

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CARLA GENTILE

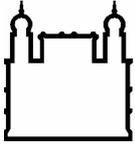
Genética Molecular dos Ritmos Circadianos em Mosquitos Vetores
(Diptera: Culicidae)

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

Orientador: Dr. Alexandre Afrânio Peixoto

RIO DE JANEIRO

2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: **CARLA GENTILE**

Genética Molecular dos Ritmos Circadianos em Mosquitos Vetores
(Diptera: Culicidae)

ORIENTADOR (ES): Dr. Alexandre Afrânio Peixoto

Aprovada em: 08 / 03 / 2007

Examinadores:

Dr. Luciano Andrade Moreira – Presidente da banca examinadora
FIOCRUZ / Instituto de Pesquisa Rene Rachou / Laboratório de Malária

Prof. Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira
UFRJ / Instituto de Bioquímica Médica

Dra. Samira Chahad Ehlers
UFPR / Setor de Tecnologia / Departamento de Engenharia Química

Prof. Dr. Marcos Henrique Sorgine
UFRJ / Instituto de Bioquímica Médica

Dr. José Bento Pereira Lima
FIOCRUZ / Instituto Oswaldo Cruz / Departamento de Entomologia

Rio de Janeiro, 8 de março de 2007

Dedico esta tese à minha família
e a todos aqueles que admiram e apoiam a ciência.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Foram utilizados recursos da Fundação Oswaldo Cruz, CNPq, Guggenheim Foundation e Howard Hughes Medical Institute.

Agradecimentos

Ao concentrar-me para escrever esses agradecimentos, um turbilhão de imagens de pessoas importantes e momentos marcantes me vêm à mente. Entretanto, sem sombra de dúvidas meus primeiros agradecimentos vão para meus pais, Décio e Yara. Sempre tive a sorte de contar com o apoio incondicional de ambos que, mesmo sem entender exatamente do que se tratavam minhas pesquisas, mostravam-se orgulhosos e incentivadores. Houve momentos em minha vida que, pelos motivos mais óbvios, tive dúvidas se deveria seguir na carreira de bióloga, mas a certeza de poder contar com o apoio deles me deu forças e coragem para escolher o que eu realmente gostaria de fazer em minha vida. Certamente os agradecimentos estendem-se a demais membros de minha família. Meu irmão e sua família, tios, tias, primas, primos, em especial aos gêmeos Rodrigo e Renato, meus *body guards* de quem sempre fui muito próxima. Considero-me uma pessoa de muita sorte pela família que tenho.

O próximo na lista de prioridades quanto a agradecimentos é meu orientador, Alexandre Peixoto. E nesse momento respiro fundo para buscar inspiração e tentar descrever minha gratidão a essa pessoa maravilhosa. Entretanto, eu teria que contar uma história longa para passar a idéia do quanto ele é importante para mim. Tentarei ser breve. Na minha primeira aula de ciências na oitava série.... brincadeira (afinal, sou conhecida pelas minhas explicações sem-fim). Vamos mais adiante no tempo. Ao final do meu mestrado, passei por um momento profissional muito difícil e cheio de dúvidas (aliás, comum a muitos estudantes no final de seus mestrados e doutorados). Mas eu sabia que gostaria de trabalhar com comportamento em insetos e biologia molecular. Inclusive, escolhi a graduação em ciências biológicas pela minha fascinação, quando no segundo grau, pela biologia molecular. Entretanto, um universo de fatos ao longo da graduação (entre projetos iniciados e cancelados, professores ruins presentes ou bons que viajaram para o exterior na época), me distanciaram desta área. Em minha busca, conversava com pesquisadores e amigos na Fiocruz para tentar encontrar um caminho. Quando eu descrevia meu interesse, pessoas diferentes falavam imediatamente: “Procure Alexandre Peixoto”. E fui conhecê-lo. Nunca vou me esquecer aquele dia por volta de novembro ou dezembro de 2001 em que fui pela primeira vez a seu laboratório. Nesta hora, agradeço às minhas amigas Dani Fabrino e Carol Magalhães dos Santos (que trabalha com Triatomíneos, pois são várias Carois...) que me levaram ao laboratório do Alexandre e me apresentaram a ele. Naquele dia conversamos, e falei (muito) sobre mim e minha experiência até ali, e de como eu gostaria de trabalhar com estudos moleculares e comportamento em mosquitos. E ele me

respondeu: “Claro, vamos tentar. Eu nunca trabalhei com mosquitos antes na vida, mas é só você ir ao IBEX e trazer alguns que a gente começa.” A simplicidade de sua resposta mudou minha vida completamente. Como em todas as grandes coisas que realmente importam na vida, a mágica e a elegância estão na simplicidade.

Comecei a trabalhar no seu laboratório em janeiro de 2002. Um ano depois estava entrando no Doutorado. Com isso, foram até hoje, no total, cinco anos tendo o privilégio de trabalhar no grupo de um pesquisador cuja vida é um exemplo para todos os seus alunos. Sua inteligência e capacidade de administrar raciocínio sobre tantas coisas paralelas são às vezes constrangedoramente geniais. Digo constrangedoras porque, ao menos no meu caso, às vezes chegavam a me fazer sentir limitada intelectualmente. E sua genialidade manifesta-se no caos de seu escritório, comuns aos escritórios dos dotados de mentes brilhantes, onde apenas os superiormente inteligentes conseguem se entender. E ele ainda possui uma qualidade que poucos alunos de mestrado e doutorado têm a sorte de contar: ele realmente sabe matemática e estatística! Não bastassem suas qualidades como pesquisador, o mais surpreendente está na sua personalidade e carisma. Eu costumo dizer que para uma vida feliz, é preciso ser feliz todos os dias um pouquinho. E conviver com o Alexandre trabalhando no seu grupo é certeza disso. Para os que o conhecem, sabem do que estou falando, pois a opinião é unânime. Para os que não o conhecem, é quase inútil tentar descrever o quão agradável, positivo e leve é trabalhar na sua equipe. É simplesmente uma experiência que precisa ser vivida.

Meus mais sinceros agradecimentos também a todo o grupo com o qual tive o prazer de trabalhar ao longo desses anos. Nunca soube de outro grupo onde fatos e eventos negativos de qualquer natureza fossem tão raros. Vou tentar citar todos meus colegas um a um. Primeiramente, agradeço a Antônio Meireles Filho, a quem gosto de chamar de meu co-orientador. Foi ele quem me acompanhou nos primeiros passos no laboratório, me ensinando as técnicas básicas de biologia molecular, e com quem compartilhei os momentos de alegria e desespero quando começávamos a engatinhar na técnica de PCR em tempo real, uma vez que não havia ninguém mais experiente para nos ensinar os detalhes. É divertido lembrar disso agora.

Em seguida, quero agradecer a minha querida amiga Camila Mazzoni, a Camilette. Engraçado como demoramos um tempo para nos tornarmos as amigas que somos hoje. Nos primeiros anos era apenas o contato no laboratório, mas fomos nos aproximando por várias coincidências e de repente eram tantas programações que raramente íamos para o laboratório sem ser no mesmo carro, pois seja o que fosse que fizéssemos após o trabalho, íamos juntas. A viagem para nossos respectivos doutorados sanduíche aconteceu no mesmo dia, 1º de maio de 2005, precedida por uma incrível festa de despedida em Santa Tereza. Até o Alexandre foi. Sem

falar de nossos namorados “gringos” os quais começamos a namorar quase na mesma época, o meu inglês e o dela alemão, e nossos planos para um pós-doutorado na Europa. Minha querida amiga já está lá nesse momento e espero conseguir me juntar a ela no velho continente (na realidade, no meu caso, na ilha próxima a ele) em breve. Camilette foi uma amiga muito importante nos últimos anos, me dando incrível apoio desde questões do cotidiano no laboratório até os dramas que vivemos por nossos namorados que vivem em outro país, passando por muitas boas histórias envolvendo cursos, viagem a turismo, cinemas, teatros, festas, saídas à noite, shows, almoços na minha casa, na casa dela, várias histórias no nosso período de sanduíche na Europa, etc. Agradeço imensamente por seu jeito doce e animado de viver a vida e tenho certeza que vamos continuar sendo grandes amigas para sempre. Há certas coisas que conquistamos na vida que não se perdem mais. Como uma grande amizade.

Seguindo com os mais antigos no lab, tenho que agradecer a meu queridíssimo amigo João, ou JG, ou John-John, ou qualquer coisa que você queira chamar. Ele atende. João além de muito inteligente é uma peça rara e precisaria de uma tese inteira para descrevê-lo. Costumo dizer que ele está vivo até hoje graças a sua doçura e carisma, pois do contrário já teria sido esganado há muito tempo. Quem já trabalhou com ele no laboratório sabe do que estou dizendo. João foi o primeiro, depois de mim, a trabalhar com mosquitos no laboratório, o que me deu a chance interagir com ele (e quase esganá-lo) em muitas oportunidades. Alex costumava dizer que éramos a equipe 5’---3’ de mosquitos: totalmente *anti-sense*. John-John, eu te adoro. Você vai longe. Boa sorte com seu doutorado na Inglaterra. Aproveito para agradecê-lo novamente a iniciativa de montar uma biblioteca digital de artigos sobre relógio biológico. Me ajudou muito ao escrever esta tese.

E não se fala de João sem falar de Renata. Renata Wan Der Maas Azevado, ou Renata Wan Der Walls, ou simplesmente Renata hahaha. Claro. Sua risada é inconfundível impossível passar despercebida, como sua presença em nossas vidas. Renatinha, vamos nos divertir muito na Inglaterra! E rir muito do seu marido figura.

Não é justo agradecer aos mais antigos no lab sem falar do Kiko! Quem não conhece o Kiko? E o que dizer de alguém como o Kiko??? Sabe, esses agradecimentos me fazem realizar que tenho amigos muito estranhos... mas o que importa é que são super-queridos. Não convivi muito tempo com Kiko no laboratório do Alexandre por ele ter ido fazer doutorado na Inglaterra, mas ele é o tipo de pessoa que não se afasta. Sempre manteve contato com o grupo. Seu espírito alegre (quase em duplo sentido) e seu jeito engraçado e bizarro de ser tornam-no marcante em nossas vidas. Kiko, vai ser um enorme prazer e honra poder ter trabalhar com você na bancada agora que o filho à casa torna.

Agradeço também à pupila do Kiko, a querida Saori Araki, ou Saorita, que se diz argentina, mas há quem diga se tratar de uma japonesa paraguaia de Araki (Saorita, você sabe que é brincadeira). Quem vê a foto da Saori que uso no meu slide de agradecimento em minhas apresentações, nem desconfia que aquela lindinha com cara de bonequinha de louça japonesa é uma das mais sarcásticas figuras do grupo. Nem tente desafiar a Saori com qualquer tipo de piada pois ela vai conseguir te superar. Não é à toa que é pupila do Kiko...

Depois da Saori, não pode vir outra pessoa na ordem de agradecimentos que não o Gabriel, ou Gigio, assim apelidado pela própria Saori, por ser seu “aluno prodígio”. Gabriel, obrigada pelo companheirismo, espírito amigo e tranquilidade que você passa. Afinal, imagina se todos no laboratório fossem desesperados como eu? Que bom que temos pessoas como você!!

A Gustavo Rivas, o Batman, agradeço por sua incomparável cultura em desenhos animados, bizarra habilidade em imitar vozes e fazer movimentos ninjas no meio do laboratório e seu humor em geral, tão peculiar. Por tudo isso, foi responsável por muitas de minhas crises de risos. Gustavo é também meu querido herdeiro. Fico muito feliz por saber que alguém tão meticoloso (e doido, pois isso também é importante) vai poder dar prosseguimento aos estudos de expressão gênica em mosquitos. Tenho certeza de que ele fará um excelente trabalho.

A Felipe Vigoder, grande parceiro de laboratório, que chegou a fazer parte das primeiras turmas que me acompanhavam nas viradas de noite para eu não ficar só, e com quem fiz ótimos escambos musicais. Não de som de insetos, claro, que disso a gente já está satisfeito no laboratório.

Sinto não poder dedicar um parágrafo a cada um... não por falta de mérito ou assunto, mas por ter que manter um limite razoável no tamanho desses agradecimentos e acho que já passei dele. Então, vou tentar ser mais concisa.

Agradeço às meninas que iniciei no laboratório e que continuam até hoje: Luísa, Rachel Canto, Tamara, Ingrid (apesar de ter migrado para a turma do som, ou seja, para o Felipe Vigoder). Dá gosto incorporar ao “time dos mosquitos” pessoas dedicadas e competentes quanto vocês. E também às meninas que iniciei mas que já não estão mais no grupo: Tatiana Tilli, Marcelle Rey e Bruna. Agradeço à todas pela honra de ter ensinado a vocês alguma coisa, e pelo convívio e crescimento oriundos de nossa interação. E desculpem qualquer coisa... como o Alex diz, às vezes parece que estou brigando, mas eu não estou, entendem? Eu desejo tudo de bom a vocês.

Obrigada à Rachel Lins, outra das antigas, embora às vezes sumidinha. Rachel, eu admiro sua obstinação pelo que decide fazer. Aliando essa qualidade à sua inteligência e preparo, eu tenho certeza que sempre atingirá seus objetivos. Outra qualidade que tenho que agradecer é seu espírito de coletividade. E não digo isso apenas por cuidar das pipetas, embora

isso já fosse motivo de sobra. Mas é por muito mais. Não tem uma vez que alguém ou o laboratório como um todo precise de alguma coisa e que você não faça tudo o que pode para ajudar. Se metade das pessoas tivessem esse espírito de grupo o mundo seria um lugar melhor para se viver.

Agradeço também à Denise Dias, outra pessoa tão dedicada ao trabalho e sempre animada, por seu exemplo. É preciso talento para equilibrar na vida tantas responsabilidades com casa, filhas, marido, emprego e doutorado. Parabéns Denise.

Com que palavras agradecer ao Paulo Amoretti? Paulette, Pedrão, o que seja. Ainda quando trabalhava como técnico no laboratório, nem sei quantos mini-preps ele fez para mim, principalmente na época em que tive problema no punho. E não é só isso. Paulo é uma dessas pessoas que vieram espalhar a paz sobre a Terra. Obrigada por ser um parceiro tão legal de laboratório e uma pessoa tão maravilhosa.

Outro a que não sei por onde começar a agradecer é o Robson, nosso querido técnico. Meio doido, claro, como quase todos do grupo. Robson parece aquelas formigas cortadeiras carregando coisas para lá e para cá, dando um jeito de colocar tudo que precisamos em algum lugar, e também tudo que não precisamos... o fato é que, se você precisa de alguma coisa, o Robson tem. Se não tem, ele faz. Se não pode fazer, ele sai e arruma, sabe-se lá como, em questão de instantes. E traz de carona vários artefatos não identificados possivelmente aproveitáveis para alguma coisa... qualquer coisa... nem que seja de peso para segurar a porta, como o tijolo de concreto que ele trouxe uma vez. E que maravilha que é trabalhar num laboratório onde nunca faltam placas prontas com meio de cultura, soluções, reagentes... só alguém com grande dedicação pode manter tantas coisas em dia por tanto tempo. E tem ainda as grandes bagunças, como os churrascos na sua casa. Robão, obrigada por tantas coisas!

Chegou a vez dos mais novatos no laboratório, os calouros (que tal serem chamados de calouros? qual foi a última vez que vocês foram chamados assim?). A começar pela Lourdinha, esposa do Robson, agora secretária do Alex. Lourdinha, você é uma santa por conseguir agüentar o doido do seu marido. Muito obrigada por contribuir tão positivamente com o grupo, por seu temperamento maravilhoso e seu trabalho em geral. Obrigada ao outro novato Ricardo, você tem um astral maravilhoso e em pouco tempo já se tornou muito querido por todos nós. Diverti-me de mais te ensinando a fazer extração de RNA para os real times e você com aquele protocolo colorido que eu imprimi, sobre uma tampa de isopor, indo atrás de mim e copiando cada palavra... que figura! O Alex só poderia atrair para perto de si alguém de alto astral e coração muito bom como você. Boa sorte e tenho certeza que vai contribuir em muito com o laboratório e ajudar o Alex a geri-lo (apesar de você também ser homem e... bem, convenhamos, organização não é o forte do gênero, hehehe). Obrigada à Patrícia Hessab, Pat, por sua rápida

porém marcante passagem pelo lab. Tão marcante e fecunda que saiu até grávida! Falando sério, Pat, você não saiu do lab, apenas está trabalhando em outra sala. Na do IBEX. E obrigada também à Rafaela Bruno, a Rafa, outra totalmente de bem com a vida, e contribuição de altíssimo nível ao grupo de relógio de mosquito. Rafinha, monte o império das proteínas no lab! E ainda à Sabrina, “a maior de todas”, minha quase vizinha, cuja personalidade alegre não tem como passar despercebida.

Agora meus agradecimentos a três pessoas que já não trabalham no laboratório. Primeiramente, à Wanda, até porque ela não conta como alguém que realmente saiu do laboratório. Não tem uma confraternização que ela não esteja. Cheia de estórias para contar. Está aí alguém que fala mais que eu! Wandinha, (ou Bandinha, como diz a Saori), você virou parte da família do lab. Nunca se afaste da gente! Em segundo à Marcelle Bottechia. Convivemos muito pouco no laboratório, mas Marcelle é dessas pessoas que não esquecem os amigos e sempre passa para dar um alô. Até na Inglaterra ela foi me visitar! Obrigada Marcelle, você tem um coração de ouro e um bom humor contagiante. O terceiro a agradecer é Felipe Gomes, o Gogo. Esse se afastou mais desde que saiu do grupo há algum tempo, mas não posso deixar de fazer um agradecimento bem específico: obrigada pela idéia das forminhas de brigadeiro! Poucas pessoas sabem do que estou falando, e menos ainda tem a mais vaga noção de como a sua idéia tornou mais fácil minha tarefa de preparar os mosquitos para os experimentos. Felipe, esse tipo de companheirismo em tentar ajudar e dar idéias construtivas é que tornam um grupo forte.

Preciso agradecer de forma muito especial a três pessoas muito queridas. Parte da população flutuante, permeiam entre o laboratório da Denise Valle e do Alex. Começo por Gustavo Resende, o Tatu, e Ademir. Nunca vou me esquecer aquele curso que fizemos juntos no Recife, no Aggeu Magalhães, quando tive a oportunidade de me aproximar de vocês. Nós os chamávamos de “os Robbits”, lembram? Foi tão legal... Ademir, você é uma das pessoas mais “sem noção” que eu conheço, mas é uma criaturinha adorável. As coisas mais engraçadas eu nem posso comentar aqui de tão absurdas. Muito obrigada por me fazer rir tantas vezes, pelo carinho, pela amizade, pela dedicação. Tatu, também nos tornamos grandes amigos, não é mesmo? Desde o curso do Aggeu Magalhães já fizemos muitas coisas juntos, desde os shows da sua banda, inclusive aquele no meu aniversário, até desfile na Sapucaí. E isso sem falar nas empreitadas no laboratório, que recentemente incluíram sua iniciação no “estranho mundo do real time PCR”, começando logo com o pé direito (ou não) me acompanhando em uma bela virada de 24 horas de experimento com direito a várias zebras na sua curva padrão. É isso aí, esse é o caminho! Se fosse fácil não teria graça. E ainda, agradeço à minha queridíssima amiga Jutta! Admiro tanto sua energia, alegria de viver, disposição, doçura, competência,

conhecimento... tantas coisas! Você é uma grande companheira de trabalho, de saídas à noite, de caminhadas, jantares, festas... você é um exemplo em tantos sentidos! Obrigada por ser uma pessoa tão maravilhosa e enriquecedora.

Saindo dos muros do laboratório, meus agradecimentos espalham-se primeiro à nosso laboratório-irmão, o LAFICAVE. Definitivamente essa tese não teria acontecido se não fosse pelo dedicado trabalho de Denise Valle, Bento e sua equipe naquele laboratório. Obrigada a pela impressionante competência em manter tantas colônias de mosquitos no laboratório, dentre as quais as duas com as quais minha tese foi desenvolvida. Denise, em especial quero expressar minha admiração por administrar tantas coisas no seu laboratório, dentre colônias de insetos, várias pesquisas interessantes e obras... muitas obras... e os militares... muitos militares... e tudo funciona incrivelmente bem. Sem falar no mega-super-evento Arthromint! Eu não sei se sou parecida com você em tantas coisas apenas pelo temperamento natural geneticamente programado ou pela admiração que tenho por você.

Outro laboratório fundamental no desenvolvimento de minha tese foi o da Dra. Constança Britto. O apoio irrestrito aos meus experimentos com o qual pude contar em seu laboratório foi decisivo para que essa tese chegasse até onde chegou. Afinal, se eu não pudesse ter acesso, por exemplo, a uma chave do seu laboratório, como poderia virar noites e noites fazendo PCR em tempo real? E se não fosse por isso, meus resultados seriam bem menos interessantes. Um agradecimento especial à Angélica, técnica responsável pela manutenção do equipamento, sempre tão dedicada, mantinha tudo funcionando na mais perfeita ordem. Além do lado profissional, agradeço à Constança e sua equipe pela amizade e carinho. Como isso faz diferença e torna a vida e o trabalho melhores. Em especial à Constança, Angélica e Daniela, obrigada por tantos papos legais e descontraídos, bem como por aqueles relacionados ao trabalho, onde pude aprender tanto com vocês.

Agradeço ao Laboratório de Wim Degraeve e sua equipe, em especial a Leila Mendonça Lima, Thomas Otto, Érico. Essa equipe altamente competente é responsável pela Plataforma Genômica - Seqüenciamento de DNA / PDTIS-FIOCRUZ. Apesar de eu ter feito a maior parte do seqüenciamento genético de minha tese no antigo seqüenciador do departamento, tive o prazer de contar com os serviços deste grupo no final de minhas pesquisas. A Thomas Otto agradeço por muito mais, pois tornou-se um grande amigo, além desse alemão saber muito mais sobre o Rio de Janeiro do que eu e me ajudar inúmeras vezes a chegar a lugares onde nem com auxílio de mapas eu chegaria. Thomas, obrigada também por me salvar nos momentos de crise em minhas análises dos bancos de genomas, em que eu estava a ponto de jogar o computador pela janela.

Agradeço a Leila mais uma vez por ser a diretora do departamento, dedicada e altamente comprometida com seu trabalho, sempre disposta e ativamente buscando a melhora das condições gerais e administrativas do departamento para proporcionar um melhor ambiente de trabalho para todos nós. Agradeço também ao diretor anterior, Ricardo Galler. Apesar de ser um pesquisador tão ocupado nunca deixou de me receber com uma conversa agradável e incentivadora. Nunca vou me esquecer do apoio que me deu para eu fazer meu doutorado sanduíche na Inglaterra, no grupo do Prof. Andréa Crisanti, o que mudou minha vida em muitos sentidos.

Agora que mencionei, chegou a vez de agradecer ao Prof. Andréa Crisanti, por ter me aceito em seu laboratório no meu doutorado sanduíche. Agradeço a ele e a sua equipe toda pela oportunidade e por tudo que aprendi. Desde Lucy, sua secretária, que tanto me ajudou e ajuda até hoje com qualquer coisa que eu precise, passando por seus *Pós-Docs*, Walter, Tânia e Flaminia, pelos técnicos que tanto me ajudaram, Kate, Sara, Gianmaria, Lieta, e ainda os alunos de doutorado com os quais convivi por tantos meses, Francesca, Cassi, Christina, Jason, Kalle, Qiu, Elena, Giorgio, Philippos. Em especial Kate e Christina, que me acompanharam na bancada em ensinado as técnicas que eu precisava aprender. Mas... falta uma pessoa... Julian!!! O mais produtivo de todos os meus resultados ao longo da tese, Julian era o aluno de doutorado que sentava ao meu lado nas mesas dos estudantes e que em um mês e meio depois de eu chegar à Inglaterra, tornou-se meu namorado. Sem dúvida foi o mais feliz dos acontecimentos em minha experiência do doutorado. *Julian, thank you so much for being such an outstanding human being and extraordinary boyfriend. I had a happy and interesting life before meeting you, but you have brought so much more joy and happiness to it you can't even imagine. You are perfect for me.*

Gostaria, ainda, de agradecer ao grupo do Prof. Fotis Kafatos, em especial a Sofia Pinto, que paciente e docemente me ensinou as técnicas de injeção nos mosquitos e com quem sempre podia discutir meus resultados. Nesse sentido, agradeço também a Tarso e Stephan, também do grupo do Prof. Kafatos, que tinham uma enorme paciência comigo, e a Idir que me ajudou nos PCRs em tempo real. Outra pessoa do Imperial College a quem devo muito é Laurence, responsável pelo PCR em tempo-real do departamento. Com ela aprendi alguns detalhes que revolucionaram meus resultados, proporcionando menos ruído e maior eficiência nas reações. Acredito que tenha sido a contribuição técnica mais frutífera de todo o meu doutorado sanduíche.

