2007; 24, 948-55.

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

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



## 7 – Anexo

Estes artigos foram publicados durante o meu doutorado e conta com colaborações internas e externas ao Laboratório de Biologia Molecular de Insetos.

**Artigo 3: Effects of Light and Temperature on Daily Activity and Clock Gene Expression in Two Mosquito Disease Vectors.** Gustavo Bueno da Silva Rivas, Rayane Teles-de-Freitas, Márcio Galvão Pavan, José Bento Pereira Lima, Alexandre Afranio Peixoto, Rafaela Vieira Bruno. (Journal of Biological Rhythms 2018, 33,3. DOI: 10.1177/0748730418772175)

**Artigo 4: Zika infection decreases *Aedes aegypti* locomotor activity but does not influence egg production or viability.** Karine Pedreira Padilha, Maria Eduarda Barreto Resck, Octávio Augusto Talyuli da Cunha, Rayane Teles-de-Freitas, Stéphanie Silva Campos, Marcos Henrique Ferreira Sorgine, Ricardo Lourenço-de-Oliveira, Luana Cristina Farnesi, Rafaela Vieira Bruno (Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2018, 113, 10, e180290, DOI: 10.1590/0074-02760180290)

**Artigo 5: Frequency, active infection and load of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract of male and female dogs.** Viviane Cardoso Boechat, Sandro Antonio Pereira, Artur Augusto Velho Mendes Júnior, Shanna Araujo dos Santos, Luciana de Freitas Campos Miranda, Fabiano Borges Figueiredo, Luiz Claudio Ferreira, Francisco das Chagas de Carvalho Rodrigues, Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira, Rayane Teles -de-Freitas, Rafaela Vieira Bruno, Fernanda Nazaré Morgado, Rodrigo Caldas Menezes (Plos One 2020, 15, 9, e0238188, DOI: 10.1371/journal.pone.0238188)

**Artigo 6: Frequency of co-seropositivities for certain pathogens and their relationship with clinical and histopathological changes and parasite load in dogs infected with *Leishmania infantum*.** Valéria da Costa Oliveira, Artur Augusto Velho Mendes Junior, Luiz Claudio Ferreira, Tatiana Machado Quinates Calvet, Shanna Araujo dos Santos, Fabiano Borges Figueiredo, Monique Paiva Campos, Francisco das Chagas de Carvalho Rodrigues, Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira, Elba Regina Sampaio de Lemos, Tatiana Rozental, Raphael Gomes da Silva, Maria Regina Reis Amendoeira, Rayane Teles-de-Freitas, Rafaela Vieira Bruno,

Fernanda Nazaré Morgado, Luciana de Freitas Campos Miranda, Rodrigo Caldas Menezes (Plos One 2021, 16, 3, e0247560, DOI: 10.1371/journal.pone.0247560)

## 7.1 – Artigo 3

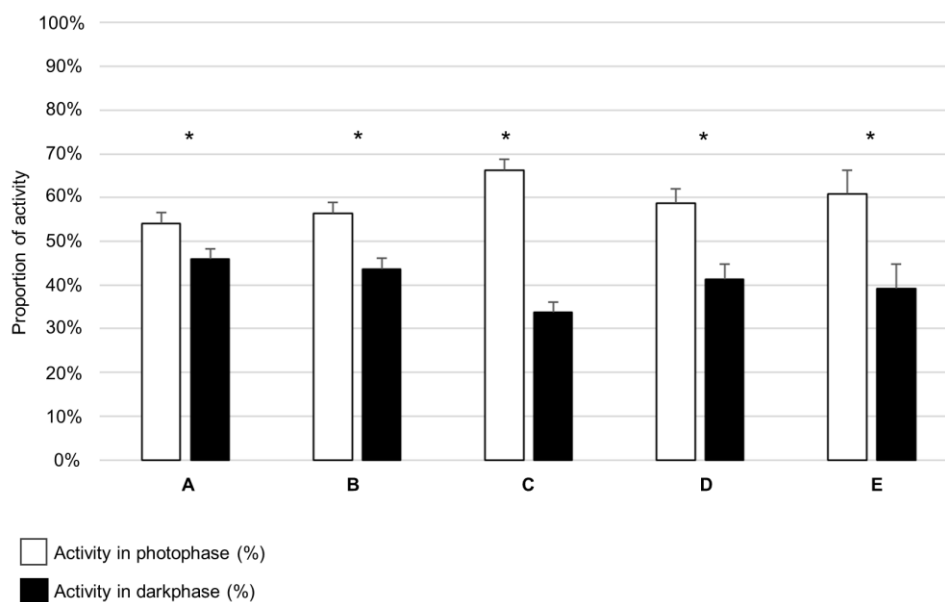
**Effects of Light and Temperature on Daily Activity and Clock Gene Expression in Two Mosquito Disease Vectors.** Autores: Gustavo Bueno da Silva Rivas, **Rayane Teles-de-Freitas**, Márcio Galvão Pavan, José Bento Pereira Lima, Alexandre Afranio Peixoto, Rafaela Vieira Bruno.