Aliás, por falar no quesito “PCR em tempo real” não posso deixar de agradecer também ao suporte que sempre recebi da equipe da *Applied Biosystems* do Brasil, Fernando Genekian, Regina Ribeiro, Fernando Paris e Verônica Mihajlovich. Mesmo quando tive dificuldades na

Inglaterra com o aparelho de PCR em tempo real ABI Prism 7700, foi o empenho e dedicação desta equipe que conseguiu me ajudar a resolver o problema que tive, coisa que o suporte da empresa na Inglaterra não havia conseguido fazer.

Ainda falta agradecer a alguns amigos biólogos. Primeiro Betinha, que é uma amiga muito querida desde o colégio. Cursamos Biologia na UFRJ juntas e, apesar de ela ter feito Doutorado na Suécia, nunca perdemos o contato. E tenho certeza de que nunca perderemos. Nossa amizade já está selada.

Dentre os amigos biólogos que me aproximei mais tarde, começo por Renata Melon Barroso, que ficou minha amiga no curso que participamos juntas no Recife, no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Renata me introduziu a um grupo especial de amigos que tornaram-se marcantes para mim. A começar por Alejandra. Alê, você se tornou uma das minhas mais chegadas amigas e confidentes. Como é importante poder contar com você... tenho muitas amigas de infância mas elas não entendem o meu trabalho e os problemas que vivemos, e ter uma amiga confidente dedicada e inteligente como você e que também faz doutorado em biologia, trouxe muita alegria e conforto à minha vida. Obrigada pelo ombro que me emprestou sempre que precisei e pela mão a qual sempre pude segurar para me ajudar nessa caminhada. Você é muito querida.

E juntamente com Renata e Alejandra, vem toda a confraria, dentre membros mais assíduos e aqueles flutuantes. A dupla quase caipira Milton e Mauro, o sarcástico e ácido Richard, o casal Fernando e Ana baiana, Sidra, Flávia, Viviane, Antônio, Luís Afonso, Clarissa e Pedro, dentre outros... amigos de mesa de bar da quadra da Fiocruz, onde nos reunimos tantas vezes em rodas de inteligentes biólogos em conversas não tão inteligentes, e também em várias outras oportunidades além-muros da Fiocruz. Apesar de se dizerem na maioria agnósticos, costumo dizer que esses amigos tornaram Cristo mais presente em minha vida. Afinal, como moradora da Barra da Tijuca, não era sempre que eu freqüentava locais de onde podia ver o Cristo Redentor. No entanto, ao integrar essa trupe, podia vê-lo o tempo todo, nos mais diferentes programas diurnos ou noturnos. Interessante lembrar que foi no mesmo curso no Recife que conheci o Marcos Sorgine, que também tornou-se uma pessoa muito especial para mim, e grande amigo. Aliás, ao Pedro e ao Marcos eu agradeço também pelos inúmeros convites para freqüentar as mesas de bar da confraria deles, aliás, não exatamente uma mesa, mas aquele nicho no inter-bloco do CCS, onde eles realizam tantos churrascos e festas incríveis. Afinal, como é possível desenvolver uma tese sem essas interações sociais?

Aos meus amigos não biólogos, agradeço muitíssimo também, por me proporcionarem não apenas apoio, mas a chance de conversar sobre coisas normais da sociedade. Tantos amigos e amigas queridas... Àquelas amigas de infância com as quais não tenho tido muito contato por

motivo de distância geográfica, como Marcelle e Inha, ou porque tiveram filhos e a vida tornou-se muito diferente, como Reça e Fê Fleck, agradeço porque vão ser sempre minhas “irmãs” e a pessoa que sou hoje é fruto de tantos anos de convívio e amizade. Agradeço igualmente àquelas com as quais ainda tenho contato freqüente e com quem divido minhas angustias e alegrias atuais, e que também são como irmãs para mim, como Roberta, Tati, Ceci, Flávia Abbade, Dani Parente e Mari Queiroga. Obrigada por serem companhias tão maravilhosas. Eu não citei os amigos homens mas vou abrir exceção para Flavio Cassilati, marido da Tati, pois ele tem sido o amigo mais presente nos últimos anos e porque ele é ciumento. Flavio, você também é legal, ta? Falando sério, obrigada por você e Tati serem tão amigos, sempre com um programa bacana em mente, desde ir fazer Waffle na sua casa até sair para uma festa maluca em algum lugar. Vocês são companhia maravilhosa e um dos poucos casais que eu realmente admiro e tenho prazer de ver junto.

Depois de tantas páginas de agradecimentos ainda estou aflita por alguns personagens dessa história não terem sido citados. São tantas pessoas que contribuem simplesmente por me apoiar ou por me incentivar... Em alguns casos foram gestos aparentemente simples, mas que representaram para mim um carinho ou estímulo tão positivo que sem dúvida tornaram essa jornada mais interessante. Um exemplo recente é o caso do meu ortodontista, Dr. Carlo Marassi, que me cedeu lindos modelos para eu montar a apresentação da minha tese.

Então, encerro agradecendo a todas as pessoas que me deram apoio na minha vida pessoal e/ou profissional de algum modo. Porque, afinal, não se consegue nada sozinho nessa vida, e mesmo que isso fosse possível, não teria graça nenhuma.

“Animais e plantas que compartilham um mesmo nicho ecológico precisam coordenar seus ritmos biológicos; é preciso haver uma hora para caçar, uma hora para comer, uma hora para beber, uma hora para copular e uma hora para construir coisas.”

(J. T. Fraser, 1987)

“O corpo não passa de um relógio”

(Julien Offray de La Mettrie, filósofo do início do Iluminismo)

Índice

Lista de Figuras	xix
Lista de Tabelas	xxiii
Índice de Siglas e Abreviaturas	xxiv
Resumo	xxv
Abstract	xxvi
1. Introdução	1
1.1 – Origem e evolução do Relógio Circadiano	1
1.2 – Histórico	2
1.3 – Propriedades Principais dos Relógios Biológicos	11
1.4 – A regulação molecular do relógio endógeno em <i>Drosophila</i>	13
1.5 – Mosquitos e ritmos circadianos	23
1.6 – Objetivos	26
1.6.1 – Objetivo Geral	26
1.6.2 – Objetivos Específicos	26
2. Material e Métodos	29
2.1 – Padrão de atividade/repouso	29
2.2 – Obtenção dos fragmentos dos genes de relógio usados na análise de expressão gênica	32
2.2.1 – <i>Aedes aegypti</i>	32
2.2.2 – <i>Culex quinquefasciatus</i>	34
2.3 – Quantificação relativa da expressão dos genes de relógio	43
2.3.1 – Coleta de pontos	43
2.3.2 – Processamento das amostras	44
2.3.2.1 – Separação das cabeças e corpos	44
2.3.2.2 – Extração de RNA total	45
2.3.2.3 – Purificação por precipitação com Cloreto de Lítio	46
2.3.2.4 – Estabelecendo o volume de água a ressuspender o RNA precipitado através da Curva Padrão pelas diluições de RNA	47
2.3.2.5 – Síntese e diluição de cDNA	47
2.3.3 – PCR quantitativo em tempo real	48
2.3.4 – Cálculo da quantificação relativa	52
2.4 – Efeito da inseminação e hematofagia na expressão dos genes de relógio em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	53
2.5 – RNA de interferência: tentativa de silenciamento de <i>timeless</i> em <i>Ae. aegypti</i> ..	54

2.5.1 – Clonagem do fragmento de <i>tim</i> de <i>Ae. aegypti</i> alvo para o RNA de interferência	55
2.5.2 – Síntese <i>in vitro</i> de RNA dupla-fita	56
2.5.3 – Grupo Controle	56
2.5.4 – Injeção de RNA dupla-fita em mosquitos adultos e coleta das amostras	57
2.5.5 – Processamento das amostras e análise do efeito do RNA de interferência na expressão gênica	59
2.6 – Análise estatística dos dados	59
3. Resultados	61
3.1 – Padrão de atividade/repouso de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	61
3.1.1 – Atividade locomotora em regime de claro/escuro	61
3.1.2 – Atividade locomotora em regime de escuro constante	69
3.1.3 – Período da atividade em livre-curso (τ)	77
3.2 – Curva de expressão circadiana dos genes de relógio em <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	80
3.2.1 – Expressão em cabeça de fêmea de <i>Aedes aegypti</i>	80
3.2.2 – Expressão em corpo de fêmea de <i>Aedes aegypti</i>	87
3.2.3 – Expressão em cabeça de fêmea de <i>Culex quinquefasciatus</i>	90
3.2.4 – Correlação intra e inter específica da expressão dos genes de relógio	96
3.3 – Efeito da inseminação e alimentação sanguínea na expressão de genes de relógio em <i>Aedes aegypti</i>	100
3.4 – RNA de interferência: Injeção de RNA dupla-fita de <i>timeless</i>	104
3.4.1 – Expressão de <i>timeless</i> em cabeça e corpo de <i>Aedes aegypti</i> injetado com RNA dupla-fita de <i>timeless</i> e de <i>LacZ</i>	104
3.4.2 – Efeito no padrão de atividade/repouso	109
3.4.3 – Período em livre-curso (τ) da atividade de <i>Aedes aegypti</i> injetado com RNA dupla-fita de <i>timeless</i> e <i>LacZ</i>	115
4. Discussão	119
4.1 – Padrão de atividade/repouso de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	119
4.1.1 – Atividade em regime de claro/escuro	120
4.1.2 – Atividade em regime de escuro constante	122
4.2 – Expressão circadiana dos genes de relógio <i>period</i> , <i>timeless</i> , <i>cycle</i> e <i>Clock</i> em <i>Aedes aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i>	125
4.2.1 – Expressão de <i>period</i> em cabeça de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	127
4.2.2 – Expressão de <i>timeless</i> em cabeça de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	130

4.2.3 – Expressão de <i>cycle</i> em cabeça de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	134
4.2.4 – Expressão de <i>Clock</i> em cabeça de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	136
4.2.5 – Expressão circadiana dos genes de relógio em corpo de fêmeas decapitadas de <i>Aedes aegypti</i> e considerações sobre a expressão em corpo inteiro de machos	138
4.2.6 – Comparação do padrão de expressão entre os genes de relógio e entre <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	139
4.3 – Efeito da inseminação e da alimentação sangüínea na expressão dos genes de relógio <i>period</i> , <i>timeless</i> , <i>cycle</i> e <i>Clock</i> em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	144
4.4 – Injeção de RNA dupla-fita de <i>timeless</i> em fêmeas adultas de <i>Aedes aegypti</i> ...	147
4.4.1 – Efeito da injeção de RNA dupla-fita na expressão de <i>timeless</i>	149
4.4.2 – Efeito da injeção de RNA dupla-fita na atividade locomotora	152
4.4.3 – Considerações finais sobre os resultados da técnica de RNA de interferência em <i>Aedes aegypti</i>	153
5. Conclusões	156
Referências Bibliográficas	159
Anexo I – Cloning and daily expression of the <i>timeless</i> gene in <i>Aedes aegypti</i> (Diptera:Culicidae)	171
Anexo I – Supplementary data	179
Anexo II – Expressão circadiana de <i>cycle</i> em machos de <i>Aedes aegypti</i>	183
Anexo III – Isolation of a fragment homologous to the <i>rp49</i> constitutive gene of <i>Drosophila</i> in the Neotropical malaria vector <i>Anopheles aquasalis</i> (Diptera:Culicidae)	184

Lista de Figuras
(com versão simplificada das legendas)

Figura 1.1:	Relógio das flores proposto por Carolus Linnaeus em 1751.....	8
Figura 1.2:	(a) De Mairan. (b) Desenho esquemático do experimento conduzido por de Mairan com <i>Mimosa pudica</i> (“dormideira”)	9
Figura 1.3:	Foto do livro <i>On the power of movement in plants</i>	10
Figura 1.4:	Ron Konopka (esquerda) & Seymour Benzer (direita) em 2000	10
Figura 1.5:	Representação esquemática da primeira alça de retro-alimentação negativa do relógio endógeno de <i>Drosophila melanogaster</i>	18
Figura 1.6:	Representação gráfica do perfil de abundância relativa de RNA mensageiro e proteína dos genes envolvidos na primeira alça de retro-alimentação negativa do relógio endógeno de <i>D. melanogaster</i>	19
Figura 1.7:	Representação esquemática da segunda alça de retro-alimentação negativa do relógio endógeno de <i>Drosophila melanogaster</i>	20
Figura 1.8:	Representação gráfica do perfil de abundancia relativa de RNA mensageiro e proteína dos genes envolvidos na segunda alça de retro-alimentação negativa do relógio endógeno de <i>Drosophila melanogaster</i>	21
Figura 1.9:	Representação gráfica do perfil de abundância relativa de RNA mensageiro e proteína dos genes envolvidos nas duas alças de retro-alimentação negativa do relógio endógeno de <i>Drosophila melanogaster</i>	22
Figura 2.1:	Ilustração do experimento de monitoramento da atividade/repouso	30
Figura 2.2:	Seqüência do gene <i>timeless (tim)</i> de <i>Ae. aegypti</i> alvo das reações de PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão	35
Figura 2.3:	Fragmento do gene <i>cycle (cyc)</i> de <i>Ae. aegypti</i> alvo das reações de PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão	36
Figura 2.4:	Seqüência do gene <i>Clock (Clk)</i> de <i>Ae. aegypti</i> alvo das reações de PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão	37

Figura 2.5:	Seqüência do gene <i>period</i> (<i>per</i>) de <i>Ae. aegypti</i> alvo das reações de PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão	38
Figura 2.6:	Seqüência do gene <i>timeless</i> (<i>tim</i>) de <i>Cx. quinquefasciatus</i> alvo das reações de PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão	39
Figura 2.7:	Seqüência do gene <i>cycle</i> (<i>cyc</i>) de <i>Cx. quinquefasciatus</i> alvo das reações de PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão	40
Figura 2.8:	Seqüência do gene <i>period</i> (<i>per</i>) de <i>Cx. quinquefasciatus</i> alvo das reações de PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão	41
Figura 2.9:	Seqüência do gene <i>Clock</i> (<i>Clk</i>) de <i>Cx. quinquefasciatus</i> alvo das reações de PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão	42
Figura 3.1:	Atividade locomotora de (A) <i>Aedes aegypti</i> e (B) <i>Culex quinquefasciatus</i> em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro - média de atividade ..	64
Figura 3.2:	Atividade locomotora de (A) <i>Aedes aegypti</i> e (B) <i>Culex quinquefasciatus</i> em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro - média de atividade com dois tratamentos para diminuição de ruído: a) interpolação dos pontos logo após as transições de e b) média móvel entre três pontos	65
Figura 3.3:	Proporção de indivíduos ativos para (A) <i>Aedes aegypti</i> e (B) <i>Culex quinquefasciatus</i> em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro	66
Figura 3.4:	Proporção de indivíduos ativos para (A) <i>Aedes aegypti</i> e (B) <i>Culex quinquefasciatus</i> em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro com dois tratamentos para diminuição de ruído: a) interpolação dos pontos logo após as transições de luz e b) média móvel entre três pontos	67
Figura 3.5:	Proporção de horas de atividade diurna e noturna de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	68
Figura 3.6:	Atividade locomotora de (A) <i>Aedes aegypti</i> e (B) <i>Culex quinquefasciatus</i> em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro seguido de seguintes escuro constante - média de atividade	72
Figura 3.7:	Atividade locomotora de (A) <i>Aedes aegypti</i> e (B) <i>Culex quinquefasciatus</i> em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro seguido de escuro constante - média de atividade com dois tratamentos para diminuição de ruído: a) interpolação dos pontos logo após as transições de e b) média móvel entre três pontos	73

Figura 3.8: Proporção de indivíduos ativos para (A) <i>Aedes aegypti</i> e (B) <i>Culex quinquefasciatus</i> em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro seguido de escuro constante	74
Figura 3.9: Proporção de indivíduos ativos para (A) <i>Aedes aegypti</i> e (B) <i>Culex quinquefasciatus</i> em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro seguido de escuro constante, com dois tratamentos para diminuição de ruído: a) interpolação dos pontos logo após as transições de luz e b) média móvel entre três pontos	75
Figura 3.10: Proporção de horas de atividade de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	76
Figura 3.11: Autocorrelação da atividade locomotora de <i>Aedes aegypti</i>	78
Figura 3.12: Autocorrelação da atividade locomotora de <i>Culex quinquefasciatus</i>	79
Figura 3.13: Expressão de <i>period</i> em cabeça de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	83
Figura 3.14: Expressão de <i>timeless</i> em cabeça de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	84
Figura 3.15: Expressão de <i>cycle</i> em cabeça de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	85
Figura 3.16: Expressão de <i>Clock</i> em cabeça de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	86
Figura 3.17: Expressão em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro dos genes (A) <i>period</i> , (B) <i>timeless</i> , (C) <i>cycle</i> e (D) <i>Clock</i> em corpo (decapitado) de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	88
Figura 3.18: Expressão de <i>period</i> em cabeça de fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	92
Figura 3.19: Expressão de <i>timeless</i> em cabeça de fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	93
Figura 3.20: Expressão de <i>cycle</i> em cabeça de fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	94
Figura 3.21: Expressão de <i>Clock</i> em cabeça de fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	95
Figura 3.22: Expressão dos genes (A) <i>period</i> , (B) <i>timeless</i> , (C) <i>cycle</i> e (D) <i>Clock</i> em cabeça de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> , em quatro categorias: fêmeas virgens (e não alimentadas com sangue), inseminadas (e não alimentadas com sangue), alimentadas com sangue (e virgens) e inseminadas e alimentadas com sangue	102

Figura 3.23: Expressão dos genes (A) <i>period</i> , (B) <i>timeless</i> , (C) <i>cycle</i> e (D) <i>Clock</i> em corpos de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> em quatro categorias: fêmeas virgens (e não alimentadas com sangue), inseminadas (e não alimentadas com sangue), alimentadas com sangue (e virgens) e inseminadas e alimentadas com sangue	103
Figura 3.24: Efeito da injeção de RNA dupla-fita de <i>timeless</i> na expressão de <i>timeless</i> em corpo e cabeça de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	106
Figura 3.25: Atividade locomotora de <i>Aedes aegypti</i> ao longo de sete dias após a injeção com RNA dupla-fita de <i>LacZ</i> e com RNA dupla-fita de <i>timeless</i>	111
Figura 3.26: Proporção de indivíduos (<i>Aedes aegypti</i>) ativos ao longo de sete dias de após a injeção com RNA dupla-fita de <i>LacZ</i> e com RNA dupla-fita de <i>timeless</i>	112
Figura 3.27: Autocorrelação da atividade locomotora de <i>Aedes aegypti</i> injetado com RNA dupla-fita de <i>LacZ</i>	116
Figura 3.28: Autocorrelação da atividade locomotora de <i>Aedes aegypti</i> injetado com RNA dupla-fita de <i>timeless</i>	117
Figura 3.29: Sobreposição do primeiro pico dos gráficos de autocorrelação da atividade de <i>Aedes aegypti</i> injetado com RNA dupla-fita de <i>LacZ</i> e injetado com RNA dupla-fita de <i>timeless</i>	118
Figura 4.1: Gráfico estilizado representativo do modelo geral proposto para o padrão de variação temporal da abundância de <i>period</i> , <i>timeless</i> , <i>cycle</i> e <i>Clock</i> em mosquitos	143

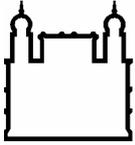
Lista de Tabelas

(com versão simplificada das legendas)

Tabela 2.1: Relação dos pares de oligonucleotídeos utilizados nas reações de quantificação de expressão gênica por PCR em tempo real dos genes <i>rp49</i> , <i>period</i> (<i>per</i>), <i>timeless</i> (<i>tim</i>), <i>cycle</i> (<i>cyc</i>) e <i>Clock</i> (<i>Clk</i>) nos mosquitos <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	51
Tabela 3.1: Coeficientes de correlação de <i>Spearman</i> (r_s) entre expressão dos genes de relógio <i>period</i> , <i>timeless</i> , <i>cycle</i> e <i>Clock</i> em cabeças de <i>Aedes aegypti</i> , em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro	98
Tabela 3.2: Coeficientes de correlação de <i>Spearman</i> (r_s) entre expressão dos genes de relógio <i>period</i> , <i>timeless</i> , <i>cycle</i> e <i>Clock</i> em cabeças de <i>Aedes aegypti</i> , em regime de escuro constante	98
Tabela 3.3: Coeficientes de correlação de <i>Spearman</i> (r_s) entre expressão dos genes de relógio <i>period</i> , <i>timeless</i> , <i>cycle</i> e <i>Clock</i> em corpos de <i>Aedes aegypti</i> , em regime 12 horas de claro e 12 horas de escuro	98
Tabela 3.4: Coeficientes de correlação de <i>Spearman</i> (r_s) entre expressão dos genes de relógio <i>period</i> , <i>timeless</i> , <i>cycle</i> e <i>Clock</i> em cabeças de <i>Culex quinquefasciatus</i> , em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro	98
Tabela 3.5: Coeficientes de correlação de <i>Spearman</i> (r_s) entre expressão dos genes de relógio <i>period</i> , <i>timeless</i> , <i>cycle</i> e <i>Clock</i> em cabeças de <i>Culex quinquefasciatus</i> , em regime de escuro constante	99
Tabela 3.6: Coeficientes de correlação de <i>Spearman</i> (r_s) para a comparação entre a expressão dos genes de relógio <i>period</i> , <i>timeless</i> , <i>cycle</i> e <i>Clock</i> e a expressão desses mesmos genes em duas amostras distintas	99
Tabela 3.7: Análise de variância de quatro fatores (ANOVA <i>4-ways</i>) para os resultados de análise da expressão de <i>timeless</i> ilustrados na figura 3.24	107
Tabela 3.8: Análise de variância de dois fatores (ANOVA <i>2-ways</i>) da atividade locomotora de <i>Aedes aegypti</i> no período total entre o 3º e 7º dias após a injeção para o efeito do RNA dupla-fita injetado e do fotoperíodo	113
Tabela 3.9: Análise de variância de dois fatores (ANOVA <i>2-ways</i>) da atividade locomotora de <i>Aedes aegypti</i> (A) no 4º dia após a injeção e (B) 5º dia após a injeção, para o efeito do RNA dupla-fita injetado e do fotoperíodo	114

Índice de Siglas e Abreviaturas

<i>Ae.</i>	=	<i>Aedes</i>
<i>An.</i>	=	<i>Anopheles</i>
<i>Blast</i>	=	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	=	<i>complementar Desoxiribonucleic Acid</i> (sequencia complementar de DNA)
<i>Clk</i>	=	gene <i>Clock</i>
CLK	=	proteína CLOCK
<i>cry</i>	=	gene <i>cryptochrome</i>
CRY	=	proteína CRYPTOCHROME
CT	=	<i>Circadian Time</i> (Tempo Circadiano)
<i>Cx.</i>	=	<i>Culex</i>
<i>cyc</i>	=	gene <i>cycle</i>
CYC	=	proteína CYCLE
<i>dbt</i>	=	gene <i>double-time</i>
DBT	=	proteína DOUBLE-TIME
DNA	=	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
dNTP	=	desorribonucleotídeo trifosfatado
hPa	=	hectoPascal
LSD	=	<i>Least significant difference</i>
μl	=	microlitro (10 ⁻⁶ litro)
μM	=	micromolar (10 ⁻⁶ Molar)
ml	=	mililitro (10 ⁻³ litro)
mM	=	milimolar (10 ⁻³ Molar)
°C	=	Graus Celsius
PAS	=	domínio de dimerização PER-ARNT-SIM (em proteínas)
PCR	=	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação de Polimerase em Cadeia)
<i>per</i>	=	gene <i>period</i>
PER	=	proteína PERIOD
RNA	=	<i>Ribonucleic Acid</i> (ácido ribonucleico)
RNAi	=	RNA de interferência
RNAse	=	Ribonuclease
rpm	=	Rotações por Minuto
<i>tim</i>	=	gene <i>timeless</i>
TIM	=	proteína TIMELESS
Tm	=	<i>melting temperature</i> (temperatura de desnaturação)
ZT	=	<i>Zeitgeber Time</i> (Tempo de acordo com o Doador de Tempo)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

GENÉTICA MOLECULAR DOS RITMOS CIRCADIANOS EM MOSQUITOS VETORES

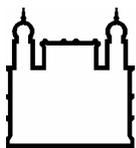
(DIPTERA: CULICIDAE)

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Carla Gentile

Relógios biológicos são mecanismos endógenos de marcar a passagem do tempo e podem ser encontrados em animais, plantas, fungos e até organismos unicelulares. No modelo *Drosophila*, o mecanismo molecular que controla os ritmos circadianos (~24 horas) funciona através de alças de retroalimentação negativa envolvendo alguns genes, sendo os principais: *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock*. Os homólogos destes genes já foram encontrados em várias espécies de animais, apontando para uma origem ancestral comum. Mosquitos são vetores de diversos agentes causadores de doenças a humanos e animais, mas apesar da sua importância epidemiológica pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares que controlam os ritmos de atividade e hematofagia neste grupo de insetos. O presente trabalho objetivou o estudo do relógio biológico circadiano em mosquitos, usando como modelos a espécie diurna *Aedes aegypti* e a noturna *Culex quinquefasciatus*. Os estudos moleculares foram sempre acompanhados de experimentos de monitoramento da atividade/repouso dos insetos. A primeira etapa da pesquisa compreendeu a obtenção em *Ae. aegypti* da seqüência codificante integral do gene homólogo a *timeless* de *Drosophila melanogaster* e o estudo comparativo da seqüência do mesmo entre as duas espécies. Os resultados apontaram para uma alta similaridade em regiões de *timeless* conhecidas como importantes em *Drosophila* para manutenção do relógio biológico, sugerindo conservação de sua função nos mosquitos. A segunda etapa da pesquisa envolveu a determinação do padrão de expressão circadiana de *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em mosquitos. Após estudos preliminares sobre a expressão de *timeless* e *cycle* em machos de *Aedes aegypti*, foram obtidas as curvas de expressão circadiana de *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* na cabeça de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. Os resultados sugerem que o relógio central funcione de forma muito semelhante nas duas espécies. Análise da expressão desses genes nos corpos decapitados das fêmeas de *Ae. aegypti*, entretanto, aponta para padrões diferentes de expressão em relação à cabeça. Foi analisado também o efeito da inseminação e da hematofagia na expressão dos genes de relógio em *Ae. aegypti*. Apesar de dados da literatura mostrarem que a inseminação e a alimentação com sangue (após inseminação), causam alteração no comportamento das fêmeas de mosquito, apenas a hematofagia parece exercer alteração significativa na expressão dos genes de relógio. Finalizando, foi efetuado o silenciamento de *timeless* em *Ae. aegypti* por técnica de RNA de interferência, através da injeção de RNA dupla-fita de *timeless* no tórax de fêmeas adultas. O silenciamento da expressão foi detectado tanto na cabeça quanto no corpo das fêmeas no quarto dia após a injeção do RNA dupla-fita, mesmo dia em que foi detectada alteração no padrão de comportamento. Esse resultado confirma o papel de *timeless* no controle da atividade em mosquitos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

GENÉTICA MOLECULAR DOS RITMOS CIRCADIANOS EM MOSQUITOS VETORES

(DIPTERA: CULICIDAE)

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Carla Gentile

Biological clocks are endogenous time keeping systems that can be found in animals, plants, fungi and even unicellular organisms. In the *Drosophila* model, the molecular mechanism that controls the circadian rhythm (~24 hours) works through negative feedback loops composed of a number of genes, among which the principal genes are: *period*, *timeless*, *cycle* and *Clock*. The homologues of these genes have been found in many animal species and their comparison points to a common ancestral origin. Mosquitoes are vectors of several organisms and viruses that cause diseases in humans and other animals, however despite their epidemiological relevance not much is known about the molecular mechanisms controlling their activity rhythms and bloodfeeding behaviour. The purpose of the present work was to investigate the molecular regulation of the biological clock in mosquitoes, using as models the diurnal species *Aedes aegypti* and the nocturnal species *Culex quinquefasciatus*. Analysis of the mosquitoes' activity/rest behaviour was performed in parallel to the molecular studies. The first stage of this research was to obtain, in *Aedes aegypti*, the full coding sequence of the gene homologue to the *timeless* gene of *Drosophila melanogaster* and to perform comparative analysis between them. The results showed high similarities between the *timeless* gene of the two species, mainly in regions known, in *Drosophila*, to have a crucial involvement in the operation of the biological clock, thus suggesting function conservation of the gene in mosquitoes. The second stage of the research involved the determination of the patterns of expression of the clock genes *period*, *timeless*, *cycle* and *Clock* in mosquitoes. After preliminary studies of male *Ae. aegypti*, in which the temporal pattern of the expression of *timeless* and *cycle* was determined, the circadian expression of *period*, *timeless*, *cycle* and *Clock* was characterised in the heads of females of the species *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*. The results suggest that the central clock works in a very similar way in both species. The expression of the same four genes in the beheaded bodies of females of *Ae. aegypti*, however, showed a pattern different from that of the head. The effects of insemination and blood meal intake upon the expression of clock genes in *Ae. aegypti* were also analysed. In spite of the data in the literature showing that insemination drives important changes in the behaviour of the female mosquito, in this study only the intake of blood seemed to cause significant changes in the expression of the clock genes. To finalize the study of the biological clock in mosquitoes, silencing of the *timeless* gene in the head and body of *Ae. aegypti* mosquitoes was performed using an interference RNA technique in which the thoraxes of adult females were injected with *timeless* double-stranded RNA. Silencing of gene expression was achieved on the fourth day after injection, the same day in which a significant alteration of the activity pattern of these females was detected. This result confirms the role of *timeless* in the control of activity behaviour in mosquitoes.

1. Introdução

1.1 – Origem e evolução do Relógio Circadiano

Desde o surgimento da vida na Terra os organismos vivos estão sujeitos a algumas pressões seletivas semelhantes, devido a aspectos ubíquos no nosso planeta. Dentre os mais óbvios estão aqueles relacionados aos movimentos de translação e rotação da Terra, como o ciclo de fases clara e escura que juntas somam um período de 24 horas o qual chamamos de dia¹¹. Sendo assim, as criaturas vivas hoje em nosso planeta evoluíram tendo que coordenar sua fisiologia e comportamento a um ambiente sujeito a um ciclo de claro e escuro de exatamente 24 horas de duração. Por esse motivo, podemos identificar, nos mais diversos grupos de organismos, processos rítmicos com aproximadamente esse período, denominados por Franz Halberg em 1959 de “ritmos circadianos” (do latim *circa* = cerca e *diem* = dia) (Marques e Menna-Barreto 1999; Moore-Ede et al. 1982).

Uma explicação para a origem dos ritmos circadianos foi sugerida por Pittendrigh (Pittendrigh 1993) e é conhecida como hipótese de “fuga da luz”, tendo sido mais recentemente defendida em termos moleculares (Gehring e Rosbash 2003). Ela sugere uma origem dos ritmos circadianos ainda no período Pré-cambriano, quando bactérias fotossintéticas precisariam migrar para a luz para produzir seu alimento, mas também evitar os horários mais agressivos do dia em relação aos raios ultravioleta, nocivos ao DNA, e muito intensos na atmosfera da Terra primitiva. Acredita-se que naquela época a duração do dia seria bem mais curta do que nos tempos atuais, mas, interessante, há evidências em cianobactérias de capacidade de estabelecer ritmos de divisão celular em ciclos bem mais curtos que 24 horas, indicando uma possível origem ancestral desse mecanismo em condições de ciclos de luz e escuridão compatíveis com o período Pré-cambriano (Costas et al. 1996; Tauber et al. 2004).

Evidências na fisiologia celular também apóiam a hipótese de “fuga da luz”. No ciclo celular, a fase de maior vulnerabilidade do DNA aos raios ultravioleta é afastada das horas do dia de maior intensidade destes (Cockell e Rothschild 1999; Edmunds e Laval-Martin 1984; Nikaido e Johnson 2000; Rothschild e Cockell 1999). O oxigênio também é fator bastante

¹ Esta definição de “dia” corresponde ao dia solar, que não é o mesmo que o dia sideral ou astronômico. Este último é medido pelo tempo que um ponto fixo na Terra leva para assumir a mesma posição tendo como referencial uma estrela que não o Sol, e sua duração é de 23 horas, 56 minutos e 4,1 segundos. Dia solar refere-se ao tempo que um ponto fixo na Terra leva para assumir a mesma posição tendo o Sol como referência, e é de 24 horas zero minutos e zero segundos, variando na ordem de milissegundos ao longo das estações do ano. A diferença entre os dois é devido ao fato do Sol estar muito mais próximo da Terra do que as outras estrelas.

agressivo ao DNA e estudos de microarranjos indicam que picos de transcrição gênica ocorrem na fase redutora da respiração, evitando expor o DNA e o RNA à fase oxidativa, sugerindo mais uma antiga pressão seletiva para a origem dos ritmos circadianos (Klevecz et al. 2004).

Estudos sobre a evolução dos relógios circadianos também corroboram a teoria de “fuga da luz”. Estes apontam para uma origem dos ritmos circadianos em cianobactérias no período Pré-cambriano, e sugerem que o primeiro relógio biológico teria sido o próprio ciclo celular. Com o surgimento de organismos multicelulares, o relógio circadiano e o ciclo celular teriam se desvinculado (Dvornyk et al. 2003; Tauber et al. 2004). No período Cambriano, múltiplos eventos de duplicação gênica ocorridos em conjunto com a grande diversificação de espécies teriam resultado em diferentes configurações para o relógio circadiano, resultando em sua ampla distribuição observada hoje entre os grupos de organismos vivos (Tauber et al. 2004). Ainda assim, a análise da estrutura dos genes de relógio aponta para ao menos quatro origens independentes ao longo da evolução, em cianobactérias, fungos, plantas e animais (Dunlap 1999; Foster e Kreitzman 2005). Ao que tudo indica, apesar de ancestral, o sistema parece ser evolutivamente simples de ser adquirido. Porém, uma determinação precisa de ancestralidade é dificultada pelo fato dos genes de relógio estarem entre aqueles que mais rapidamente evoluem (Dunlap 1999).

1.2 - Histórico

A observação empírica dos ritmos circadianos certamente tem suas origens em tempos imemoriais. Alguns exemplos registrados na história são os relatos de Hipócrates, Aristóteles, Plínio e Galeno, dentre outros, indicando a importância dos ritmos biológicos em plantas e animais, incluindo o homem. Exemplos interessantes são os relatos de Thasos, historiador acompanhante de Alexandre, o Grande, que, em 325 a.C., descreve detalhadamente o movimento circadiano das folhas da planta *Tamarindus indicus* (tamarindo), e, ainda, do naturalista Sueco Carolus Linnaeus, que em 1751 documentou o horário característico de diversas espécies de plantas para o abrir e fechar das pétalas de suas flores e, baseado nisso, propôs um “relógio de flores” para marcar as horas do dia (Fig. 1.1) (Foster e Kreitzman 2005; Marques e Menna-Barreto 1999).

Entretanto, a primeira observação acerca do relógio circadiano que indicava a existência de um controle endógeno data de 1729, quando o astrônomo francês Jean-Jacques

d'Ortous de Mairan realizou experimento sobre o ritmo diário do abrir e fechar das folhas de *Mimosa pudica* (“dormideira”). A planta abre suas folhas durante a fase clara do dia e as fecha durante a noite. Quando de Mairan colocou espécimes em condições controladas de escuro constante, constatou que a planta era capaz de manter, mesmo sem a indicação da luz, o comportamento de abrir suas folhas durante as horas correspondendo à fase clara do dia (dia subjetivo) e fechá-las durante o horário da noite (Fig. 1.2). de Mairan publicou seu trabalho na Academia Real de Ciências de Paris, porém, hesitou em concluir que as plantas teriam alguma espécie de relógio interno, pois não conseguiu isolar em seu experimento outros fatores ambientais que poderiam estar sinalizando à planta a passagem do tempo, como a variação da temperatura e forças magnéticas (Foster e Kreitzman 2005; Marques e Menna-Barreto 1999; Moore-Ede et al. 1982).

Em 1832, o botânico suíço Augustin de Candolle descobriu que o ritmo de movimento das folhas de *Mimosa pudica* que persiste na ausência de luz apresentava um atraso de uma ou duas horas, evidenciando uma periodicidade de 22 a 23 horas. Tal período próximo, porém não exatamente igual, a 24 horas, observado no ritmo de espécimes mantidos em condições livres de indicações ambientais de passagem de tempo, viria mais tarde a ser definido como “período em livre curso” (*free-running period*), e foi a inspiração para o nome “circadiano” (cerca de um dia) (Johnson et al. 2003; Marques e Menna-Barreto 1999). de Candolle comentou sobre “uma tendência inerente às plantas em demonstrar movimentos periódicos”. Um conceito de relógio endógeno começa a se formar até que, em 1873, o fisiologista vegetal alemão Wilhelm Pfeffer, é o primeiro a concluir que a atividade circadiana de movimento de folhas em plantas era produzida e regulada endogenamente (Moore-Ede et al. 1982).

Charles Darwin também está entre os primeiros cientistas que vieram a interessar-se pelo ritmo circadiano dos organismos e a reforçar o conceito de que tal propriedade seria regulada endogenamente. Ele desenvolveu um aparato para medir o movimento das plantas e quantificá-lo graficamente, publicando seus resultados em 1880, no livro que escreveu com seu filho, *On the power of movement in plants* (Fig. 1.3). Naquela oportunidade, Darwin indica acreditar que a periodicidade diária do movimento de folhas seria uma propriedade inerente às plantas (Foster e Kreitzman 2005; Moore-Ede et al. 1982). No entanto, foi apenas em 1935 que o biólogo alemão Erwin Bünning conseguiu demonstrar, através de experimento envolvendo o cruzamento de plantas de feijão com diferentes períodos para os movimentos foliares, que a ritmicidade biológica era uma característica geneticamente determinada. Bünning conduz também, na mesma época, importantes experimentos com abelhas que

contribuíram em muito para o entendimento do período em livre curso e sua determinação genética (Foster e Kreitzman 2005; Marques e Menna-Barreto 1999; Moore-Ede et al. 1982).

Apesar de tais experimentos, ainda na década de 1960 havia uma linha de pesquisadores que acreditavam na hipótese da origem exógena dos ritmos circadianos, como F. G. Brown, que defendia que os ritmos observados seriam resposta a variáveis externas desconhecidas não sujeitas ao controle experimental, os “fatores geofísicos sutis”, como radiações eletromagnéticas, raios cósmicos, geomagnetismo, campos eletrostáticos, etc. (Brown 1960). Para encaminhar experimentos isolando tais possíveis fatores geofísicos sutis e comprovar definitivamente que a ritmicidade de processos biológicos era de origem endógena, foi conduzida uma série de experimentos no pólo Sul. Em um deles, por exemplo, *Neurospora*, camundongos e *Drosophila* mantidos sobre bandejas que giravam em sentido oposto ao da rotação da Terra exibiam ritmos circadianos persistentes (Hamner et al. 1962). Ainda assim, a hipótese da determinação exógena dos ritmos circadianos só foi definitivamente abandonada no final da década de 1980 (Marques e Menna-Barreto 1999).

Outro nome de destaque no campo da cronobiologia é Colin Pittendrigh que, a partir da década de 1950, realizou meticolosos estudos sobre o relógio biológico de várias espécies como camundongos e *Drosophila*. Sobre estas, ele investigou principalmente os ritmos observados no horário das formas adultas emergirem das pupas. Seus estudos foram também extensos e marcantes no entendimento sobre a propriedade do período em livre curso ser “acertado” por fatores ambientais que indicam a passagem do tempo (Foster e Kreitzman 2005; Pittendrigh 1993). Como mencionado anteriormente, o período em livre curso não coincide exatamente com a duração do dia e, com o passar do tempo, a acumulação do pequeno erro de cada ciclo levaria o relógio endógeno a sair de fase em relação ao dia astronômico. Isso não acontece justamente por conta desta capacidade do relógio endógeno de ser acertado de acordo com indicadores ambientais de passagem do tempo. Para essa propriedade, dá-se o nome de “arrastamento”, ou *entrainment*, em inglês (Johnson et al. 2003; Marques e Menna-Barreto 1999) (vide item 1.3 para detalhes).

Jürgen Aschoff, mais um notável pesquisador no campo da cronobiologia, colega de Bünning e Pittendrigh, adotou, na década de 1950, a denominação de *zeitgeber* para tais indicadores ambientais de passagem de tempo capazes de promover o acerto, ou arrastamento, no relógio endógeno. A palavra, de origem germânica, significa “indicador (ou doador) de tempo”, sendo a alternância de fase clara e escura do dia a característica mais bem compreendida em sua capacidade de arrastamento do relógio de diversas espécies (Marques e Menna-Barreto 1999; Moore-Ede et al. 1982) (vide item 1.3 para maiores detalhes).

A grande expansão no século XX das investigações acerca dos processos rítmicos de diferentes espécies de organismos vivos sob diversas condições ambientais manipuladas em laboratório, levou à solidificação do conceito da existência dos relógios biológicos e ao entendimento e caracterização de sua natureza e principais propriedades (vide tópico 1.3).

A partir da década de 1970, os estudos sobre comportamento tomam um rumo totalmente novo. Em 1971 Ron Konopka & Seymour Benzer (Fig. 1.4), trabalhando no Instituto de Tecnologia da Califórnia, submeteram drosófilas a mutagênicos químicos e conseguiram isolar dentre elas três linhagens com padrões anormais tanto nos ritmos de emergência de adultos das pupas, mencionado acima, quanto nos ritmos de atividade e repouso. Em livre curso, linhagens selvagens de *Drosophila* apresentam padrão rítmico de atividade e repouso com período próximo a 24 horas (Helfrich-Forster 2000). As linhagens mutantes isoladas variavam muito em relação a esse padrão, tendo uma delas período em livre curso de 19 horas, outra de 29 horas e a terceira apresentando indivíduos arrítmicos. Havia nessas linhagens problemas semelhantes nos ritmos de emergência. Estudos subseqüentes de genética clássica indicaram que tais alterações no padrão comportamental das moscas eram causadas por mutações no mesmo *locus*. Konopka & Benzer chamaram este *locus* de *period*, ou *per*, sendo assim identificado e denominado o primeiro gene relacionado ao controle do comportamento em organismos vivos, e as três linhagens receberam os nomes de *per^{short}* (*per^s*) no caso daquela com período de 19 horas, *per^{long}* (*per^l*) para a de período de 29 horas e a linhagem arrítmica foi denominada *per⁰¹* (Konopka e Benzer 1971; Stanewsky 2002).

Cerca de dez anos depois, Michael Young na Universidade Rockefeller e Jeffrey Hall & Michael Rosbash na Universidade Brandeis, trabalhando de forma simultânea e independente, conseguiram clonar *per* e identificar as mutações pontuais características das linhagens mutantes de Konopka & Benzer (Bargiello et al. 1987; Bargiello e Young 1984; Reddy et al. 1984; Yu et al. 1987) abrindo as portas da Era Molecular para o estudo dos genes de comportamento. Alguns outros anos foram necessários para que fosse demonstrado pela primeira vez que o produto do gene *per* regula a sua própria transcrição, sendo a primeira evidência da existência de uma alça de retro-alimentação negativa (Hardin et al. 1990). Ensaios bioquímicos demonstraram ainda haver na proteína PER um domínio de dimerização protéica PAS, assim denominado em função do nome das proteínas inicialmente identificadas a contê-lo (PER-ARNT-SIM) (Huang et al. 1993). Entretanto, PER não contém o domínio básico de hélice-alça-hélice (bHLH) de ligação ao DNA, característico das proteínas da família PAS, tornando-o um membro atípico, apesar de fundador, dessa família de proteínas (Stanewsky 2002).

Foram necessários mais dez anos após a caracterização molecular de *per* para que outros genes relacionados com a regulação do relógio endógeno fossem identificados e clonados, sendo apenas em 1994 que o grupo de Michael Young publica um artigo reportando a descoberta de outro mutante de ritmo de atividade e repouso cuja mutação recaía sobre outro *locus*, desta vez batizado de *timeless*, ou *tim*. O mutante *tim* não era apenas arritmico quanto a seu comportamento, mas também parecia alterar a oscilação circadiana da expressão do RNA de *per* (Sehgal et al. 1994). Em 1995 o mesmo grupo publicou outros dois artigos com muitos detalhes sobre *tim*, incluindo seqüência gênica do alelo selvagem, do mutante, da estrutura da proteína TIMELESS (TIM), e ainda demonstrando que *tim* funcionava de forma interligada a *per*, interferindo na regulação da expressão do mesmo (Myers et al. 1995; Sehgal et al. 1995). Naquele momento, não foi encontrado em TIM nenhum domínio até então conhecido, mas foi demonstrado que esta proteína era capaz de se ligar à proteína PER no domínio PAS desta, formando o heterodímero PER-TIM (Gekakis et al. 1995).

Neste momento da história do estudo dos genes de comportamento, as descobertas começam a acontecer em velocidade mais acelerada, e o ano de 1998 em especial foi particularmente produtivo quanto aos estudos moleculares acerca do relógio circadiano em *Drosophila*. Foram descritos outros dois genes que, assim como *per* e *tim*, funcionam como parceiros na regulação do relógio circadiano das moscas, sendo denominados *cycle* (Rutila et al. 1998) e *Clock* (Allada et al. 1998; Bae et al. 1998; Darlington et al. 1998; Lee et al. 1998), respectivamente abreviados por *cyc* e *Clk*, tendo sido este último excepcionalmente descrito primeiro em mamíferos (King et al. 1997; Vitaterna et al. 1994). Ambos codificam fatores de transcrição contendo, assim como PER, domínio de dimerização protéica PAS e ainda um domínio básico de hélice-alça-hélice (bHLH) responsável pela ligação a DNA. Desta forma, seus produtos, as proteínas CLK e CYC, interagem formando o heterodímero CLK-CYC, que atua como fator de transcrição ligando-se à região promotora de outros genes (Stanewsky 2003). Os mesmos trabalhos que descreveram *Clk* e *cyc*, reforçados por outros da mesma época (Allada et al. 1998; Bae et al. 1998; Darlington et al. 1998; Lee et al. 1998, 1999; Rutila et al. 1998) demonstraram que os quatro genes de relógio descritos até então em *Drosophila* (*per*, *tim*, *Clk* e *cyc*) interagiam entre si influenciando na expressão uns dos outros de maneira a gerar uma alça de retro-alimentação negativa que regulava sua própria expressão, e que esta alça apresentava um período de 24 horas, condizente com a função de marca-passo central do relógio circadiano.

Etapas regulatórias envolvendo outras proteínas seriam fundamentais para a manutenção do período, como foi evidenciado pela descoberta de *double-time* (*dbt*), que

codifica a proteína DBT, relacionada à família da caseína quinase 1ε humana e capaz de interagir fisicamente e fosforilar PER, marcando esta proteína para degradação via proteossoma, o que retarda a acumulação da mesma no citoplasma da célula (Kloss et al. 1998). Ainda no mesmo ano, foi reportada a existência e função de *cryptochrome* (*cry*), gene que codifica uma proteína que pertence a uma família de flavoproteínas com capacidade de absorver luz na faixa espectral do azul, e que, agindo como fotoreceptor, estaria diretamente ligada ao mecanismo de acerto, ou arrastamento, do relógio pela luz ao provocar a degradação prematura da proteína TIM (Emery et al. 1998; Naidoo et al. 1999; Stanewsky et al. 1998).