Neste trabalho, vimos o efeito dos ciclos de claro e escuro e de temperatura retangulares na atividade e na expressão dos principais genes de relógio de duas espécies diferentes, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. Aqui mostramos que *Aedes aegypti* é mais sensível aos ciclos de temperatura enquanto *Culex quinquefasciatus* é mais sensível aos ciclos de claro e escuro. É o artigo precursor de Teles-de-Freitas et al, 2020.

## Supplementary Material

### Supplementary Figures and Tables

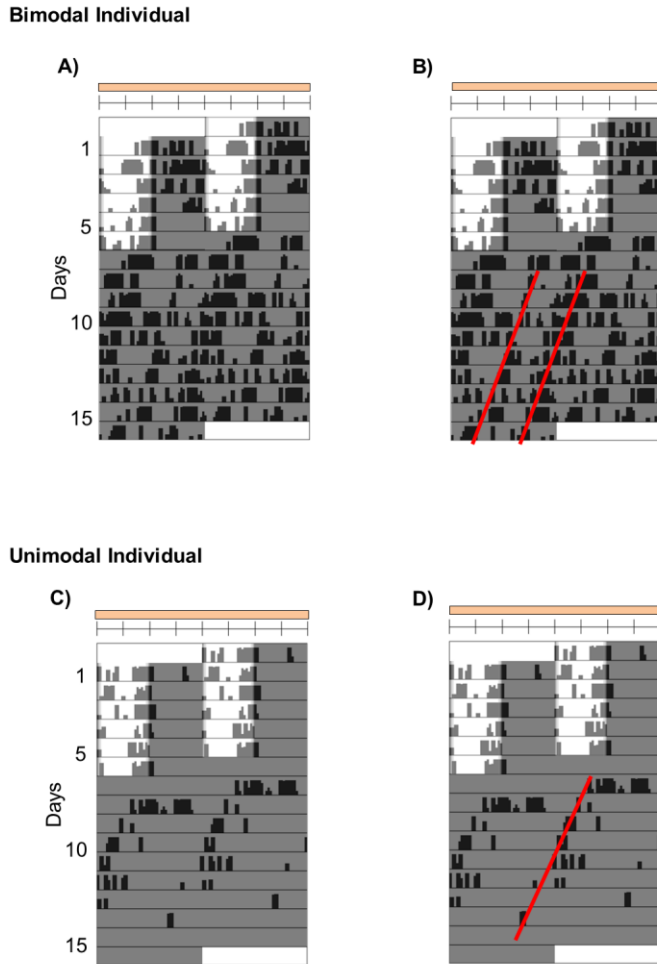
**Fig. S1.**



**Fig. S1. Proportion of activity during the day and the night**

(A-E) Percentage of activity in photophase (white bars, ZT0.5-12) and darkphase (black bars, ZT12.5-24) of *Aedes aegypti* in different conditions. (A) Mosquitoes in gradual LD with constant 25 °C (n = 14). (B) Mosquitoes in gradual LD with in-phase TC (n = 74). (C) Mosquitoes in gradual LD with out-of-phase TC (n = 74). (D) Mosquitoes injected with dsRNA of *LacZ* in gradual LD with out-of-phase TC (n = 18). (E) Mosquitoes injected with nocte dsRNA in gradual LD with out-of-phase TC (n = 13). Asterisks indicate when the difference between groups was significant according to the t-Student test,  $p < 0.05$ .