Multiplicaram-se os grupos trabalhando com genes de controle do comportamento circadiano e, com eles, o número de trabalhos visando esclarecer o funcionamento do relógio endógeno. Hoje temos um modelo para o mecanismo molecular de regulação dos genes de relógio circadiano em *Drosophila* bem aceito em quase todas as suas etapas conhecidas, embora muitas outras ainda precisem ser desvendadas pela ciência. Neste modelo, são identificadas não apenas uma, mas duas alças regulatórias de retro-alimentação negativa, compostas principalmente pelos genes *timeless* (*tim*), *period* (*per*), *Clock* (*Clk*), *cycle* (*cyc*), *vri* (*vri*), *PAR domain protein 1* (*Pdp1*), *double-time* (*dbt*) e *shaggy* (*sgg*) (Hardin 2005; Stanewsky 2002; Taghert e Lin 2005). Essas duas alças regulatórias ciclaram, mesmo em condições ambientais constantes, num período de aproximadamente 24 horas, representando o marca-passo central do relógio endógeno (vide tópico 1.4 para detalhes).

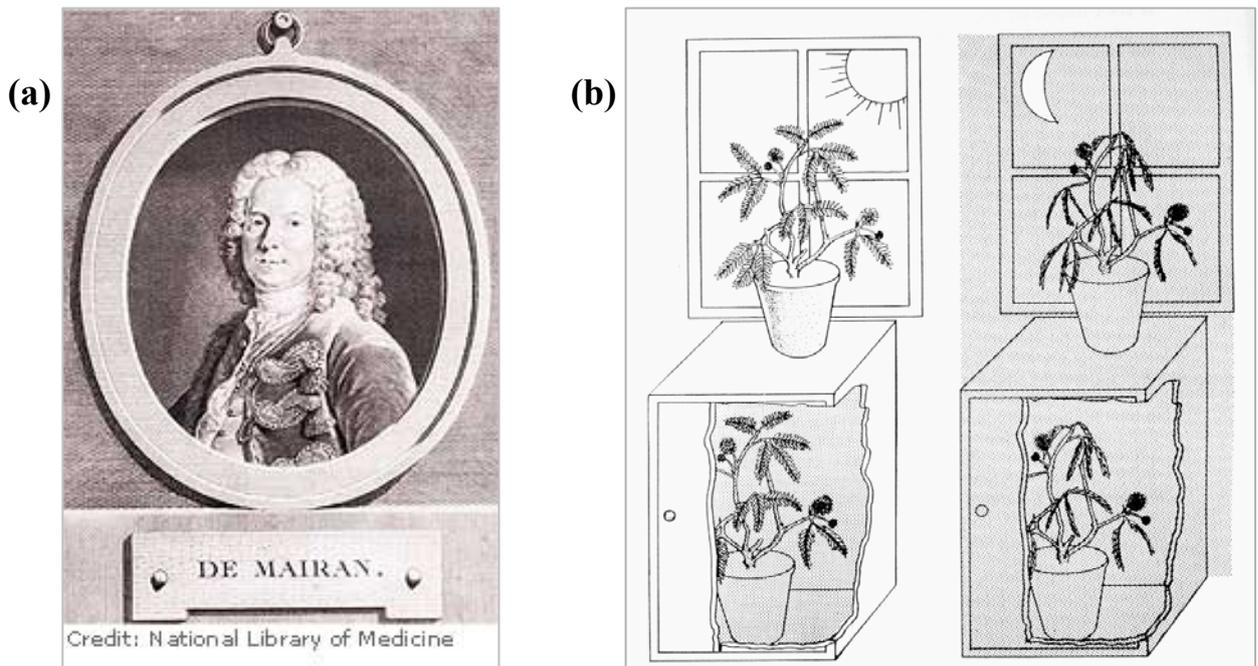


Figura 1.2: (a) De Mairan. Fonte: <http://www.hhmi.org/biointeractive/museum/exhibit00>. (b) Desenho esquemático do experimento conduzido por de Mairan. Espécimes de *Mimosa pudica* (“dormideira”) foram mantidas em duas condições distintas: uma exposta às variações de luz natural e outra mantida em escuro constante. de Mairan percebeu que em ambas as condições a planta mantinha os movimentos foliares de abrir no período referente ao dia e fechar durante a noite. de Mairan publicou seus resultados na Academia Real de Ciências de Paris e provavelmente este é o primeiro relato com registro científico sobre ritmos circadianos. Fonte: Moore-Ede et al 1982.

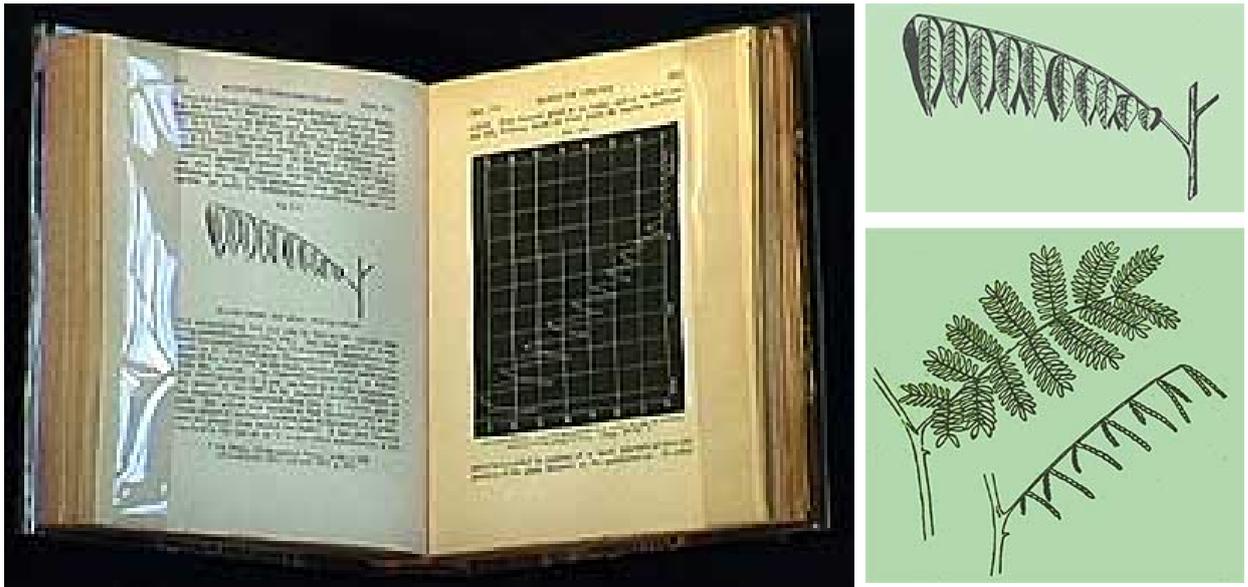


Figura 1.3: Foto do livro *On the power of movement in plants* que Charles Darwin escreveu com seu filho. Inspirados pelo experimento realizado por de Mairan (vide figura 1.2), eles aprofundam o estudos sobre o movimento foliar de várias espécies de plantas. Em detalhe estão dois dos desenhos contidos no livro de Darwin que ilustram movimentos foliares de algumas espécies. Fonte: <http://www.hhmi.org/biointeractive/museum/exhibit00>.

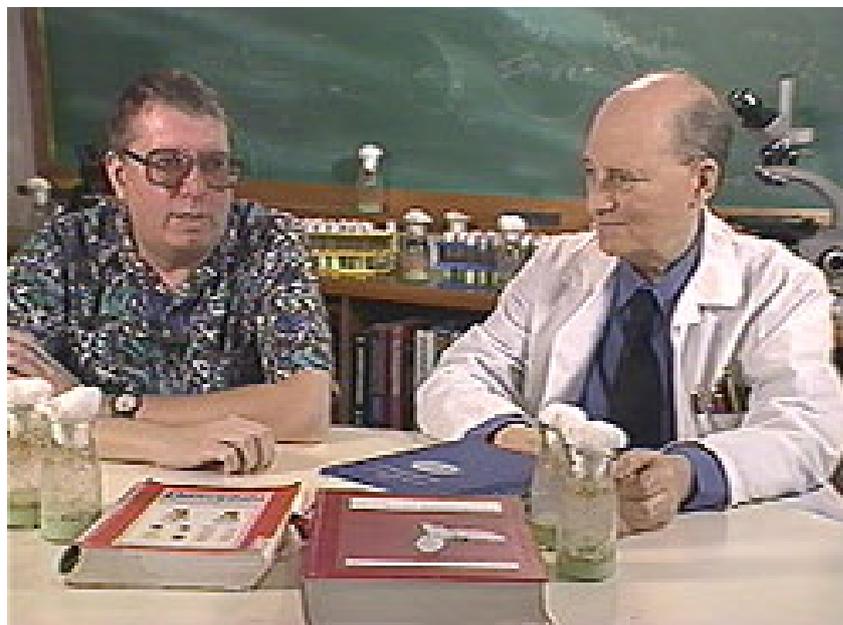


Figura 1.4: Ron Konopka (esquerda) & Seymour Benzer (direita) em 2000, prestando depoimento sobre seus experimentos conduzidos mais de 30 anos antes, que resultaram na sua histórica publicação em 1971 sobre as primeiras drosófilas mutantes para ritmo circadianos que eles isolaram. Fonte: <http://www.hhmi.org/biointeractive/museum/exhibit00>.

1.3 – Propriedades Principais dos Relógios Biológicos

Os relógios biológicos, por definição, apresentam três propriedades fundamentais: persistência em livre-curso, arrastamento e compensação térmica (Johnson et al. 2003; Moore-Ede et al. 1982; Pittendrigh 1960).

A persistência do período em livre-curso é a capacidade do relógio biológico de manter a ritmicidade e uniformidade dos fenômenos comportamentais, fisiológicos e/ou moleculares que regula, mesmo quando o organismo é mantido em condições experimentais controladas e constantes em relação aos sinalizadores ambientais de passagem de tempo. Como comentado anteriormente (item 1.2), este fenômeno foi primeiramente observado em 1832 pelo botânico Augustin de Candolle, quando verificou que o ritmo circadiano dos movimentos foliares de *Mimosa pudica* persistia quando a planta era mantida em escuro constante, porém, apresentando um período um pouco mais curto do que o dia astronômico. Tal defasagem entre o período em livre-curso do fenômeno regulado pelo relógio endógeno e o período ambiental (que no caso dos ritmos circadianos é o ciclo de claro/escuro de 24 horas de duração que chamamos de “dia”) é um caráter fundamental da persistência em livre-curso. O termo “circadiano” literalmente significa “cerca de um dia” e faz alusão a esta propriedade (Johnson et al. 2003; Moore-Ede et al. 1982). O período em livre-curso é representado pela letra grega τ (*tau*) e é espécie-específico (Marques e Menna-Barreto 1999).

A segunda propriedade dos relógios biológicos foi inicialmente definida pela palavra francesa “*entrainer*” (arrastar) e posteriormente traduzida para o inglês como “*entrainment*” (*to entrain* = arrastar; embarcar em trem). Na tradução para a língua portuguesa, o termo usado é “arrastamento”, e define a capacidade do relógio biológico de perceber os indicadores ambientais de passagem de tempo e usá-los como referência para corrigir o pequeno erro que o período em livre curso apresenta em relação ao ciclo ambiental que prediz, e ser “arrastado” junto com ele. Alguns autores defendem que, tecnicamente, arrastamento não é sinônimo de sincronização, que por sua vez significaria que o perfil de onda do ciclo endógeno coincidiria com o perfil de onda do ciclo ambiental. O real efeito do arrastamento é tornar o período do ritmo biológico igual em média ao período do estímulo que o arrasta através de um acerto diário da diferença entre eles e, assim, uma relação de fase estável é estabelecida (Johnson et al. 2003). Entretanto, o resultado final observado é um efeito de sincronização do ritmo endógeno com o exógeno, logo, arrastamento e sincronização são muitas vezes considerados sinônimos no estudo dos relógios biológicos (Ben-Shlomo e Kyriacou 2002; Glaser e Stanewsky 2005; Hardin 2005).

Os estímulos ambientais indicadores de passagem de tempo capazes de promover o arrastamento de ritmos biológicos são chamados *Zeitgebers*, e os mais bem caracterizados são a luz e a temperatura (Aschoff 1963). No caso da luz, já foram identificadas em diversos organismos moléculas fotoreceptoras que desencadeiam uma cascata de eventos moleculares que resultam no arrastamento do relógio endógeno (Bell-Pedersen et al. 2005). Quanto à temperatura, sua capacidade em promover o arrastamento é muito reconhecida (Aschoff 1963; Rensing e Ruoff 2002), mas nenhuma molécula termo-sensível relacionada ao relógio biológico foi até a presente data identificada. Entretanto, recente publicação aponta para um gene candidato, *nocte* (*no circadian temperature entrainment*), caracterizando-se como o primeiro estudo sobre as bases genéticas do efeito da temperatura na regulação molecular do relógio circadiano em *Drosophila* (Glaser e Stanewsky 2005).

A terceira propriedade dos relógios biológicos é a termo-compensação. Variações de temperatura, de uma maneira geral, influenciam na cinética das reações químicas e dos processos fisiológicos. Entretanto, esse efeito não é observado no relógio endógeno. Ao que tudo indica a evolução dos relógios circadianos favoreceu aqueles com mecanismos capazes de compensar variações de temperatura ambiental e assim manter sua uniformidade. Em livre-curso, o período de um dado fenômeno rítmico mostra-se espécie-específico e uniforme em diferentes temperaturas, dentro da faixa tolerável para a fisiologia do organismo em questão, evidenciando a capacidade de termo-compensação do relógio endógeno. A importância desta capacidade está em permitir que o relógio circadiano consiga prever um dia de mesmo período tanto no inverno quanto no verão, pois, apesar de em grande parte dos ambientes terrestres a relação entre as fases clara e escura do dia variar ao longo das estações do ano, a soma das duas sempre resulta num dia de 24 horas. A maioria dos trabalhos sobre compensação térmica foi executada em plantas e insetos, organismos sem capacidade termo-reguladora, diretamente suscetíveis às variações de temperatura ambiental, indicando um mecanismo de compensação ativa, porém não ainda bem compreendido (Johnson et al. 2003; Moore-Ede et al. 1982). Interessantemente, o mesmo relógio endógeno capaz de compensar as variações de temperatura, é também capaz de perceber variações cíclicas ou pulsos de temperatura e usá-los como *zeitgebers* (Glaser e Stanewsky 2005).

1.4 – A regulação molecular do relógio endógeno em *Drosophila*

O modelo aceito para a regulação molecular do relógio endógeno em *Drosophila* inclui um conjunto de vários genes, sendo *timeless* (*tim*), *period* (*per*), *Clock* (*Clk*), *cycle* (*cyc*), *vri*, *PAR domain protein 1* (*Pdp1*), *double-time* (*dbt*) e *shaggy* (*sgg*) os principais e mais bem caracterizados. Muitos deles apresentam padrão circadiano de ciclagem de expressão de RNA mensageiro e/ou abundância de proteínas, configurando duas alças regulatórias de retro-alimentação negativa, interligadas, cujo período é de aproximadamente 24 horas. Desta forma, funcionam como o marca-passo central que compõe o relógio endógeno (Hardin 2005; Stanewsky 2002; Taghert e Lin 2005). Esses genes são expressos em muitos tecidos diferentes em *Drosophila*, mas é apenas a expressão rítmica dessas duas alças regulatórias em neurônios específicos no cérebro da mosca que determina o relógio central que controla os ritmos circadianos de atividade locomotora (Hardin 2005; Stanewsky 2002; Taghert e Lin 2005).

Consideremos como condição padrão moscas mantidas a um fotoperíodo de 12 horas de claro (dia) e 12 horas de escuro (noite). O momento em que o estímulo exógeno de passagem de tempo é dado, por exemplo, o ascender das luzes, é denominado *Zeitgeber Time zero* (ZT 0), a primeira hora a partir dele é o ZT 1 e assim por diante. A primeira alça é formada essencialmente pelos genes *tim*, *per*, *Clk* e *cyc*, que codificam, com exceção de *tim*, proteínas da família PAS, que contêm domínio de dimerização PAS. É comum às proteínas desta família possuírem ainda um domínio básico de hélice-alça-hélice (bHLH) responsável pela ligação a DNA, mas apenas os produtos de *cyc* e *Clk* o possuem, sendo a proteína PER um membro atípico da família PAS (vide item 1.2) (Stanewsky 2002). As proteínas CLK e CYC ligam-se através de seus domínios PAS e formam o heterodímero CLK-CYC que, a partir da metade do dia (ZT 6) até as primeiras horas da noite (ZTs 13-15), liga-se à região regulatória *E-box*² no promotor dos genes *tim* e *per* e ativa a transcrição destes. Evidências na sequência de CLK indicam que esta, e não CYC, possui o domínio de ativação da transcrição (Rutila et al. 1998), embora ambas as proteínas sejam necessárias para que haja a ligação ao DNA (Lee et al. 1999).

Com a ação dos fatores de transcrição CLK-CYC, a expressão de *tim* e *per* começa nas últimas horas do dia e atinge seu máximo nas primeiras horas da noite, entre os ZTs 13-

² Regiões *E-box* são sequências regulatórias no DNA cuja sequência de bases é CANNTG (N=qualquer nucleotídeo), e a elas ligam-se proteínas que atuam na regulação da expressão gênica. Como as regiões *E-box* citadas encontra-se adjacentes aos respectivos genes que regulam (estão nas regiões promotoras de *period* e *timeless*), são classificadas como elementos de regulação em *cis*. Cooper GM (2000) *The Cell - A Molecular Approach*, Sinauer Associates, Massachusetts.

16. A amplitude de ciclagem de ambos os genes é da ordem de 10 vezes (Blau e Young 1999; Hardin et al. 1990; Sehgal 1995; Taghert e Lin 2005).

Consequentemente, inicia-se no citoplasma a tradução e síntese das proteínas TIM e PER, a primeira atingindo abundância máxima entre os ZTs 17-19 e PER um pouco depois, entre os ZTs 19-21. A demora na acumulação de PER em relação a TIM é devida à ação da quinase DBT que fosforila PER, marcando-a para degradação via proteossoma (Edery et al. 1994; Price et al. 1998). No entanto, PER liga-se pelo domínio PAS à proteína TIM, formando o heterodímero PER-TIM, o que protege PER contra fosforilação por DBT e subsequente degradação. Desta forma, é preciso primeiramente que a TIM atinja certa concentração para que o dímero PER-TIM possa começar a ser formado e, assim, PER aumentar sua concentração no citoplasma (Hardin 2005; Stanewsky 2002, 2003; Taghert e Lin 2005; Yu et al. 2006).

Apesar de não ser mais capaz de fosforilá-la, DBT continua interagindo com PER mesmo na forma PER-TIM, formando o complexo PER-TIM-DBT (Kloss et al. 2001). Inclusive, é sugerido que a associação de DBT com PER é necessária para manter essa quinase no citoplasma, sendo o núcleo celular a localização preferencial para a forma monomérica de DBT (Kloss et al. 2001; Stanewsky 2002). O complexo PER-TIM-DBT é translocado para o núcleo celular por volta do meio da noite após fosforilação de TIM por uma outra quinase, SGG, produto do gene *shaggy* (*sgg*) (Martinek et al. 2001). Desta forma, enquanto DBT retarda a entrada das proteínas do relógio no núcleo, SGG acelera (Taghert e Lin 2005).

Há uma discussão na literatura acerca do destino de TIM após a fosforilação. Há muito é amplamente aceito que TIM é translocada para o núcleo celular na forma de complexo PER-TIM-DBT (Hardin 2005; Kloss et al. 2001; Stanewsky 2002), mas alguns trabalhos contestam esta questão com evidências da entrada de PER no núcleo sem estar associado a TIM (Meyer et al. 2006; Shafer et al. 2002). Mesmo que a entrada no núcleo não aconteça com PER e TIM juntas na forma de um complexo, é certo que essas proteínas interagem e que sem a presença de TIM no citoplasma, PER não entra no núcleo (Gekakis et al. 1995; Saez e Young 1996; Taghert e Lin 2005; Voshall et al. 1994). Nessa relação entre PER e TIM, alguns pontos já foram comprovados, dentre eles que até o ZT 20 mais de 80 por cento da quantidade total de PER está associada a TIM na proporção de 1:1 (Lee et al. 1998; Zeng et al. 1996), que TIM é o agente ativo no processo de entrada no núcleo celular (Ashmore et al. 2003) e que, ao que tudo indica, PER é o fator limitante e determinante para a capacidade do relógio de marcar o tempo endogenamente, enquanto a ciclagem de TIM seria acessória e regulatória em relação a

PER, uma vez que o relógio interno não é sensível a variações na concentração de *tim* (Ashmore et al. 2003; Rothenfluh et al. 2000; Taghert e Lin 2005). Stanewsky (2003) sugere ainda que SGG seja também, de forma conjunta ou independente ao complexo, translocada para o núcleo no mesmo momento.

O que se sabe ao certo é que, até o meio da noite, PER-TIM-DBT e/ou TIM + PER-DBT (com ou sem SGG) entram no núcleo celular após a fosforilação de TIM por SGG e promovem a inibição do fator de transcrição CLK-CYC, o que ocasiona a interrupção na transcrição de *per* e *tim*. Ao que tudo indica, a forma pela qual essa repressão acontece envolve a interação direta de PER (nas formas PER-TIM-DBT e PER-DBT) com CLK no final da noite e início da manhã, sem destituir a formação do heterodímero CLK-CYC, resultando na perda da capacidade deste último de se manter ligado ao DNA (Bae et al. 2000; Hardin 2005; Lee et al. 1999; Stanewsky 2002, 2003; Taghert e Lin 2005; Yu et al. 2006).

TIM mantém no núcleo a capacidade de proteger PER da fosforilação por DBT. No entanto, PER é encontrado no núcleo também na forma monomérica, quando é então hiper-fosforilado por DBT (e por outras quinases também), o que potencializa sua capacidade de interagir com o fator de transcrição CLK-CYC e liberá-lo do DNA. Stanewsky (2002) sugere que ao final da noite, TIM se dissociaria de PER-DBT, ocasionando a hiper-fosforilação de PER e potencialização de sua capacidade de inibir CLK-CYC, sendo a ocorrência de PER monomérico e hiper-fosforilado fundamental para a manutenção do período do relógio (Hardin 2005; Kloss et al. 2001). Como TIM entra no núcleo (associado ou não a PER-DBT), como e onde se dissocia de PER-DBT ainda é motivo de debate, mas os dados apontam para um papel de SGG em todas essas etapas (Stanewsky 2002, 2003).

Com a interrupção da transcrição de *per* e *tim*, as concentrações das proteínas PER e TIM começam a cair no meio da noite. Nas primeiras horas do dia, os níveis de TIM já são muito baixos, e os de PER, apesar de um pouco mais altos, também estão em queda. Neste momento, ocorre a etapa de acerto do relógio pelo estímulo luminoso. Assim que o sistema é exposto à luz, no início do dia, CRY é ativada e sofre alteração conformacional que permite sua ligação a TIM, desencadeando uma seqüência de eventos envolvendo fosforilação e ubiquitinação de TIM que levam à sua degradação prematura via proteossoma (Busza et al. 2004; Emery et al. 2000; Lin et al. 2001; Naidoo et al. 1999; Rieger et al. 2003; Stanewsky et al. 1998; Suri et al. 1998). Assim, TIM atinge sua concentração mais baixa nas primeiras horas do dia, enquanto PER demora até a metade do dia para tal. Na ausência de PER-TIM no núcleo, CLK-CYC liga-se novamente às regiões E-box de *per* e *tim* no meio do dia e recomeça o ciclo (Hardin 2005; Stanewsky 2003; Taghert e Lin 2005). Desta forma, temos na

primeira alça de retro-alimentação do relógio endógeno CLK-CYC ativando a transcrição de *per* e *tim* cujas proteínas vão formar um complexo que atua na sua própria repressão.