**Fig. S2.**



**Fig. S2. Individuals with different activity profiles**

(A-D) The mosquitoes were entrained by LD cycles with simulated dawn and dusk (constant temperature, 25°C) for six days. After that, they were kept in constant darkness and temperature (25°C) for 10 days. (A-B) Double-plotted actogram of the same individual with bimodal activity profile. This mosquito showed morning and evening activity peaks in constant darkness and temperature. (A) We showed the bimodal individual actogram without markers or (B) with marked peaks (red line). (C-D) Double-plotted actogram of mosquito with unimodal activity profiles. This individual exhibited only evening activity peak under constant darkness and temperature. (C) We showed the unimodal individual actogram without markers or (D) with marked peaks (red line). Area in actograms represents light/dark conditions: lights on = white, lights off = gray. Orange bars above the actograms indicate temperature regimen (25 °C).

**Fig. S3.**

ATGAAGATTCTCTGGCAGCATGAATGC<sup>a</sup>TTGGGGGGAACTAGGGGGGAGC  
 GAAATGCAAAGCCCAAATTCGCAGCGTTAGATATCAA**CAA****ACTCTACAGC**  
**ACAAGTCGG****G**GAGAATCTCTTGAACCATCAACTCAGAAAAGTGCAGCTCC  
 TCGTAAACATGGAATGCAAAGTTTGGGAAAGGTTCCCTCGGCTCGTCGAC  
 CGCCAGCAAACCTTCCGTCTCTGAAAGCCGAAATCTCCATTCCATCGGATC  
 AGCAAGGCACCTGGGGTAGCGAAGCAGGAGACAACCAAAACAACAACCTCT  
 AGTATTACTTCAACATCAGCAGCACCATCAGCAGCCGCCGGTAGCAGCAC  
 AAATAACAACGCCACGGTTGGTGCCGGAGGTGTGCACAGCACTTCACACG  
 CCAGCAGTTCACAGATTCCCCACTCGGGCGCATCATCCTCTTACAATGG  
 AGTTC**G****A**ACGAGTTC<sup>c</sup>CCCTcGcTGGATGGCACTGGTCAGTATGGTCCGAG  
 CGGCAAACAGC<sup>a</sup>GCATCATCATCTCCACGATGGCACAGACGGCAGAGCGA  
 TGGGTCAGTACATGGAT**GGTCCACAAGTCAGTCTGC**GGCCTCAAACGGAT  
 GCTGCGAGTTGGATGCAGCAACAACAGCAGAGCAGTGGGGGGCGGAAACA  
 ACGCCGGAGGTATGAACGGGCCAAACAGCAACCAACAGGGCCAGGGCCC  
 CCAACAGCAACCAGCTGCACCCCTACCGCCTCAGTTCGGGGCACTGATGC  
 CACCGTTCATGTA

**Fig. S3. Cloned coding sequence of nocte with 762 base pairs (bp)**

ATG (grey) represents the codon of the supposed initial methionine. In red: region used to make oligonucleotides. In yellow: end of an exon. In green: beginning of an exon. Minor letters represent polymorphisms.

Gene	Sense	Name	Sequence (5'-3')
<i>E75</i>	foward	5aeE75RTF01	CCTACTTTGGCATGTCCACTGAA
	reverse	3aeE75RTF01	GGTGAACTTATCGTCCTGGGTCA
<i>cwo</i>	foward	5aecwoRTF01	CGTCTAGGCAAGATCCGCTATCA
	reverse	3aecwoRTF01	CCAGGCAGGAGTTCATCCGATC
<i>nocte</i>	foward	5aenctRTF01	AATTCACCGTTAGCGTTGGCG
	reverse	3aenctRTF01	GCTGCCGACCATTGGGATC
	foward	5aenctRTF01i	<u>TAATACGACTCACTATAGGGCAA</u> ACTCTACAGCACAAGTCGG
	reverse	3aenctRTF01i	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGC</u> AGACTGACTTGTGGACC

**Table S1. List of primers used in qPCR and RNAi assays in *Ae. aegypti***

		Gene								
		<i>per</i>	<i>tim</i>	<i>cry2</i>	<i>cyc</i>	<i>Pdp1</i>	<i>vri</i>	<i>Clk</i>	<i>E75</i>	<i>cwo</i>
DD with gradual TC	<i>F</i> <sub>5,24</sub>	92.02	33.62	13.53	23.81	12.84	11.09	<b>1.737</b>	<b>0.77</b>	<b>0.32</b>
	<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<b>0.2 (ns)</b>	<b>0.59 (ns)</b>	<b>0.89 (ns)</b>
LD with in-phase TC	<i>F</i> <sub>5,24</sub>	390.1	15.25	7.919	21.28	21.72	8.08	<b>2.85</b>	<b>1.12</b>	<b>0.83</b>
	<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<b>0.06 (ns)</b>	<b>0.39 (ns)</b>	<b>0.55 (ns)</b>
LD with TC in anti-phase	<i>F</i> <sub>5,24</sub>	263.3	<b>1.75</b>	6.98	23.94	90.33	5.01	<b>2.02</b>	<b>0.43</b>	<b>0.3</b>
	<i>P</i>	<0.001	<b>0.18 (ns)</b>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01	<b>0.12 (ns)</b>	<b>0.82 (ns)</b>	<b>0.91 (ns)</b>

**Table S2. Statistical Analysis of the Circadian Expression of Clock Genes in *Ae. aegypti*.**



		ZT	-12	-8	-4	0	+4	+8	+12
<i>per</i>	DD with seminatural TC	17				●			
	DD with rectangular TC	13			■				
	Rectangular LD with constant temperature	17				▲			
	Seminatural LD and TC	17				●			
	Rectangular LD and TC	13			■				
<i>tim</i>	DD with seminatural TC	13				●			
	DD with rectangular TC	9			■				
	Rectangular LD with constant temperature	13				▲			
	Seminatural LD and TC	13				●			
	Rectangular LD and TC	9			■				
1 <sup>st</sup> peak of <i>cry2</i>	DD with seminatural TC	1				●			
	DD with rectangular TC	1				■			
	Rectangular LD with constant temperature	1				▲			
	Seminatural LD and TC	1				●			
	Rectangular LD and TC	1				■			
2 <sup>nd</sup> peak of <i>cry2</i>	DD with seminatural TC	17				●			
	DD with rectangular TC	21					■		
	Rectangular LD with constant temperature	17				▲			
	Seminatural LD and TC	17				●			
	Rectangular LD and TC	17				■			
<i>cyc</i>	DD with seminatural TC	1				●			
	DD with rectangular TC	21			■				
	Rectangular LD with constant temperature	5					▲		
	Seminatural LD and TC	5					●		
	Rectangular LD and TC	1				■			
<i>vri</i>	DD with seminatural TC	9				●			
	DD with rectangular TC	9				■			
	Rectangular LD with constant temperature	9				▲			
	Seminatural LD and TC	9				●			
	Rectangular LD and TC	9				■			
<i>Pdp</i>	DD with seminatural TC	17				●			
	DD with rectangular TC	13			■				
	Rectangular LD with constant temperature	21					▲		
	Seminatural LD and TC	17				●			
	Rectangular LD and TC	13			■				