Ainda sobre a primeira alça, falta comentar sobre os ritmos de *Clk* e *cyc*. Começando pelo mais simples, *cyc* apresenta quantidades constantes de RNA mensageiro e proteína. Já *Clk* carece de explicação mais detalhada. Seu RNA mensageiro cicla em anti-fase em relação à *per* e *tim*, com início de sua transcrição na segunda metade da noite e abundância máxima nas primeiras horas do dia, sob o controle da segunda alça regulatória o que será explicado um pouco mais adiante. Quanto à proteína CLK, durante muitos anos acreditava-se que esta ciclava na mesma fase de seu RNA, ou seja, CLK estaria em queda justamente quando a transcrição de *per* e *tim* se iniciam, o que seria estranho sendo CLK fator de transcrição desses genes (Stanewsky 2002). No entanto, estudos recentes mostraram que o que cicla é o padrão de fosforilação de CLK. Esta proteína, assim como PER, é fosforilada por DBT, e, também como PER, é instável quando hiper-fosforilada. Por esse motivo, esta forma apresenta curva de abundância igual à de seu RNA, ou seja, com pico nas primeiras horas de luz, e é aquela que realmente decai quando *per* e *tim* estão começando a serem transcritos. Entretanto, na sua forma hipo-fosforilada e estável, CLK apresenta curva em fase quase oposta, acumulando no momento de queda de RNA mensageiro de *Clk*, e com pico nas últimas horas do dia. Portanto, é essa forma que garante a formação de CLK-CYC no meio do dia para iniciar a transcrição de *per* e *tim*. Considerando o somatório das formas hiper e hipo-fosforiladas, a concentração total de CLK não cicla (Hardin 2005; Yu et al. 2006).

Um esquema gráfico sobre a dinâmica da primeira alça regulatória do relógio circadiano de *Drosophila* está representado na Figura 1.5. A Figura 1.6 mostra ainda o padrão de ciclagem de RNA mensageiro e proteína ao longo do período de 24 horas dos mesmos genes.

A segunda alça de retro-alimentação negativa é responsável pela regulação da ciclagem da transcrição de *Clk*. A ativação rítmica de genes por ação do fator de transcrição CLK-CYC é ponto comum às duas alças regulatórias do relógio endógeno, e o efeito de PER-TIM em inibir a ação de CLK-CYC, promovendo sua soltura do DNA, também é compartilhado nas duas alças (Cyran et al. 2003; Glossop et al. 2003; Glossop et al. 1999; Hardin 2005; Hardin et al. 1990). Na segunda alça regulatória, CLK-CYC age como ativador dos genes *vri* (*vri*) e *PAR-domain protein 1* isoforma ϵ (*Pdp1 ϵ*), que codificam as proteínas VRI e PDP1 ϵ , ambos fatores de transcrição do tipo zíper de leucina com domínios básicos de ligação a DNA muito conservados, sugerindo ligarem-se ao mesmo alvo, competindo pelo mesmo sítio de ligação na região regulatória de *Clk*, conhecido como VRI/PDP ϵ -box (V/P

box), e agindo como repressor e ativador de *Clk*, respectivamente (Blau e Young 1999; Cyran et al. 2003; George e Terracol 1997; Hardin 2005).

CLK-CYC começa a se ligar à região promotora de *vri* e *Pdp1ε* por volta do meio do dia, mesmo horário em que age positivamente sobre *per* e *tim*, e resulta em forte ativação de suas expressões. Porém, as cinéticas de acumulação dos RNAs e proteínas desses genes são diferentes. No caso de *vri*, seu RNA mensageiro cicla em fase muito parecida à da proteína VRI, com pico no início da noite, por volta do ZT 12 para o RNA mensageiro e ZT 15 para a proteína. Neste momento, VRI liga-se à região regulatória de *Clk*, promovendo a inibição da transcrição deste. *Pdp1ε* atinge concentração máxima cerca de 3 a 6 horas depois de *vri* o que pode ser explicado por diferenças na “força” das regiões promotoras desses genes, ou na meia-vida de seus RNAs mensageiros (Cyran et al. 2003). PDP1ε acumula em altos níveis no ZT 18 e desloca VRI do sítio de ligação V/P box e liga-se a esse, resultando na ativação da transcrição de *Clk* a partir da metade da noite, chegando a seus mais altos níveis nas primeiras horas do dia. No entanto, a presença de PER, repressor de CLK-CYC, no núcleo celular na segunda metade da noite inibe a ação deste fator de transcrição não apenas na primeira alça regulatória, mas na segunda também. No fim da noite, ambas as proteínas VRI e PDP1ε já apresentam valores bastante baixos de suas concentrações. Com a degradação de PER na primeira metade do dia, CLK-CYC torna a ativar os genes de ambas as alças regulatórias (Cyran et al. 2003; Hardin 2005). Vale ressaltar ainda que alguns estudos com mutantes sugerem a existência de um outro fator de transcrição de *Clk* responsável pela ativação constante do gene, que seria então modulada por *vri* e *Pdp1ε*. Entretanto, não foi apontada ainda uma proteína candidata para esse papel (Glossop et al. 1999; Hardin 2005). Como resultado desta segunda alça regulatória, os níveis de RNA mensageiro do gene *Clk* variam na ordem de 5 vezes dentro de um período de 24 horas (Yu et al. 2006), *vri* cerca de 10 vezes (Blau e Young 1999; Cyran et al. 2003) e *Pdp1ε* aproximadamente 5 vezes (Cyran et al. 2003).

Um esquema gráfico sobre a dinâmica da segunda alça regulatória do relógio circadiano de *Drosophila* está representado na Figura 1.7. A Figura 1.8 mostra ainda o padrão de ciclagem de RNA mensageiro e proteína ao longo do período de 24 horas dos mesmos genes.

Na figura 1.9, é possível visualizar todo o perfil temporal de ciclagem de expressão gênica e abundância das proteínas dos genes envolvidos em ambas as alças que determinam o relógio circadiano de *Drosophila*, dentro de um intervalo de 24 horas, bem como alguns eventos críticos nesse processo.

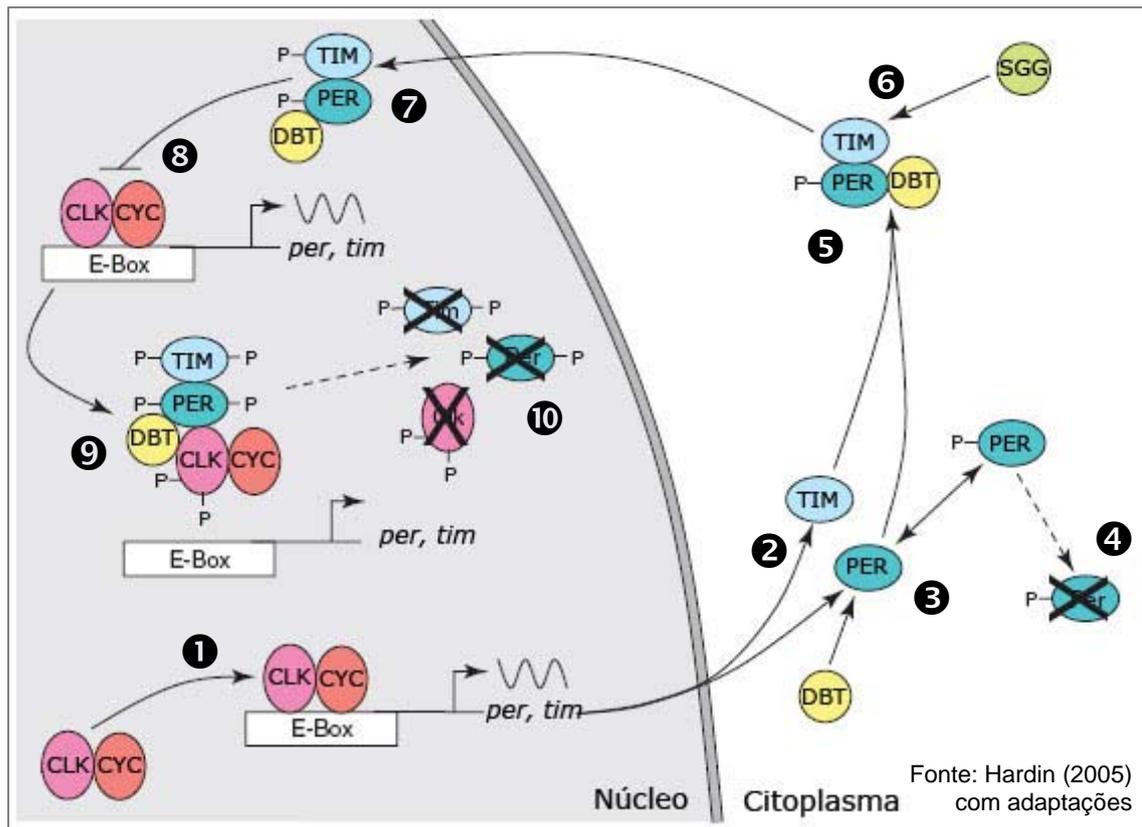


Figura 1.5: Representação esquemática da primeira alça de retro-alimentação negativa do relógio endógeno de *Drosophila melanogaster*. **1** No núcleo celular, o dímero CLOCK-CYCLE (CLK-CYC) liga-se à região E-box no promotor dos genes *period* (*per*) e *timeless* (*tim*) agindo como fator de transcrição dos mesmos. **2** As respectivas proteínas PER e TIM são sintetizadas no citoplasma, onde **3** PER é fosforilada por DOUBLE-TIME (DBT) e **4** degradada, salvo quando **5** associada a TIM. **6** TIM é fosforilada por SHAGGY (SGG), o que permite **7** a translocação do complexo de proteínas para o núcleo celular, onde vai **8** bloquear a ação do complexo CLK-CYC através da interação física por intermédio de PER, **9** promovendo a soltura de CLK-CYC da região E-box de *per* e *tim*, cessando com a transcrição destes. Em seguida, **10** TIM, PER e CLK na sua forma hiperfosforilada, são degradadas. O ciclo recomeça quando PER-TIM desaparecem do núcleo e CLK-CYC começa a acumular novamente e ativar a transcrição de *per* e *tim*.

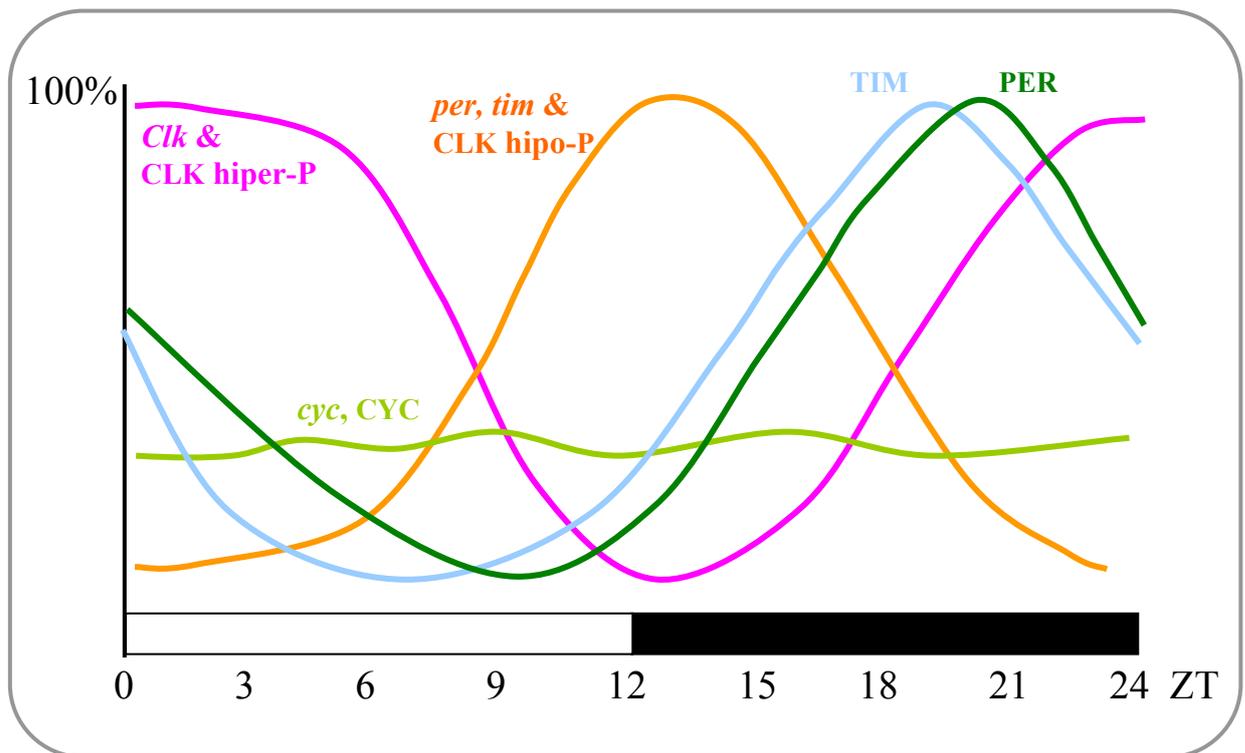


Figura 1.6: Representação gráfica do perfil de abundância relativa de RNA mensageiro e proteína, num intervalo de 24 horas, dos genes envolvidos na primeira alça de retroalimentação negativa do relógio endógeno de *Drosophila melanogaster*, *period* (*per*), *timeless* (*tim*), *Clock* (*Clk*) e *cycle* (*cyc*). O RNA mensageiro é indicado em letra minúscula e itálico, enquanto as proteínas indicadas em letra maiúscula. “CLK hiper-P” refere-se à proteína CLOCK na sua forma hiperfosforilada, enquanto “CLK hipo-P” refere-se à sua forma hipofosforilada. O eixo das abscissas representa o tempo de acordo com o *Zeitgeber Time* (ZT). O ZT zero indica o momento em que a luz é acesa e ZT 12 o momento em que ela se apaga, perfazendo um ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, como representam as barras branca e preta, respectivamente, no eixo das abscissas. Não estão representadas no gráfico as quinases *double-time* e *shaggy*, a primeira com expressão similar a *cycle*, ou seja, constante ao longo do tempo para RNA mensageiro e proteína, e a segunda sem informação precisa na literatura. Esta figura foi criada a partir da compilação de informações contidas em vários artigos, citados no item 1.4 deste trabalho.

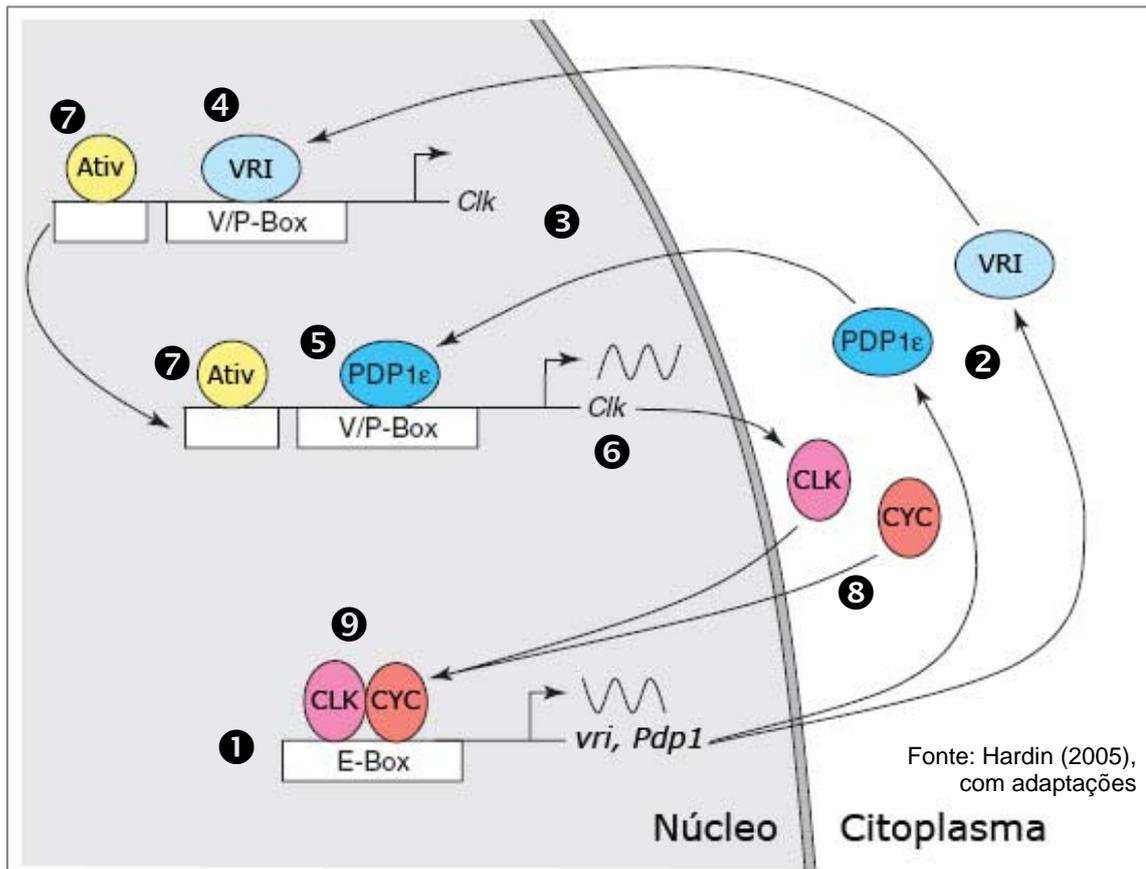


Figura 1.7: Representação esquemática da segunda alça de retro-alimentação negativa do relógio endógeno de *Drosophila melanogaster*. ❶ No núcleo celular, o dímero CLOCK-CYCLE (CLK-CYC) liga-se à região E-box no promotor dos genes *vri* e *PAR-domain protein 1* (*Pdp1*), agindo como fator de transcrição dos mesmos. ❷ As respectivas proteínas VRI e PDP1 ϵ são sintetizadas no citoplasma e depois ❸ entram no núcleo celular onde competem pelo mesmo sítio de ligação na região promotora de *Clock* (*Clk*), chamado VRI/PDP1 ϵ box (V/P box). ❹ VRI, com ação repressora da transcrição de *Clk*, atua primeiro. ❺ Em seguida VRI é deslocada e PDP1 ϵ liga-se à V/P box, ❻ promovendo a transcrição de *Clk*. Alguns estudos apontam para a existência de um outro fator de transcrição de *Clk* responsável pela ativação constante do gene ❼ (*Ativ*), que seria então modulada por *vri* e *Pdp1 ϵ* . Uma proteína candidata ainda não foi identificada. ❸ No citoplasma, é sintetizada a proteína CLK. ❾ No núcleo celular, CLK encontra-se associado à CYC e o heterodímero recomeça novo ciclo.

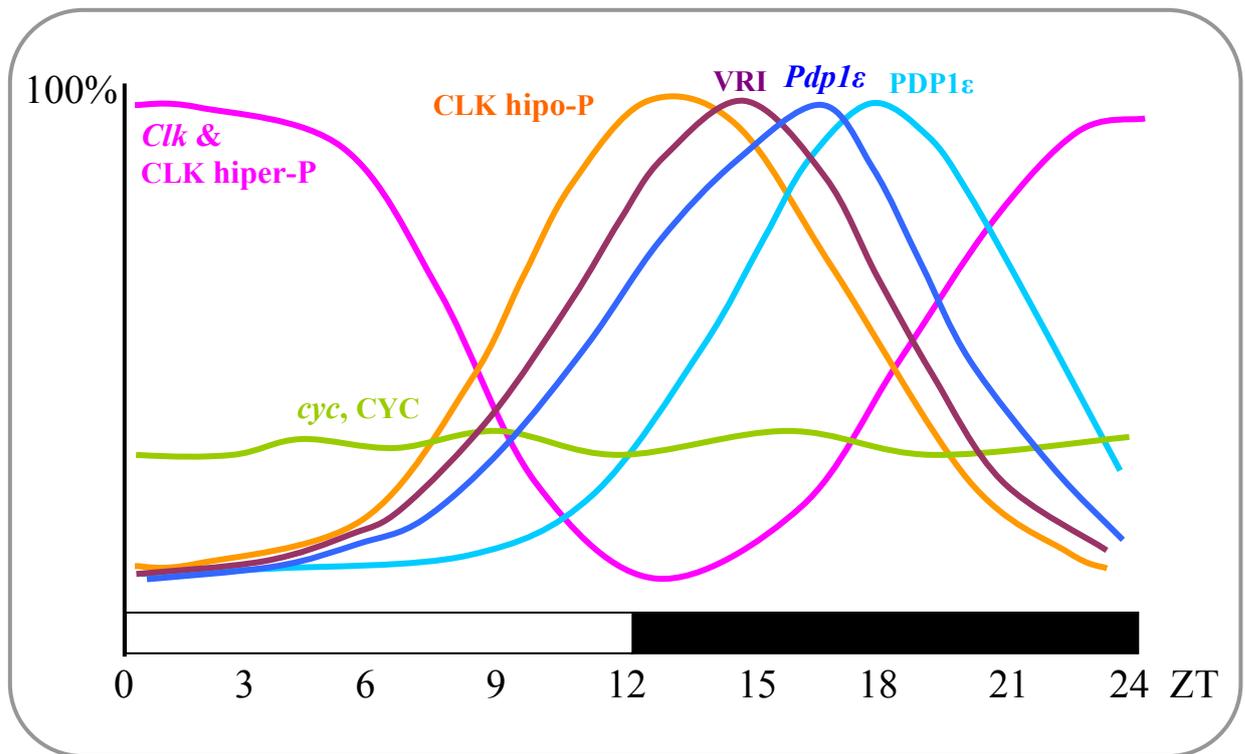


Figura 1.8: Representação gráfica do perfil de abundância relativa de RNA mensageiro e proteína, num intervalo de 24 horas, dos genes envolvidos na segunda alça de retroalimentação negativa do relógio endógeno de *Drosophila melanogaster*, *Clock* (*Clk*), *cycle* (*cyc*), *vri* (*vri*) e *PAR-domain protein 1* isoforma ϵ (*Pdp1\epsilon*). O RNA mensageiro é indicado em letra minúscula e itálico, enquanto as proteínas indicadas em letra maiúscula. “CLK hiper-P” refere-se à proteína CLOCK na sua forma hiperfosforilada, enquanto “CLK hipo-P” refere-se à sua forma hipofosforilada. O eixo das abscissas representa o tempo de acordo com o *Zeitgeber Time* (ZT). O ZT zero indica o momento em que a luz é acesa e ZT 12 o momento em que ela se apaga, perfazendo um ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, como representam as barras branca e preta, respectivamente, no eixo das abscissas. Esta figura foi criada a partir da compilação de informações contidas em vários artigos, citados no item 1.4 deste trabalho.

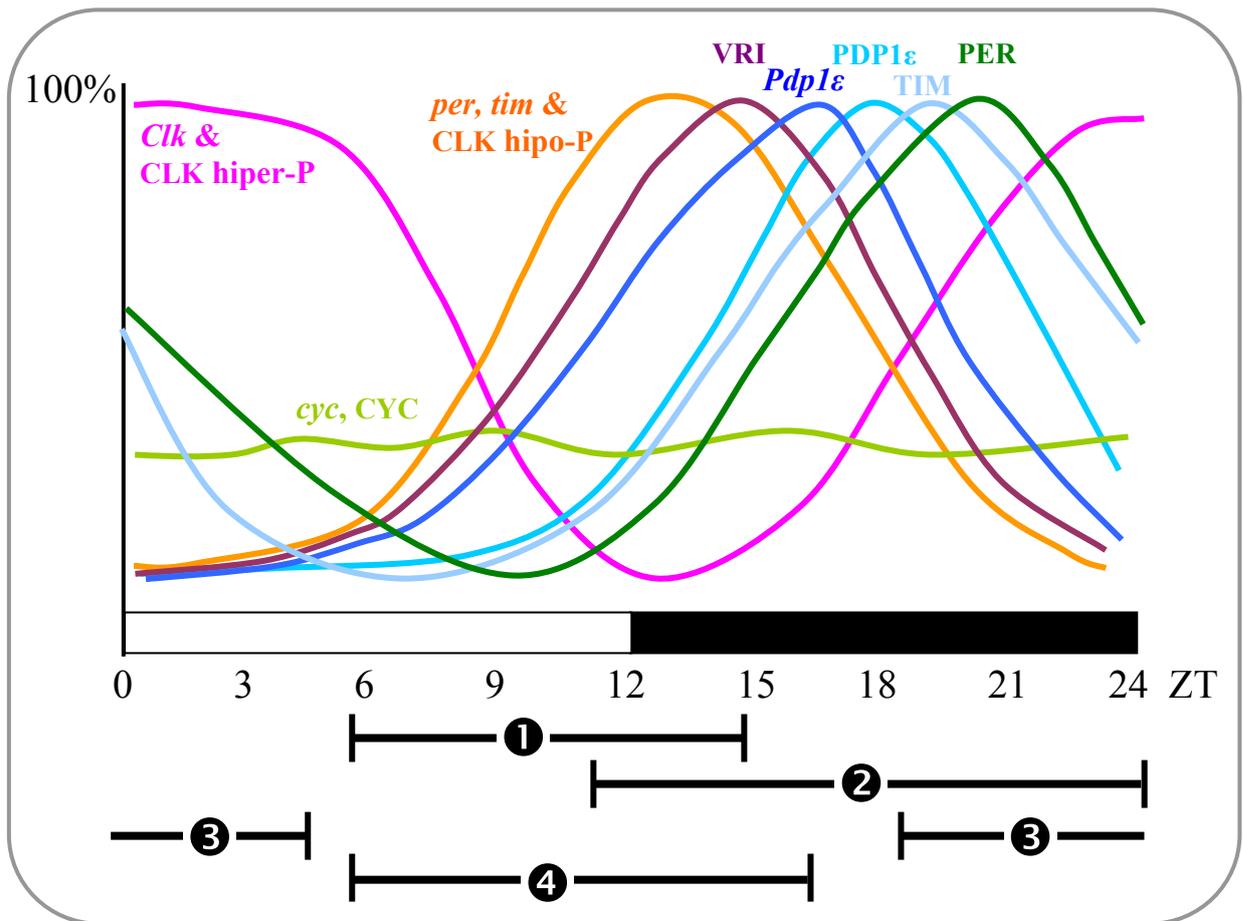


Figura 1.9: Representação gráfica do perfil de abundância relativa de RNA mensageiro e proteína, num intervalo de 24 horas, dos genes envolvidos nas duas alças de retro-alimentação negativa do relógio endógeno de *Drosophila melanogaster*, *period* (*per*), *timeless* (*tim*), *Clock* (*Clk*), *cycle* (*cyc*) *vri*lle (*vri*) e *PAR-domain protein 1* isoforma ϵ (*Pdp1\epsilon*). O RNA mensageiro é indicado em letra minúscula e itálico, enquanto as proteínas indicadas em letra maiúscula. “CLK hiper-P” refere-se à proteína CLOCK na sua forma hiper-fosforilada, enquanto “CLK hipo-P” refere-se à sua forma hipo-fosforilada. O eixo das abscissas representa o tempo de acordo com o *Zeitgeber Time* (ZT). O ZT zero indica o momento em que a luz é acesa e ZT 12 o momento em que ela se apaga, perfazendo um ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, como representam as barras branca e preta, respectivamente, no eixo das abscissas. Não estão representadas no gráfico as quinases *double-time* e *shaggy*, a primeira com expressão similar a *cycle*, ou seja, constante ao longo do tempo para RNA mensageiro e proteína, e a segunda sem informação precisa na literatura. Abaixo do gráfico estão indicados 4 momentos onde ocorrem alguns eventos críticos na regulação do relógio endógeno. **1** CLK-CYC liga-se à região E-box no promotor de *tim*, *per*, *vri* e *Pdp1\epsilon* e ativa a transcrição destes; **2** PER-TIM no núcleo: começa a entrar no final do dia e acumulam em valores máximos no final da noite; **3** PER-TIM inibe CLK-CYC; DOUBLE-TIME observado predominantemente no núcleo nesse momento; **4** PER e TIM desaparecem do núcleo e novo ciclo de transcrição é iniciado por CLK-CYC. Esta figura foi criada a partir da compilação de informações contidas em vários artigos, citados no item 1.4 deste trabalho.

1.5 – Mosquitos e ritmos circadianos

Os culicídeos são insetos da família Culicidae, pertencentes à ordem Diptera e subordem Nematocera, popularmente conhecidos como mosquitos, pernilongos, carapanãs ou muriçocas. Com exceção dos gêneros *Toxorhynchites* e *Malaya*, todos os culicídeos são hematófagos e desde a antiguidade muitas espécies são reconhecidas como transmissoras de agentes causadores de doenças a humanos e a outros animais (Borror et al. 1989; Consoli e Lourenço-de-Oliveria 1994; Forattini 2002). São registradas pela ciência cerca de 3.600 espécies, com distribuição cosmopolita e concentração na região Neotropical (Crosskey 1988).

Além de numeroso, o grupo é bastante diversificado quanto a aspectos da ecologia e biologia das espécies, incluindo os padrões de comportamento, existindo espécies diurnas, noturnas e crepusculares (Clements 1999; Consoli e Lourenço-de-Oliveria 1994; Forattini 2002) e muitos estudos sobre ritmos circadianos podem ser conduzidos com esses organismos tanto no campo quanto no laboratório. Soma-se a isso o fato de muitas espécies serem vetores de agentes causadores de doenças ao homem e a outros animais. O conhecimento dos padrões de comportamento de espécies de vetores é de grande importância no entendimento da dinâmica das doenças transmitidas por eles e no planejamento de técnicas de controle (Klowden 1996), tornando o estudo aprofundado dos ritmos de atividade e alimentação em culicídeos não apenas interessante para o campo da cronobiologia mas também uma necessidade prática para quem vislumbra o melhor entendimento desses vetores e do potencial de diferentes populações e espécies em transmitir patógenos.

A implicação do estudo do comportamento de culicídeos no âmbito da epidemiologia não envolve apenas a regulação da atividade circadiana de realizar o repasto sangüíneo ou a preferência pela fonte de sangue, mas também a sua interação com o parasita ou vírus que transmite. Isso porque algumas espécies apresentam relação interessante entre seu comportamento e a transmissão de parasitoses. Dentre os membros da subfamília Culicinae, *Culex pipiens quinquefasciatus* é vetor da filariose bancroftiana, causada pelo Nematelminto *Wuchereria bancrofti*. Existe um acoplamento perfeito entre o hábito hematofágico noturno deste vetor e o horário em que as microfilárias, infectantes ao mosquito, encontram-se no sangue periférico dos humanos. Durante o dia as microfilárias não são encontradas na circulação periférica das pessoas infectadas. Ao anoitecer, geralmente antes da pessoa ir dormir, a concentração dessas microfilárias no sangue periférico começa a subir, atingindo um clímax nas primeiras horas da madrugada, e pela manhã, antes mesmo da pessoa despertar

já não são mais encontradas (Rey 1991). Espécies do complexo *Cx. pipiens* são, ainda, transmissoras do vírus do Oeste do Nilo (Anderson e Main 2006; Savage et al. 2006; Sirigireddy et al. 2006).

A subfamília Culicine agrupa muitas espécies de comportamento diversificado e um outro exemplo é o mosquito diurno *Aedes aegypti*³, vetor dos vírus causadores da Dengue e da Febre Amarela (Consoli e Lourenço-de-Oliveria 1994).

A subfamília Anophelinae compreende, dentre outras, as espécies do gênero *Anopheles*, essencialmente crepusculares, muitas vezes com horários de atividade restritos a curtos intervalos de tempo, o que implica uma regulação altamente precisa do comportamento. Algumas desempenhando papel importante na transmissão do *Plasmodium* causador da malária, como a espécie do continente africano *Anopheles gambiae s. l.*, ou as espécies de ocorrência no Brasil *Anopheles darlingi*, *Anopheles albitarsis s. l.*, *Anopheles aquasalis* e *Anopheles cruzi* (Consoli e Lourenço-de-Oliveria 1994). Dados da Organização Mundial de Saúde estimam uma incidência anual da doença no mundo entre 300 a 500 milhões de casos, envolvendo cerca de 1,5 a 2,7 milhões de mortes por ano (Snow et al. 1999). No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde aproximadamente 500.000 casos foram registrados anualmente na última década apenas na bacia do Amazonas (Ministério-da-Saúde 2005).

Há disponível na literatura um certo número de publicações sobre o comportamento de diversas espécies de mosquitos na natureza, evidenciando a complexidade dos ritmos de atividade e alimentação no grupo [e. g. (Elliott 1972; Forattini et al. 1996; Guimaraes et al. 1997; Guimaraes et al. 2004; Guimaraes et al. 2000a; Guimarães et al. 2000; Guimaraes et al. 2001; Guimaraes et al. 2000b; Haddow 1954, 1960; Voorham 2002)].

Num exemplo interessante, J. D. Gillet (Gillet 1971) reporta a observação consistente ao longo de vários dias da sucessão de picos de atividades de espécies simpátricas no campo. Nas horas que antecediam o crepúsculo vespertino, nenhuma fêmea era registrada realizando repasto sanguíneo. Entretanto, instantes antes do por do Sol, observava-se um enxame de *Aedes ingrami* em atividade hematofágica que declinava após cerca de 15 minutos, quando

³ O gênero *Aedes* é reconhecidamente parafilético e alguns estudos tentam esclarecer as relações filogenéticas do grupo, por vezes sugerindo sua reorganização quanto à nomenclatura das espécies, envolvendo a elevação de subgêneros à categoria de gênero (Reinert 2000). Este é o caso de *Aedes aegypti*, para a qual Reinert e colaboradores (2004) propõem que seja renomeada com *Stegomyia aegypti*. Entretanto, a reorganização do gênero *Aedes* ainda divide os especialistas. Por este motivo, neste trabalho foi decidido pelo uso do nome tradicional, *Aedes aegypti*, como o fazem ainda muitas revistas científicas especializadas em entomologia. (de acordo com informações encontradas em páginas de internet especializadas, em março de 2007 –

<http://www.mosquitocatalog.org/main.asp> ;

http://www.entsoc.org/pubs/Periodicals/JME/mosquito_name_policy.htm).

Reinert JF (2000) New classification for the composite genus *Aedes* (Diptera: Culicidae: Aedini), elevation of subgenus *Ochlerotatus* to generic rank, reclassification of the other subgenera, and notes on certain subgenera and species. *J Am Mosq Control Assoc* 16:175-188.

Reinert JF, Harbach RE and Kitching IJ (2004) Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zool J Linnean Soc* 142:289-368.

tinha início a atividade de *Aedes africanus*. A atividade concomitante das duas espécies durava uns 5 minutos e em seguida a primeira desaparecia e a segunda aumentava até seu pico máximo de atividade, declinando depois até desaparecer, num espaço de tempo de aproximadamente 20 minutos (Gillet 1971). Outro exemplo vem de estudos de Pittendrigh (Pittendrigh 1950) em Trinidad, sobre duas espécies de anofelinos pertencentes ao subgênero *Kerteszia*. Ele observou que *Anopheles homunculus* concentrava-se na porção nordeste e extremamente úmida da ilha, gradualmente substituído por *Anopheles bellator*, espécie muito próxima evolutivamente, e que concentrava-se na porção sudoeste e mais seca da ilha. Na região central, onde as espécies ocorriam em simpatria, ele verificou que o horário do pico de atividade das mesmas era diferente, sendo *An. bellator* registrado no início da noite e *An. homunculus* aproximadamente uma hora depois. O horário de atividade mantinha-se consistente a qualquer dia, independentemente da umidade registrada, demonstrando que o pico de atividade não estava condicionado aos valores de umidade relativa do ar registrados, mas ao horário do dia em si (Pittendrigh 1950, 1993).

Além dos trabalhos sobre ritmos circadianos de mosquitos no campo, alguns pesquisadores conduziram estudos submetendo espécies a condições controladas em laboratório para tentar entender o mecanismo endógeno responsável pelo comportamento e quais os componentes ambientais que poderiam estar influenciando no ritmo observado. O primeiro artigo desta natureza data de 1918 (Roubaud 1918) e se ocupou do estudo do ritmo de vôo espontâneo de *Anopheles maculipennis*. Outra publicação dessa natureza só foi acontecer novamente muitos anos depois, em 1941, e teve como objeto de estudo *Anopheles superpictus* e sua resposta a diferentes condições de luz (Bates 1941). Na década de 60, é desenvolvido o aparato para detecção automática da atividade dos mosquitos, facilitando enormemente a condução dos experimentos em laboratório (Jones 1964), contribuindo para aumento no número de publicações na área a partir dessa época. Dentre elas, destacam-se aquelas sobre o principal vetor de malária na África, *An. gambiae* (Jones et al. 1972; Jones et al. 1966; Jones e Gubbins 1978; Jones e Gubbins 1977; Jones et al. 1967; Jones e Reiter 1975; Mnzava e Curtis 1989; Rowland 1991), sobre o principal vetor de malária na Ásia, *Anopheles stephensi* (Jones 1974; Rowland 1989, 1990, 1991; Rowland e Boersma 1988), sobre *Ae. aegypti* (Jones 1981; Rowland e Lindsay 1986; Rowley e Graham 1968a, b; Taylor e Jones 1969), sobre *Cx. pipiens quinquefasciatus* (Jones 1976, 1982; Jones e Gubbins 1979; Peterson 1980a, b, c; Peterson e Jones 1979) e outros membros do complexo *Cx. pipiens* (Chiba 1964; Chiba et al. 1982; Chiba et al. 1992; Chiba e Tomioka 1992; Chiba et al. 1993; Chiba et al. 1981; Chiba et al. 1990). É interessante também citar o trabalho de Bryan Taylor,

desenvolvido durante sua tese de Doutorado, sobre o comportamento de 15 diferentes espécies de mosquitos em vários regimes de claro/escuro, e disponibilizado pelo autor em página na internet (Taylor 1998).

Os experimentos de laboratório baseados na detecção automática do ritmo de atividade de mosquitos dividem-se, principalmente, em duas abordagens: registro do som de vôo por intermédio de aparato acústico (Bennet-Clark 1984; Jones 1963; Peterson 1979; Rowley et al. 1987) ou detecção do movimento (vôo ou locomoção) dos insetos através de equipamento foto-eletrônico baseado em feixes de luz infra-vermelha [e. g. (Kasai e Chiba 1987; Kawada e Takagi 2004; Shinkawa et al. 1994)]. Com estas estratégias, muitos estudos sobre o efeito de diferentes fatores no padrão de atividade/repouso de várias espécies de mosquito foram extensamente documentados em laboratório. Alguns exemplos são: o estudo do efeito da luz (diferentes regimes de luz, pulsos de luz, etc.) no ritmo circadiano de atividade/repouso (Clopton 1984; Jones 1974, 1976, 1982; Jones et al. 1972; Jones et al. 1966; Jones et al. 1967; Kawada et al. 2005; Nayar e Sauerman 1971; Shinkawa et al. 1994; Taylor 1977; Taylor e Jones 1969), efeito da inseminação, alimentação e oviposição na atividade/repouso das fêmeas (Chiba et al. 1992; Jones 1981; Jones e Gubbins 1978, 1979; Jones e Gubbins 1977), efeito da idade (Rowley e Graham 1968a), efeito da umidade e/ou temperatura (Chiba et al. 1993; Rowley e Graham 1968b), o efeito da infecção por parasitas (Berry et al. 1986, 1987a, 1988; Berry et al. 1987b; Lee et al. 2000; Rowland e Boersma 1988; Rowland e Lindsay 1986), e efeito da remoção dos olhos (Kasai e Chiba 1987). Alguns estudos abordaram ainda o comportamento específico de busca ativa do mosquito pela fonte de hematofagia (Kawada e Takagi 2004; Klowden 1996). Clements e colaboradores (Clements 1999) aborda de forma concisa e coesa grande parte dos estudos supracitados.

Com todas essas informações acerca do comportamento de várias espécies de mosquitos evolutivamente próximas e, ainda, sobre os fatores ambientais ou fisiológicos que modulam seus perfis de atividade circadiana, o grupo dos culicídeos mostra-se altamente atraente para investigações de âmbito molecular sobre a regulação dos ritmos circadianos. Entretanto, esta é uma das áreas ainda pouco exploradas em espécies de insetos vetores. Esse fato ressalta a grande necessidade e ótima oportunidade referente a estudos moleculares sobre o relógio biológico em culicídeos.

1.6 – Objetivos

1.6.1 – Objetivo Geral

Estudar as bases moleculares do relógio circadiano que controlam os ritmos de atividade em mosquitos.

1.6.2 – Objetivos Específicos

- Determinar o padrão de atividade/repouso em regime de claro/escuro e escuro constante das linhagens de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* utilizadas no presente estudo.
- Isolar e sequenciar um fragmento do gene *rp49* em *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* para ser utilizado como controle endógeno nos experimentos de quantificação da expressão gênica nessa espécie.
- Estabelecer a seqüência codificante integral do gene *timeless* em *Aedes aegypti* e compará-la com a seqüência em *Drosophila melanogaster* para identificação da similaridade entre os domínios conhecidos como funcionais na regulação do relógio biológico.
- Clonar e sequenciar um fragmento do gene *cycle* de *Aedes aegypti*. Utilizá-lo como base no desenho de oligos para experimentos de expressão gênica.
- Realizar uma análise preliminar do padrão de expressão gênica de *timeless* e *cycle* em machos de *Aedes aegypti* mantido em regime de claro/escuro.
- Obter fragmentos dos genes *period* e *Clock*, em *Aedes aegypti* e desenhar oligos para experimentos de expressão gênica em fêmeas da espécie.

- Obter fragmentos dos genes *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em *Culex quinquefasciatus* por análise da informação disponível no banco de dados digital da espécie. Desenhar oligos para experimentos de expressão gênica.
- Determinar o padrão de expressão gênica circadiana de *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em cabeça de fêmeas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em regime de claro/escuro e escuro constante.
- Determinar o padrão de expressão gênica circadiana de *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* no corpo de fêmeas de *Aedes aegypti* em regime de claro/escuro.
- Analisar o efeito da inseminação e da hematofagia na expressão dos genes de relógio *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em corpo e cabeça de *Aedes aegypti*.
- Promover o silenciamento da expressão de *timeless* em *Aedes aegypti* e investigar o efeito deste no padrão de atividade/repouso da espécie, tanto em regime de claro/escuro como escuro constante.

2. Material e Métodos

Os mosquitos utilizados nos experimentos conduzidos ao longo deste trabalho foram *Aedes aegypti* linhagem Rockefeller e *Culex quinquefasciatus* linhagem IBEx, ambos oriundos de colônias mantidas pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Vetores, LAFICAVE (Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro), no Instituto de Biologia do Exército (IBEx).

Estudos iniciais envolvendo machos de *Ae. aegypti* encontram-se descritos nos Anexos I e II. Os demais experimentos realizados com *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* e relatados a seguir foram todos conduzidos exclusivamente com fêmeas.

2.1 – Padrão de atividade/repouso

O padrão de atividade/repouso de fêmeas virgens de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* foi monitorado com o uso do equipamento *Locomotor Activity Monitor* (TriKinetics), inicialmente desenvolvido para estudos com *Drosophila* e posteriormente adaptado a insetos um pouco maiores, como mosquitos. Neste equipamento, mosquitos são acondicionados individualmente em pequenos tubos de vidro de sete centímetros de comprimento, um centímetro de diâmetro externo, e diâmetro interno entre 0,7 e 0,8 centímetros. Em uma das extremidades dos tubos é colocado algodão embebido em solução de sacarose a 10% e então ambas as extremidades são seladas com *parafilm*. Os tubos são encaixados em placas especiais contendo sensores de movimento que compreendem um ponto de emissão e um de detecção de raio infravermelho. Em cada placa, podem ser colocados até 32 tubos contendo um mosquito cada, havendo um sensor independente de raio infravermelho para cada uma das 32 posições. A placa é conectada a um cabo, dentro de uma incubadora (*Precision Scientific Incubator Mod. 818*), e esse cabo conecta-se a um computador. Quando o inseto está ativo, ele caminha dentro do tubo, interrompe o feixe de luz infravermelha e o computador registra o evento através do programa *Drosophila Activity Monitoring System* (DAM) versão 2.0.6 para *Windows*. Cada ponto de registro de atividade computa o somatório dos movimentos detectados nos 30 minutos anteriores. A Figura 2.1 ilustra o equipamento descrito.



Figura 2.1: Ilustração do experimento de monitoramento da atividade/repouso. a) Incubadora *Precision Scientific Mod. 818* com a porta fechada. b) A mesma incubadora com a porta aberta, onde se vê o posicionamento das lâmpadas na parte interna da porta e ainda a placa com os tubos individuais sobre uma das prateleiras. c) Detalhe da placa de 32 tubos individuais contendo um mosquito cada. Na porção central dos tubos um leitor infravermelho detecta o movimento dos insetos. d) Detalhe do tubo de vidro onde os mosquitos são acondicionados individualmente.

A incubadora utilizada permite o controle de regime de luz e temperatura com programação independente para cada dia. Desta forma, com o uso desse equipamento, foi possível monitorar ao longo de muitos dias sucessivos a atividade individual de mosquitos, sob condições controladas quanto ao fotoperíodo e temperatura. A transição de luz deste equipamento do regime claro para escuro e vice-versa é abrupta. A umidade relativa dentro dos tubos onde os mosquitos encontram-se confinados mantém-se alta e constante, uma vez que os tubos selados contêm algodão úmido e conservam esta umidade até o final do experimento.

O comportamento de atividade/repouso de fêmeas adultas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* foi monitorado sob dois regimes de diferentes fotoperíodo. No primeiro, 32 indivíduos de cada espécie foram mantidos em ciclos de 12 horas de claro e 12 horas de escuro por quatro dias. No segundo, 16 indivíduos de cada espécie permaneceram dois dias nesse mesmo regime e depois passaram a escuro constante por quatro dias. Os experimentos de monitoramento da atividade eram iniciados com mosquitos com 2 a 3 dias de idade.

A temperatura foi mantida constante a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e a umidade permaneceu alta devido ao algodão embebido em solução de sacarose e vedação dos tubos. O valor de temperatura adotado e a alta umidade já foram demonstrados em várias oportunidades serem adequados a estudos em laboratório tanto para *Ae. aegypti* (Christophers 1960) como para *Cx. quinquefasciatus* (Chiba et al. 1992; Chiba et al. 1993; Shinkawa et al. 1994).

Após o período de monitoramento da atividade, os resultados foram analisados com auxílio do programa de computador Excel. Primeiramente foram excluídos os mosquitos que morreram ao longo do experimento. Em seguida, foi calculada para cada espécie a média de Williams da atividade a cada trinta minutos entre os indivíduos sobreviventes. A média de Williams é uma adaptação da média geométrica de maneira a permitir o cálculo incluindo valores zero (Haddow 1954, 1960; Williams 1937).

Os dados receberam ainda três versões de tratamentos visando diminuição de ruído experimental. Na primeira, os pontos de registro de atividade imediatamente após as transições de luz (acender e apagar das luzes) foram interpolados e, ainda, foram feitas as médias móveis de três pontos para todos os registros de atividade, com exceção daqueles adjacentes a transições de luz, para os quais a média móvel foi calculada apenas com dois pontos, de forma a evitar a mistura de registros de atividade de fase clara com fase escura. Outro tratamento dos dados foi convertê-los a valores binários (zero para não ativo e um para ativo), evidenciando os resultados em termos de proporção de indivíduos ativos, e não mais de quantidade de atividade. Esses valores também sofreram tratamento para diminuição do

ruído experimental descrito acima para os valores em média de Williams, incluindo interpolação do ponto de transição de luz e média móvel.