**Table S3. Expression peaks of clock genes in different regimens**

The expression profile of clock genes described in DD with rectangular TC, rectangular LD and TC (Rivas et al., 2018) and rectangular LD with constant temperature (25°C) (Gentile et al., 2009) were re-examined using the same interval of 4 hours between ZTs that we applied under DD with seminatural TC and seminatural LD and TC (i.e., ZTs 1, 5, 9, 13, 17 and 21). The third column shows the ZT where we observed the peak of gene expression in each condition. To compare the expression variation between the regimens in a homogeneous manner between the genes, the peak of expression in all conditions was normalized with peak of expression in DD with seminatural TC (grey lines). Positive and negative signals represent delays and advances in the phases of expression peak, respectively. Delays longer than +12 are considered as phase advances. Advances less than -12 are considered as phase delays. For example, *per* has a peak expression at ZT 17 in DD with seminatural TC and at ZT 13 in DD with rectangular TC. Thus, once we used the expression in DD with seminatural TC as a normalizing profile, this gene advanced -4 ZTs in DD with rectangular TC ( $13 - 17 = -4$ ). On the other hand, *cyc* has a peak of expression in ZT 1 in DD with seminatural TC and in ZT 21 in DD with rectangular TC. Thus, it is more likely this gene has advanced -4 ZTs than delayed +20 ZTs in DD with rectangular TC. Therefore, we use the correction factor -24 for indices greater than +12 and +24 for indices smaller than -12. In the last example, we would have:  $21 - 1 - 24 = -4$ . We used the circle for conditions in which the temperature cycles were seminatural. The squares represent regimens in which the temperature cycles were rectangular and the triangle only occurs when the temperature is constant. Note that all of the genes that anticipated their peak of expression were in rectangular TC (square symbol). Since *E75* and *cwo* had not been observed by Gentile *et al.* 2009 and Rivas *et al.*, 2018, we could not compare those genes. *Clk* was not considered either, because it was arrhythmic in all conditions. *tim* presented borderline statistics in LD with constant temperature and we considered it in this analysis (Gentile *et al.*, 2009).

		ZT	-12	-8	-4	0	+4	+8	+12
trough of <i>per</i>	DD with seminatural TC	5				●			
	DD with rectangular TC	5				■			
	Rectangular LD with constant temperature	5				▲			
	Seminatural LD and TC	5				●			
	Rectangular LD and TC	5				■			
trough of <i>tim</i>	DD with seminatural TC	5				●			
	DD with rectangular TC	1			■				
	Rectangular LD with constant temperature	9					▲		
	Seminatural LD and TC	5				●			
	Rectangular LD and TC	1			■				
trough of <i>cry2</i>	DD with seminatural TC	9				●			
	DD with rectangular TC	5			■				
	Rectangular LD with constant temperature	9				▲			
	Seminatural LD and TC	9				●			
	Rectangular LD and TC	9				■			
trough of <i>cyc</i>	DD with seminatural TC	13				●			
	DD with rectangular TC	9			■				
	Rectangular LD with constant temperature	13				▲			
	Seminatural LD and TC	13				●			
	Rectangular LD and TC	13				■			
trough of <i>vri</i>	DD with seminatural TC	1				●			
	DD with rectangular TC	21			■				
	Rectangular LD with constant temperature	21			▲				
	Seminatural LD and TC	21			●				
	Rectangular LD and TC	1				■			
trough of <i>Pdp</i>	DD with seminatural TC	5				●			
	DD with rectangular TC	1			■				
	Rectangular LD with constant temperature	5				▲			
	Seminatural LD and TC	5				●			
	Rectangular LD and TC	5				■			

**Table S4. Expression trough of clock genes in different conditions**

The whole process of analysis and reference of each condition was conducted exactly as described in table S.2, with the only difference that here we described the expression trough of the genes. The third column exhibits the corresponding ZT to the trough of gene expression in each condition. Note that the majority of the genes that anticipated their expression trough were in rectangular TC (square symbol). Since *E75* and *cwo* had not been observed by Gentile *et al*, 2009 and Rivas *et al*, 2018, we could not compare them. *Clk* was not considered either, because it was arrhythmic in all conditions. *tim* presented borderline statistics in LD with constant temperature and we considered it in this analysis (Gentile *et al.*, 2009).