Com os resultados, foram montados gráficos representativos do padrão de atividade/repouso de cada espécie ao longo do período monitorado, sendo excluído o primeiro dia de registro, considerado como fase de adaptação dos mosquitos às condições experimentais.

Os dados obtidos com o monitoramento de atividade locomotora das espécies durante os quatro dias em regime de escuro constante possibilitaram também cálculo de autocorrelação (usando *lag* de 150) para determinação do período de atividade de cada espécie quando em livre curso. Também com auxílio do programa de computador Excel foram montados gráficos ilustrativos desses cálculos.

2.2 – Obtenção dos fragmentos dos genes de relógio usados na análise de expressão gênica

2.2.1 – *Aedes aegypti*

Para a realização de estudos de expressão gênica por técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real propostos no presente trabalho, foi necessária a obtenção para de um fragmento de ao menos cerca de 100 pares de base de seqüência codificante para cada gene a ser quantificado. Este fragmento precisaria conter uma região de junção de exons, por motivos a serem descritos no tópico 2.3.3.

Em *Ae. aegypti*, a seqüência codificante de *tim* foi obtida em sua totalidade, incluindo a descrição da posição e tamanho dos introns, através da clonagem e seqüenciamento de DNA genômico e complementar associada à análise de seqüências gênicas disponíveis no banco de dados do genoma da espécie (www.vectorbase.org). Todo esse processo encontra-se detalhadamente descrito no Anexo I. A quantificação da expressão de *tim* em fêmeas de *Ae. aegypti* foi feita com o uso de apenas um dos pares de oligonucleotídeos descritos no Anexo I e indicado na Tabela 2.1 e Figura 2.2, esta última ilustrando também a seqüência gênica amplificada por eles.

O fragmento do gene *cyc* de *Ae. aegypti* usado nas análises de expressão gênica foi também obtido por clonagem e seqüenciamento. A amplificação do fragmento de *cyc* foi

realizada por PCR a partir de DNA genômico e DNA complementar (cDNA), obtidos segundo metodologia descrita no Anexo I. A PCR foi conduzida com enzima Tth DNA polimerase da Biotools de acordo com as especificações do fabricante, e os oligonucleotídeos degenerados 5CYCdeg1 e 3CYCdeg1 descritos na referência (Meireles-Filho et al. 2006a). As condições de ciclos de temperatura da PCR foram: 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. O produto gerado na reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2% impregnado com brometo de etídio, evidenciando um produto de tamanho esperado. O restante da reação foi purificado em colunas S-400 (Amersham Biosciences) e ligado a vetor *pGEM-T Easy* (Promega) de acordo com as especificações do fabricante. Uma alíquota de 2 µl foi usada para transformar células competentes *E. coli DH5-α*, que foram então plaqueadas em meio LB, agar, X-Gal e IPTG, e mantidas em estufa a 37°C por cerca de 20 horas. Dentre as colônias que cresceram na placa, foram selecionadas as de cor branca ou azul claro e 20 delas inoculadas independentemente em tubos Falcon de 15 ml contendo 3 ml de meio LB com ampicilina. Após cerca de 20 horas em agitador a 37°C foi realizada a mini-preparação dessas colônias para obtenção dos plasmídeos, que foram digeridos com enzima ECO-RI (Promega) de acordo com protocolo do fabricante. Dentre as amostras que evidenciaram insertos do tamanho esperado, algumas foram seqüenciadas em seqüenciador ABI 377 DNA usando o reagente *Big Dye* (Applied Biosystems). A seqüência obtida foi comparada com o banco de dados de *D. melanogaster* (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), confirmando a homologia com o gene *cyc*. Pela comparação das seqüências obtidas a partir de DNA genômico e complementar de *cyc* em *Ae. aegypti* foi possível identificar a posição e tamanho de um intron (Fig. 2.3).

O gene *Clk* de *Ae. aegypti* encontra-se disponível no banco de dados sobre o genoma da espécie (www.vectorbase.org), porém, uma anotação detalhada e criteriosa do gene foi elaborada por Gesto (Gesto 2006), a partir da qual foi escolhido o fragmento de *Clk* utilizado no presente estudo, que engloba a posição do último intron de *Clk* (mais à jusante) (Gesto 2006). (Fig. 2.4).

O fragmento de *per* de *Ae. aegypti* utilizado foi obtido por análise comparativa das seqüências de DNA genômico e complementar disponíveis no banco de dados do projeto genoma da espécie (www.vectorbase.org), e também compreende a região onde encontra-se o último intron desse gene em *Ae. aegypti* (Fig. 2.5).

2.2.2 – *Culex quinquefasciatus*

Os fragmentos das seqüências de *per*, *tim*, *cyc* e *Clk* de *Cx. quinquefasciatus* utilizados nos experimentos de quantificação de expressão foram todos obtidos através de procura com o programa *Basic Local Alignment Search Tool (Blast)* entre os fragmentos de cada um desses genes de *Ae. aegypti* contra os fragmentos de DNA genômico (*shotguns*) até agora disponibilizados no banco de dados do projeto de seqüenciamento do genoma de *Cx. quinquefasciatus* (www.vectorbase.org).

No caso de *tim* (Fig. 2.6) e *cyc* (Fig. 2.7), a análise de expressão gênica em *Cx. quinquefasciatus* foi realizada com fragmentos desses genes que ficam mais a jusante na seqüência do que os fragmentos utilizados para a quantificação em *Ae. aegypti*. O motivo da mudança reside no fato de ter sido possível para *Cx. quinquefasciatus* desenhar oligonucleotídeos de boa qualidade em regiões de introns mais próximos da extremidade 3' desses genes, o que é mais aconselhável no caso da metodologia adotada neste projeto para a técnica de PCR em tempo real (vide tópico 2.3). Já no caso dos genes *per* (Fig. 2.8) e *Clk* (Fig. 2.9) de *Cx. quinquefasciatus*, a região alvo é a mesma (homóloga) àquelas usadas nas análises de expressão desses genes em *Ae. aegypti*, e corresponde à posição do último intron desses genes.

Fragmento de *timeless* em *Aedes aegypti*

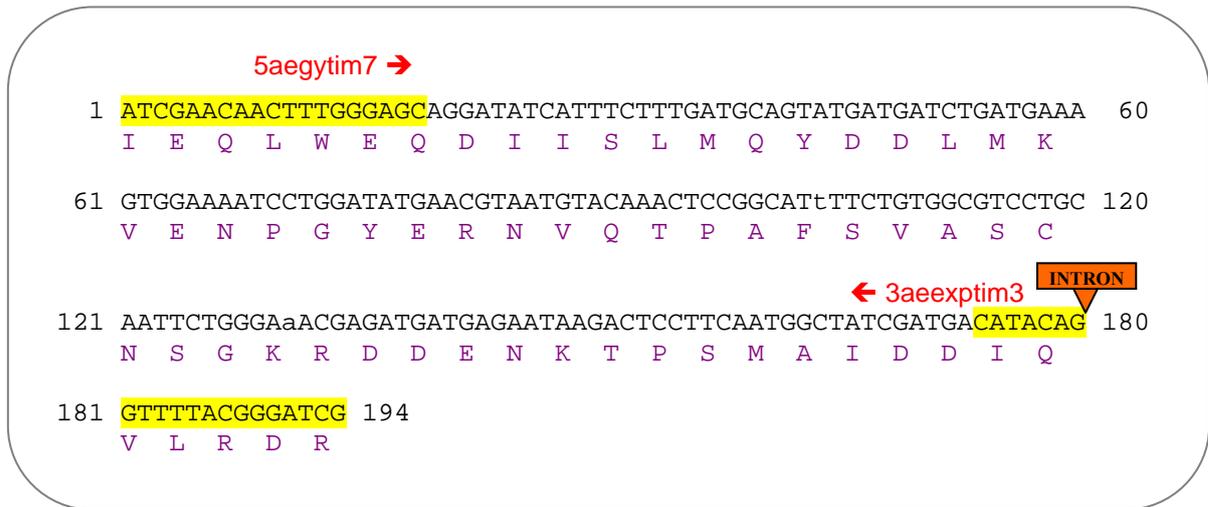


Figura 2.2: Seqüência de 194 pares de base e correspondentes aminoácidos (logo abaixo, em letras roxas) do fragmento do gene *timeless* (*tim*) de *Ae. aegypti* alvo das reações de PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão com uso dos oligonucleotídeos 5aegytim7 (5'-ATCGAACAACCTTTGGGAGC-3') e 3aeexptim3 (5'-CGATCCCGTAAAACCTGTATG-3'), cujas posições na seqüência estão marcadas em amarelo na figura. O intron indicado foi determinado de acordo com metodologia descrita no Anexo I. Notar que 3aeexptim3 está posicionado sobre a região de junção de exons que flanqueiam o intron indicado, com o objetivo de amplificar de forma específica apenas seqüências de cDNA. Ainda de acordo com o Anexo I, este fragmento encontra-se a 928 pares de base do códon de parada da seqüência codificante deste gene.

Fragmento de *cycle* em *Aedes aegypti*

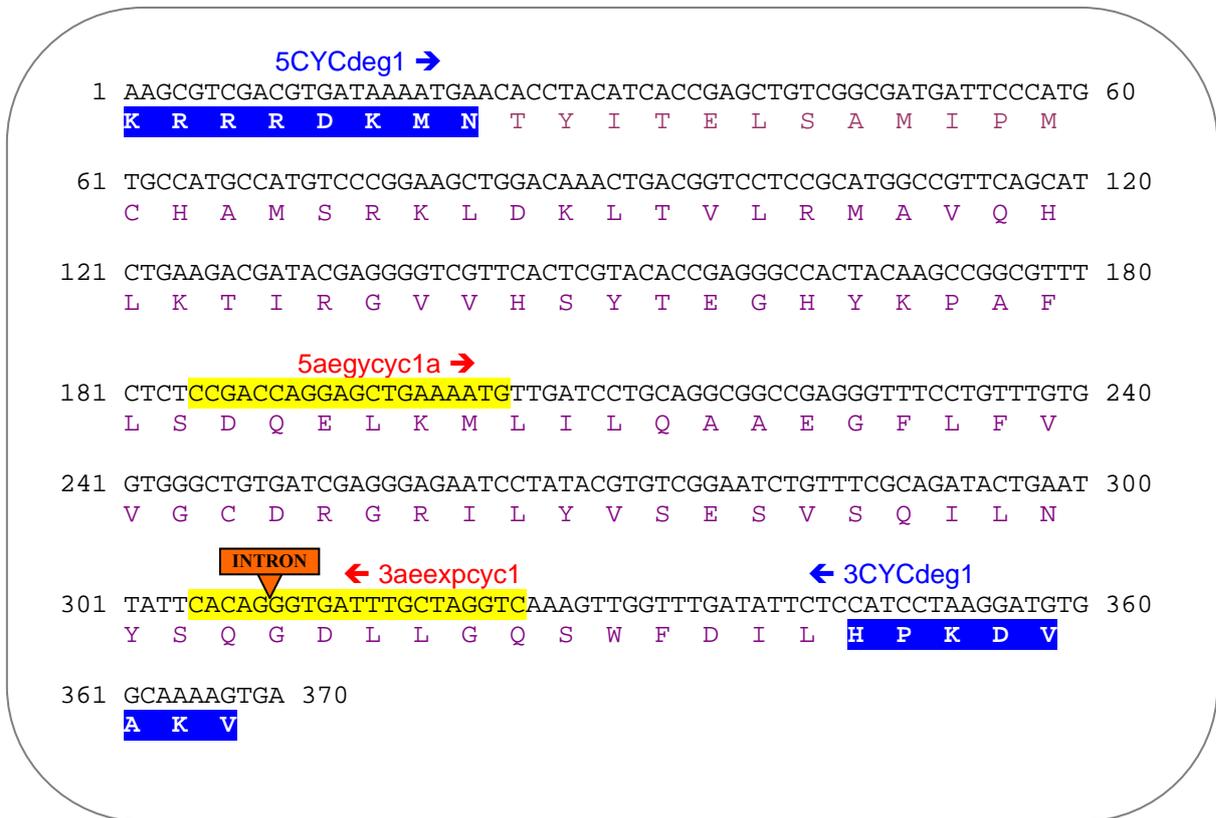


Figura 2.3: Fragmento de 370 pares de base do gene *cycle* (*cyc*) de *Ae. aegypti* e correspondente seqüência de aminoácidos (logo abaixo, em letras roxas) obtido pela amplificação por PCR usando os oligonucleotídeos degenerados 5CYCdeg1 e 3CYCdeg1, marcados em azul na figura. Pela comparação entre seqüências obtidas com DNA genômico e complementar foi identificado um intron de 57 pares de base cuja posição exata está indicada na figura. Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão deste gene foram 5aegycyc1a (5'-CCGACCAGGAGCTGAAAATG-3') e 3aeexpcyc1 (5'-GACCTAGCAAATCACCCCTGTG-3'), e amplificam um produto de 141 pares de base que se encontra a 1571 bases do códon final do gene. Suas respectivas posições na seqüência estão indicadas em amarelo. Notar que 3aeexpcyc1 está posicionado sobre uma região de junção de exons de maneira a proporcionar uma amplificação específica de seqüência de cDNA.

Fragmento de *Clock* em *Aedes aegypti*

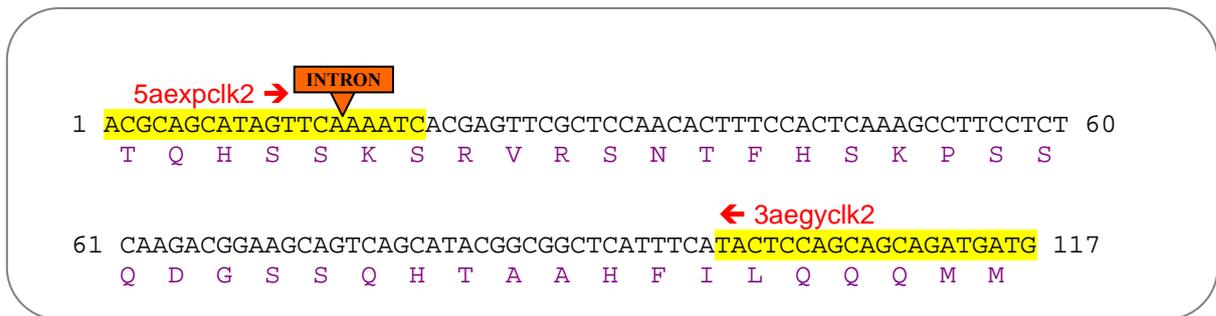


Figura 2.4: Seqüência de 117 pares de base e correspondentes aminoácidos (logo abaixo, em letras roxas) do fragmento do gene *Clock* (*Clk*) de *Ae. aegypti* alvo das reações de PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão com uso dos oligonucleotídeos 5aexpclk2 (5'-ACGCAGCATAGTTCAAATC-3') e 3aegyclk2 (5'-CATCATCTGCTGCTGGAGTA-3'), cujas posições na seqüência estão marcadas em amarelo na figura. O intron indicado foi determinado por Gesto (Gesto 2006) como o mais a jusante da seqüência deste gene. Notar que 5aexpclk2 está posicionado sobre a região de junção de exons que flanqueiam o intron indicado, com o objetivo de amplificar de forma específica apenas seqüências de cDNA. Ainda de acordo com Gesto (Gesto 2006), este fragmento encontra-se a 1191 pares de base do códon de parada da seqüência codificante deste gene.

Fragmento de *period* em *Aedes aegypti*

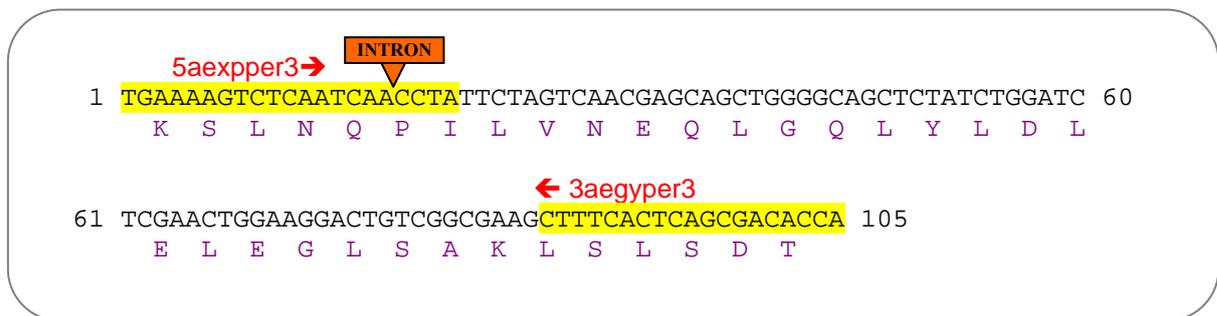


Figura 2.5: Seqüência de 105 pares de base e correspondentes aminoácidos (logo abaixo, em letras roxas) do fragmento do gene *period* (*per*) de *Ae. aegypti* alvo das reações de PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão com uso dos oligonucleotídeos 5aexpper3 (5'-TGAAAAAGTCTCAATCAACCTA-3') e 3aegyper3 (5'- TGGTGTCTGCTGAGTGAAAG-3'), cujas posições na seqüência estão marcadas em amarelo na figura. O intron indicado foi determinado pela comparação entre seqüências de DNA genômico e complementar disponíveis no banco de dados para essa espécie (www.vectorbase.org) e seu tamanho é de 59 pares de base. É o intron mais a jusante na seqüência deste gene e encontra-se provavelmente a 145 pares de base do códon terminal da seqüência codificante. Notar que o oligonucleotídeo 5aexpper3 está posicionado sobre a região de junção de exons que flanqueiam o intron indicado, com o objetivo de amplificar de forma específica apenas seqüências de cDNA.

Fragmento de *timeless* em *Culex quinquefasciatus*

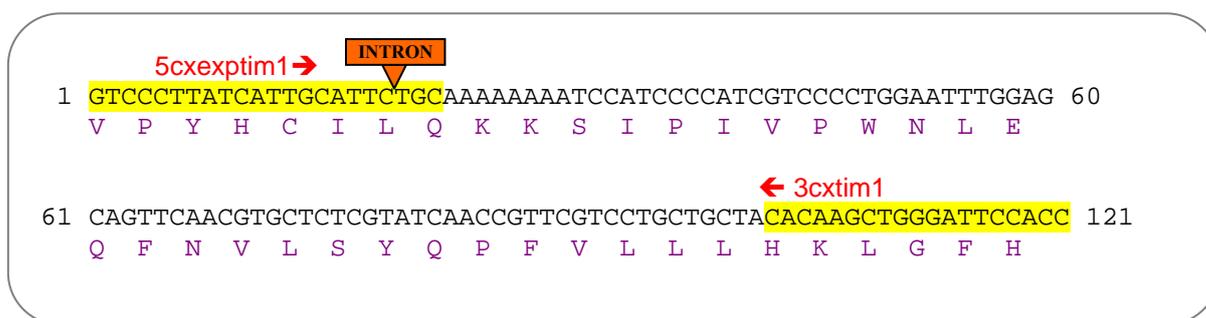


Figura 2.6: Seqüência de 121 pares de base e correspondentes aminoácidos (logo abaixo, em letras roxas) do fragmento do gene *timeless* (*tim*) de *Cx. quinquefasciatus* alvo das reações de PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão com uso dos oligonucleotídeos 5cxexptim1 (5'-GTCCCTTATCATTGCATTCTGC-3') e 3cxtim1 (5'-GGTGGGAATCCCAGCTTGTG-3'), cujas posições na seqüência estão marcadas em amarelo na figura. O intron indicado foi determinado pela comparação entre seqüências de DNA genômico *Cx. quinquefasciatus* disponíveis no banco de dados desta espécie (www.vectorbase.org) e a seqüência de cDNA deste gene em *Ae. aegypti* (Gentile et al. 2006), e seu tamanho é de 61 pares de base. Notar que o oligonucleotídeo 5cxexptim1 está posicionado sobre a região de junção de exons que flanqueiam o intron, com o objetivo de amplificar de forma específica apenas seqüências de cDNA. Este fragmento encontra-se provavelmente a cerca de 760 pares de base do códon terminal da seqüência de *tim*, usando como parâmetro o tamanho do gene em *Ae. aegypti*.

Fragmento de *cycle* em *Culex quinquefasciatus*



Figura 2.7: Seqüência de 129 pares de base e correspondentes aminoácidos (logo abaixo, em letras roxas) do fragmento do gene *cycle* (*cyc*) de *Cx. quinquefasciatus* alvo das reações de PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão com uso dos oligonucleotídeos 5xcyc1 (5'-ATGGCAGAGAAATACAACGAATG-3') e 3cxexpcyc1 (5'-GGTCCGGACTGCTCTCAGC-3'), cujas posições na seqüência estão marcadas em amarelo na figura. O intron indicado foi determinado pela comparação entre seqüências de DNA genômico de *Cx. quinquefasciatus* e de cDNA de *Ae. aegypti*, ambas disponíveis no banco de dados dos genomas das respectivas espécies (www.vectorbase.org), e seu tamanho é de 63 pares de base. Notar que o oligonucleotídeo 5cxexptim1 está posicionado sobre a região de junção de exons que flanqueiam o intron indicado, com o objetivo de amplificar de forma específica apenas seqüências de cDNA. Este fragmento encontra-se provavelmente a cerca de 430 pares de base do códon terminal da seqüência de *cycle*, usando como parâmetro o tamanho do gene em *Ae. aegypti*.

Fragmento de *period* em *Culex quinquefasciatus*

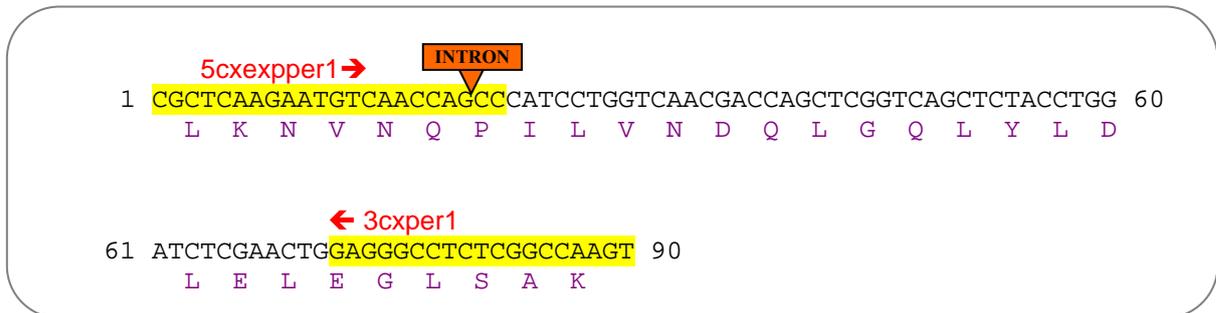


Figura 2.8: Seqüência de 90 pares de base e correspondentes aminoácidos (logo abaixo, em letras roxas) do fragmento do gene *period* (*per*) de *Cx. quinquefasciatus* alvo das reações de PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão com uso dos oligonucleotídeos 5cxexpper1 (5'-CGCTCAAGAATGTCAACCAGCC-3') e 3cxper1 (5'-ACTTGGCCGAGAGGCCCTC-3'), cujas posições na seqüência estão marcadas em amarelo na figura. O intron indicado é o mais a jusante na seqüência do gene e foi determinado pela comparação entre seqüências de DNA genômico *Cx. quinquefasciatus* e de cDNA de *Ae. aegypti* (Fig. 2.5), ambas disponíveis no banco de dados dos genomas das respectivas espécies (www.vectorbase.org). Porém, não foi possível determinar com precisão o tamanho deste intron devido ao estágio preliminar no qual se encontra o banco de dados. Notar que o oligonucleotídeo 5cxexpper1 está posicionado sobre a região de junção de exons que flanqueiam o intron indicado, com o objetivo de amplificar de forma específica apenas seqüências de cDNA. Este fragmento encontra-se provavelmente 176 pares de base do códon de terminação da seqüência de *per* em *Cx. quinquefasciatus*.