**Supplementary references**

1. Gentile, C., Rivas, G.B.S, Meireles-Filho, A.C., Lima, J.B.P. and Peixoto, A.A. (2009). Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: *cry2* is different. *J Biol Rhythms* 24, 444-451. doi: 10.1177/0748730409349169.
2. Rivas, G.B.S., Teles-de-Freitas, R., Pavan, M.G., Lima, J.B.P., Peixoto, A.A. and Bruno, R.V. (2018). Effects of Light and Temperature on Daily Activity and Clock Gene Expression in Two Mosquito Disease Vectors. *J Biol Rhythms*. 33, 272-288. doi: 10.1177/0748730418772175.

## 7.2 – Artigo 3

**Effects of Light and Temperature on Daily Activity and Clock Gene Expression in Two Mosquito Disease Vectors.** Autores: Gustavo Bueno da Silva Rivas, **Rayane Teles-de-Freitas**, Márcio Galvão Pavan, José Bento Pereira Lima, Alexandre Afranio Peixoto, Rafaela Vieira Bruno.

Neste trabalho, vimos o efeito dos ciclos de claro e escuro e de temperatura retangulares na atividade e na expressão dos principais genes de relógio de duas espécies diferentes, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. Aqui mostramos que *Aedes aegypti* é mais sensível aos ciclos de temperatura enquanto *Culex quinquefasciatus* é mais sensível aos ciclos de claro e escuro. É o artigo precursor de Teles-de-Freitas et al, 2020.

### 7.3 – Artigo 4

**Zika infection decreases *Aedes aegypti* locomotor activity but does not influence egg production or viability.** Autores: Karine Pedreira Padilha, Maria Eduarda Barreto Resck, Octávio Augusto Talyuli da Cunha, **Rayane Teles-de-Freitas**, Stéphanie Silva Campos, Marcos Henrique Ferreira Sorgine, Ricardo Lourenço-de-Oliveira, Luana Cristina Farnesi, Rafaela Vieira Bruno.

Neste artigo, parte das dissertações de mestrado das alunas Karine Padilha (PPG-BCM) e Maria Eduarda Resck (PPG-BP), verificamos que a infecção pelo vírus Zika afeta o comportamento locomotor das fêmeas de *Aedes aegypti* mas não a sua fecundidade ou fertilidade.

#### 7.4 – Artigo 5

**Frequency, active infection and load of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract of male and female dogs.** Autores: Viviane Cardoso Boechat, Sandro Antonio Pereira, Artur Augusto Velho Mendes Júnior, Shanna Araujo dos Santos, Luciana de Freitas Campos Miranda, Fabiano Borges Figueiredo, Luiz Claudio Ferreira, Francisco das Chagas de Carvalho Rodrigues, Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira, **Rayane Teles -de-Freitas**, Rafaela Vieira Bruno, Fernanda Nazaré Morgado, Rodrigo Caldas Menezes.

Este artigo, realizado em colaboração com o Dr. Rodrigo Menezes (INI/FIOCRUZ), mostra a infecção ativa de *Leishmania infantum* no aparelho reprodutor de cães. Nossa participação na colaboração foram as análises de quantificação do parasito nas amostras.

## 7.5 – Artigo 6

**Frequency of co-seropositivities for certain pathogens and their relationship with clinical and histopathological changes and parasite load in dogs infected with *Leishmania infantum*.** Autores: Valéria da Costa Oliveira, Artur Augusto Velho Mendes Junior, Luiz Claudio Ferreira, Tatiana Machado Quinates Calvet, Shanna Araujo dos Santos, Fabiano Borges Figueiredo, Monique Paiva Campos, Francisco das Chagas de Carvalho Rodrigues, Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira, Elba Regina Sampaio de Lemos, Tatiana Rozental, Raphael Gomes da Silva, Maria Regina Reis Amendoeira, **Rayane Teles-de-Freitas**, Rafaela Vieira Bruno, Fernanda Nazaré Morgado, Luciana de Freitas Campos Miranda, Rodrigo Caldas Menezes.

Este artigo, segundo produto de colaboração com o Dr. Rodrigo Menezes, ajudamos na quantificação por PCR quantitativo em tempo real, de parasitos em amostras de cães infectados por *Leishmania infantum*.