Fragmento de *Clock* em *Culex quinquefasciatus*



Figura 2.9: Sequência de 121 pares de base e correspondentes aminoácidos (logo abaixo, em letras roxas) do fragmento do gene *Clock* (*Clk*) de *Cx. quinquefasciatus* alvo das reações de PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão com uso dos oligonucleotídeos 5cxClk1 (5'-GGCACCGGTACAACACCTACCA-3') e 3cxexpClk1 (5'-AAGCGCATTTCGGGATTTCTGA-3'), cujas posições na sequência estão marcadas em amarelo na figura. O intron indicado é o mais a jusante na sequência do gene e foi determinado pela comparação entre sequências de DNA genômico *Cx. quinquefasciatus*, disponíveis no banco de dados do genoma dessa espécie (www.vectorbase.org), e de cDNA de *Ae. aegypti* (Fig. 2.4). Entretanto, não foi possível determinar com precisão o tamanho deste intron devido ao estágio preliminar no qual se encontra o banco de dados. Notar que o oligonucleotídeo 3cxexpClk1 está posicionado sobre a região de junção de exons que flanqueiam o intron indicado, com o objetivo de amplificar de forma específica apenas sequências de cDNA. Este fragmento encontra-se provavelmente a cerca de 1200 pares de base do códon terminal da sequência codificante de *Clk*, usando como parâmetro o tamanho do gene em *Ae. aegypti* (Gesto 2006).

2.3 – Quantificação relativa da expressão dos genes de relógio

A quantificação da expressão dos genes de relógio *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* foi realizada primeiramente em fêmeas de *Ae. aegypti* e posteriormente em *Cx. quinquefasciatus*. No entanto, a metodologia aplicada foi a mesma para ambas as espécies e encontra-se descrita a seguir.

2.3.1 – Coleta de pontos

O procedimento de coleta das amostras tem início pela coleta de cerca de 800 pupas oriundas das mesmas colônias que os indivíduos utilizados nos experimentos de ritmo de atividade (tópico 2.1), ou seja, das colônias do laboratório LAFICAVE. Em intervalos de tempo não superiores a 12 horas, os adultos eram separados de modo a garantir que as fêmeas então destinadas aos experimentos de quantificação de expressão gênica estivessem virgens. Essas fêmeas eram acondicionadas em grupos de 10 indivíduos em tubos Falcon de 50 ml contendo um papel no fundo para servir-lhes de superfície de pouso. O tubo era fechado colocando-se um pedaço de filó na sua abertura e em seguida a tampa que era cortada no centro, de modo que o tubo ficasse fechado, mas permitindo troca de ar. Sobre o filó era colocado um algodão embebido em solução de sacarose a 10% para alimentar os mosquitos.

Quando o número de fêmeas virgens nascidas num mesmo dia atingia entre 150 a 200 indivíduos, completava-se um grupo de mosquitos destinados ao processo de coleta de pontos. Esses mosquitos, separados em grupos de 10 indivíduos, eram acondicionados na incubadora *Precision Scientific Incubator Mod. 818* à temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e ciclo de fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. No dia seguinte àquele em que os mosquitos entravam na incubadora, iniciava-se um período de ao menos três dias, a partir do momento em que os adultos completavam dois dias de vida, visando a sincronização (arrastamento) do relógio interno dos mosquitos com as condições ambientais a que estavam sujeitos na incubadora.

Após este período de sincronização, as amostras eram coletadas a cada duas horas ao longo de 24 horas consecutivas, perfazendo um total de 12 pontos temporais por série de amostra. Neste trabalho, foram considerados dois tipos de experimento: aqueles coletados em regime de claro e escuro e os coletados em escuro constante. No primeiro caso, a primeira amostra da série de 12 pontos temporais era coletada uma hora após o acender das luzes, no

Zeitgeber Time 1 (ZT 1), a segunda amostra coletada duas horas depois (ZT 3) e assim por diante, terminando no ZT 23, que corresponde a uma hora antes do acender das luzes.

No caso dos experimentos coletados em escuro constante, após o período de treinamento em regime de claro/escuro descrito acima, os mosquitos entravam num período de 24 horas de escuro constante ao longo do qual as amostras eram coletadas. Desta forma, no momento que seria o ZT zero, onde as luzes “deveriam” acender caso mantidas as condições do dia anterior, a luz permanecia apagada. O relógio endógeno dos mosquitos passa, nessas condições, a funcionar independente da indicação ambiental de passagem de tempo, ou seja, ao invés de ser arrastado, passa a correr em livre-curso, e por isso muda-se a terminologia de *Zeitgeber Time* (ZT) para *Circadian Time* (CT). O primeiro ponto de coleta acontecia no CT 1, que corresponde à primeira hora do “dia subjetivo”⁴, onde as luzes “deveriam” estar acesas caso as condições do período de treinamento fossem mantidas.

A cada ponto de coleta, um tubo Falcon contendo 10 fêmeas era congelado instantaneamente em nitrogênio líquido e os mosquitos transferidos para tubos Eppendorf de 1,5 ml, que também eram mantidos em nitrogênio líquido e posteriormente a -80°C até a etapa de processamento das amostras.

Todo o procedimento foi repetido algumas vezes para proporcionar a coleta de réplicas das séries de 12 amostras. No caso de *Ae. aegypti*, o processo foi repetido independentemente por quatro vezes para experimentos em regime de claro/escuro, gerando quatro séries (réplicas) de 12 amostras cada. Os experimentos em escuro constante também foram em número de quatro séries (réplicas) de 12 amostras cada, mas o procedimento de coleta dos pontos foi realizado independentemente por duas vezes, coletando amostras aos pares (duas séries foram coletadas em paralelo a cada vez). Para *Cx. quinquefasciatus*, temos apenas duas séries de 12 amostras em regime de claro/escuro e outras duas em regime de escuro constante.

2.3.2 – Processamento das amostras

2.3.2.1 – Separação das cabeças e corpos

Cada um dos 10 mosquitos de cada uma das 12 amostras de cada uma das oito séries (quatro em regime de claro/escuro e quatro em escuro constante), tanto de *Ae. aegypti* como de *Cx. quinquefasciatus*, foram separados em cabeça e corpo. Desta forma, as 12 amostras de

⁴ O CT considerado neste caso é uma simplificação, uma vez que assume um relógio interno de exatamente 24 horas. A rigor, o CT deveria expressar o ciclo em livre curso da espécie em questão, e 1 hora circadiana, ou 1 CT, deveria ser igual ao período em livre curso dividido por 24. A simplificação aqui usada é igualmente adotada em outros trabalhos sobre estudos de expressão gênica.

cada série transformaram-se em 24, sendo 12 amostras das cabeças dos mosquitos coletados a cada duas horas e 12 amostras dos respectivos corpos. Durante o processo de separação das cabeças, os tubos contendo os mosquitos eram mantidos em gelo seco. Uma placa de metal era colocada sobre gelo seco para permitir que a separação das cabeças fosse efetuada em superfície que mantivesse temperatura adequada à preservação do material. As 10 cabeças e 10 corpos de cada amostra eram colocados em dois tubos Eppendorf de 1,5 ml distintos, sempre mantidos em gelo seco.

2.3.2.2 – Extração de RNA total

Após a separação entre corpos e cabeças, a etapa seguinte compreendeu a extração de RNA total de cada amostra. Foram realizadas as extrações das amostras de cabeça e corpo de *Ae. aegypti*, mas apenas de cabeça de *Cx. quinquefasciatus*.

Foi adotado método de extração de RNA total por *Trizol* nas amostras de mosquito deste trabalho⁵. O processo tinha início com a maceração manual do tecido de cada amostra (10 cabeças ou corpos) em 100 µl de *Trizol* (Invitrogen) com auxílio de pistilo de plástico previamente tratado com dietil-pirocarbonato (DEPC) a 0,1% para descontaminação contra RNAase. Em seguida, eram adicionados 900 µl de *Trizol* e a maceração era finalizada pela homogeneização da solução e destruição do restante do tecido ainda visivelmente íntegro com auxílio do pistilo. A solução era mantida à temperatura ambiente por 5 a 10 minutos antes da adição de 200 µl de Clorofórmio (Merck), e em seguida homogeneizada com auxílio de um agitador elétrico (“vortex”) e mantida à temperatura ambiente por mais 5 a 10 minutos. Seguia-se uma etapa de centrifugação à 4°C em centrífuga refrigerada Eppendorf por 15 minutos a 13.000 rpm, na qual a solução era separada em duas fases. A fase superior (aquosa) contendo o RNA era transferida para novos tubos, aos quais eram adicionados 500 µl de Isopropanol (Merck) e, então, homogeneizados por inversão e mantidos à temperatura ambiente por 10 minutos. O restante do material era descartado. Seguia-se nova centrifugação à 4°C em centrífuga refrigerada Eppendorf por 15 minutos a 13.000 rpm, ao final da qual tinha-se o RNA precipitado e o sobrenadante era descartado. O precipitado era lavado com a adição de 1 ml de Etanol 70% e auxílio de agitador elétrico. Os tubos eram centrifugados mais uma vez à 4°C em centrífuga refrigerada Eppendorf por 5 minutos a 13.000 rpm. Descartava-

⁵ À exceção de uma das quatro séries de 12 amostras de cabeça de fêmea de *Aedes aegypti*, para cuja extração de RNA total foi adotado o mesmo procedimento descrito no Anexo I para as extrações de RNA total dos machos.

se o sobrenadante e os tubos eram mantidos abertos para secagem completa por cerca de 10 minutos. Em seguida, os tubos eram preenchidos com 100 µl de água mili-Q, tampados e colocados no termobloco (Banho Seco) à 60°C por 10 minutos para eluição do RNA precipitado.

2.3.2.3 – Purificação por precipitação com Cloreto de Lítio

As amostras de RNA extraídas com *Trizol* precisavam passar por processo de purificação para retirada de restos de Fenol oriundos do *Trizol* e demais contaminantes provenientes inclusive das próprias amostras e capazes de provocar inibição na atividade das enzimas transcriptase reversa e DNA polimerase das etapas subseqüentes. O método de escolha para a purificação de solução aquosa de RNA foi precipitação por Cloreto de Lítio a 2,5 M, de acordo com o protocolo sugerido pela Ambion para este fim (http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_160.html).

As amostras de RNA ressuspensas em 100 µl de água mili-Q eram adicionados 50 µl de Cloreto de Lítio a 7,5 M, levando a solução a uma concentração final de Cloreto de Lítio de 2,5 M. As amostras eram então mantidas por 30 minutos à -20°C e em seguida centrifugadas à 4°C em centrífuga refrigerada Eppendorf por 15 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante era descartado e o RNA precipitado lavado com 500 µl de Etanol 70% com auxílio de agitador elétrico. Uma última centrifugação era realizada por 15 minutos a 13.000 rpm, mas em centrífuga sem refrigeração. Descartava-se o sobrenadante e os tubos eram mantidos abertos para completa secagem do RNA precipitado.

O RNA precipitado e seco era então ressuspensão em água mili-Q. Apesar do método aplicado para extração de RNA de corpos e cabeças de *Ae. aegypti* e cabeças de *Cx. quinquefasciatus* ter sido o mesmo, o volume de água mili-Q final adicionado para ressuspender o RNA extraído variava de acordo com a natureza da amostra. Dez cabeças de mosquito geram significativamente menos tecido para extração de RNA que os 10 respectivos corpos. Da mesma forma, 10 cabeças de *Ae. aegypti* geram menos tecido que 10 cabeças de *Cx. quinquefasciatus*, por ser este último visivelmente maior que o primeiro. Com o intuito de estabelecer qual o volume ideal para ressuspender o RNA de cada tipo de amostra de forma a permitir eficiência adequada e reprodutível dos processos subseqüentes, foi necessário para cada tipo de amostra a elaboração de uma curva padrão de cada par de oligonucleotídeos utilizado na quantificação da expressão gênica.

2.3.2.4 – Estabelecendo o volume de água a ressuspender o RNA precipitado através da Curva Padrão pelas diluições de RNA

A curva padrão foi elaborada a partir de diluições seqüenciais, em escala logarítmica, de uma mesma amostra de RNA, gerada pela mistura em partes iguais de amostras eqüidistantes de uma mesma série de 12 amostras, por exemplo, mistura em partes iguais de RNA dos ZTs 1 e 13 de uma dada série de amostras. Essa mistura de RNA era diluída para as concentrações finais de 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32 (esta última só em alguns casos).

Para cada diluição de RNA foi realizada a síntese e diluição de cDNA conforme descrito mais adiante no tópico 2.3.2.5 e esse cDNA diluído usado para a determinação da curva padrão de cada par de oligonucleotídeos aplicado na quantificação gênica, conforme descrito por manuais da Applied Biosystems para procedimentos de PCR em tempo real (Applied-Biosystems 1997, 2004) e disponíveis na internet (<http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/04303859.pdf> e <http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/04371095.pdf>).

Os manuais da Applied Biosystems sugerem fazer a curva padrão a partir de diluições de cDNA para determinação da eficiência dos oligonucleotídeos, mas ao elaborar a curva padrão a partir das diluições de RNA é possível também identificar a existência de inibição da síntese de cDNA a partir de amostras de RNA mais concentradas.

Esse procedimento foi repetido para cada tipo de amostra, ou seja, foi realizado independentemente para cabeça de *Ae. aegypti*, corpos de *Ae. aegypti* e cabeças de *Cx. quinquefasciatus*, e para cada uma delas foram testados todos os pares de oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho para aquela espécie.

Pela interpretação dos resultados das curvas padrão, foi estabelecido que os volumes ideais para ressuspender as amostras seriam: 150 µl no caso das 10 cabeças de *Ae. aegypti* e 500 µl tanto para 10 corpos de *Ae. aegypti* como para 10 cabeças de *Cx. quinquefasciatus*.

2.3.2.5 – Síntese e diluição de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com os reagentes *TaqMan Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems) e o uso de oligo-dT, nos seguintes volumes: 2 µl de *Buffer* (10x), 4,4 µl de MgCl₂ (25 mM), 4 µl de dNTP (2,5 mM cada nucleotídeo), 1 µl de oligo-dT

(50 µM), 0,4 µl de *RNAse inhibitor* (20 U/ µl), 0,5 µl de *Reverse Transcriptase* (50 U/ µl) e 7,7 µl de RNA da amostra, perfazendo um volume total de reação de 20 µl. A transcrição reversa de cada uma das 12 amostras de uma mesma série foi conduzida concomitantemente em termociclador nas seguintes condições: 25°C por 10 minutos, 48°C por 1 hora e 95°C por 5 minutos.

Aos 20 µl de cDNA sintetizados foram adicionados 180 µl de água mili-Q, resultando em 200 µl de cDNA 10 vezes diluído.

2.3.3 – PCR quantitativo em tempo real

A análise da expressão dos genes de relógio *per*, *tim*, *cyc* e *Clk* nas cabeças de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* e cabeça e corpo de *Ae. aegypti* foi realizada com técnica de PCR quantitativo em tempo real usando como normalizador interno para ambas as espécies de mosquito o gene homólogo ao *rp49* de *D. melanogaster*. Detalhes sobre a clonagem e caracterização do fragmento deste gene em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* encontram-se descritos no Anexo III.

As reações de PCR em tempo real foram conduzidas no equipamento *ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems* versão 1.1 (Applied Biosystems) para todas as séries de 12 amostras de cDNA geradas a partir das extrações de RNA. No caso das análises de expressão gênica nas cabeças de fêmeas de *Ae. aegypti*, foram analisadas para cada gene um total oito séries de 12 amostras, quatro em regime de claro/escuro e quatro em escuro constante. Dentre os quatro experimentos de 12 amostras temporais coletados para *Ae. aegypti* em regime de claro/escuro, três deles tiveram a expressão gênica analisada não apenas nas cabeças, mas também nos respectivos corpos das fêmeas decapitadas. No caso de *Cx. quinquefasciatus*, foi analisada a expressão dos genes de relógio em quatro séries de 12 amostras de cabeça de fêmeas desta espécie (duas em regime de claro/escuro e duas em escuro constante). Para todas essas séries de 12 amostras de ambas as espécies foram realizadas reações de quantificação por PCR em tempo real para os genes *rp49*, *per*, *tim*, *cyc* e *Clk*.

Nas PCRs em tempo real para cada gene de cada espécie foi utilizado um par de oligonucleotídeos específico. Entretanto, antes de executadas as reações, cada par de oligonucleotídeo passou por uma etapa preliminar de testes. A primeira propriedade importante a ser testada foi a capacidade de amplificar especificamente a partir de cDNA e não apresentar amplificação a partir de DNA genômico, para evitar que uma eventual

contaminação por DNA genômico nas amostras pudesse interferir no resultado da quantificação da expressão gênica. Para que isso fosse possível, um membro de cada par de oligonucleotídeos foi desenhado na junção de dois exons, ou seja, numa região onde na seqüência genômica existe um intron (ver figuras 2.2 a 2.9). Os testes envolveram PCRs em tempo real usando os mesmos volumes de reagentes descritos mais adiante para as análises das amostras e tendo como molde tanto cDNA quando DNA genômico. As condições de temperatura das reações teste foram: 95°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de duas temperaturas: 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os testes comprovaram que cada par de oligonucleotídeo seria capaz de formar produto específico a partir de cDNA e não formar produto a partir de DNA genômico.

Após as reações teste, os produtos das mesmas foram submetidos a curvas de dissociação, nas quais é possível identificar a temperatura de desnaturação (T_m) de cada produto formado na reação. Pela interpretação da curva de dissociação das reações nas quais o cDNA foi usado como molde, foi possível determinar para cada par de oligonucleotídeo a T_m do produto de interesse e a eventual formação de produto inespecífico. Por ser o *SYBR Green* um reagente que emite fluorescência ao se ligar inespecificamente a qualquer dupla-fita de DNA, qualquer produto nesta conformação, até mesmo dímero formado pelo anelamento de oligonucleotídeos, emite fluorescência e interfere na interpretação do sinal.

As curvas de dissociação revelaram que os oligonucleotídeos adotados nas reações conduzidas neste trabalho raramente formavam produtos inespecíficos e, quando presentes, eram de T_m bem inferior àquela do produto de interesse. Isso permitiu o estabelecimento de uma temperatura de leitura específica para cada par de oligonucleotídeo cerca de 2 a 3°C abaixo da temperatura de desnaturação do produto de interesse, proporcionando registro específico da fluorescência do mesmo. Produtos inespecíficos, com T_m s abaixo da temperatura de leitura estabelecida, não estariam emitindo fluorescência no momento do registro de sinal por estarem desnaturados àquela temperatura (Giulietti et al. 2001).

A Tabela 2.1 apresenta a listagem dos oligonucleotídeos aprovados nos testes preliminares e usados para cada gene analisado em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, incluindo a respectiva seqüência de nucleotídeos e temperatura de leitura adotada para cada par. A posição dos mesmos em relação à seqüência do fragmento que amplificam está indicada nas figuras 2.2 à 2.9.

Nas PCRs quantitativas com amostras de *Ae. aegypti*, foram colocados em cada poço os volumes de 10 µl de *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 3 µl de água mili-Q, 5 µl do cDNA (previamente diluído 10x em água mili-Q, conforme descrito no item

2.3.2.5), e 2 µl do par de oligonucleotídeos para o gene a ser analisado a 10 µM, perfazendo um volume final de 20 µl de reação.

Nas PCRs quantitativas com amostras de *Cx. quinquefasciatus*, foram colocados em cada poço os volumes de 7,5 µl de *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 2 µl de água mili-Q, 4 µl do cDNA (previamente diluído 10 em água mili-Q, conforme descrito no item 2.3.2.5), e 1,5 µl do par de oligonucleotídeos para o gene a ser analisado a 10 µM, perfazendo um volume final de 15 µl de reação.

Os reagentes *SYBR® Green PCR Master Mix* e *Power SYBR® Green PCR Master Mix* são equivalentes, sendo a diferença entre eles uma maior sensibilidade do segundo, de uma geração mais nova, em relação ao primeiro. Como já mencionado anteriormente, as análises de *Cx. quinquefasciatus* só começaram depois de terminadas as de *Ae. aegypti* e, quando isso aconteceu, já estava disponível no mercado o reagente *Power SYBR® Green PCR Master Mix*. Pela maior eficiência deste reagente em relação à sua versão anterior, foi possível realizar a quantificação das amostras de *Cx. quinquefasciatus* em um volume final de reação menor do que o utilizado para as quantificações em *Ae. aegypti* com *SYBR® Green PCR Master Mix*. Na análise de quantificação gênica, as 12 amostras de uma mesma série foram sempre analisadas para um mesmo gene concomitantemente numa única placa de reação de 96 poços, com três réplicas para cada amostra, perfazendo 36 poços. Somam-se a esses dois poços de controle negativo da reação, onde ao invés de cDNA era colocada água, totalizando 38 poços na análise de cada gene. Desta forma, até duas séries de amostras podiam ser analisadas numa mesma placa de 96 poços.

A condição de temperatura das reações foi: 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 3 temperaturas: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, e 30 segundos a uma temperatura de leitura que é própria de cada par de oligonucleotídeos (Tabela 2.1). A única exceção foi a análise do gene *Clk* de *Ae. aegypti*. Por propriedades inerentes à seqüência do gene na posição onde foi preciso desenhar os oligonucleotídeos para este gene, a temperatura necessária para o anelamento dos oligonucleotídeos era consideravelmente inferior à 60°C. Sendo assim, para tornar a reação eficiente, foi necessário incluir mais uma etapa na ciclagem de temperaturas, ficando da seguinte maneira: 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de quatro temperaturas: 95°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, e 30 segundos na temperatura de leitura (Tabela 2.1).

Tabela 2.1: Relação dos pares de oligonucleotídeos utilizados nas reações de quantificação de expressão gênica por PCR em tempo real dos genes *rp49*, *period (per)*, *timeless (tim)*, *cycle (cyc)* e *Clock (Clk)* nos mosquitos *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. É listado o par de oligonucleotídeos utilizado para cada gene e em cada espécie, indicando o sentido de cada um em relação à seqüência do gene, o nome adotado, a seqüência de bases correspondente e a temperatura de leitura estabelecida para cada par de oligonucleotídeos, a ser adotada na reação de PCR em tempo real.

	Sentido	Nome	Seqüência (5'----3')	Temperatura de Leitura		
<i>Aedes aegypti</i>	<i>rp49</i>	senso	5aexpRP	GCTATGACAAGCTTGCCCCCA	81°C	
		anti-senso	3aeaquaRP1b	TCATCAGCACCTCCAGCTC		
	<i>period</i>	senso	5aexpper3	CGTTGAAAAGTCTCAATCAACCT	78°C	
		anti-senso	3aegyper3	GCTGAGTGAAAGCTTCGCCG		
	<i>timeless</i>	senso	5aegytim7	ATCGAACAACTTTGGGAGC	75,5°C	
		anti-senso	3aexptim3	CGATCCCGTAAAACCTGTATG		
	<i>cycle</i>	senso	5aegycyc1a	CCGACCAGGAGCTGAAAATG	78°C	
		anti-senso	3aexpcyc1	GACCTAGCAAATCACCCTGTG		
	<i>Clock</i>	senso	5aexpclk2	ACGCAGCATAGTTCAAAATC	78°C	
		anti-senso	3aegyck2	CATCATCTGCTGCTGGAGTA		
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	<i>rp49</i>	senso	5cxexprp1	CGATATGACAAACTTGCACCAA	82°C
			anti-senso	3cxrp1	TTGAAGCCGTTCGGGAGCAT	
<i>period</i>		senso	5cxexpper1	CGCTCAAGAAATGTCAACCAGCC	79°C	
		anti-senso	3cxper1	ACTTGCCGAGAGGCCCTC		
<i>timeless</i>		senso	5cxexptim1	GTCCCTTATCATTGCATTCTGC	78°C	
		anti-senso	3cxtim1	GGTGAATCCCAGCTTGTG		
<i>cycle</i>		senso	5cxcyc1	ATGGCAGAGAAATACAACGAATG	79°C	
		anti-senso	3cxexpcyc1	GGTCCGACTGCTCTCAGC		
<i>Clock</i>		senso	5cxClk1	GGCACCGGTACAACACCTACCA	81°C	
		anti-senso	3cxexpClk1	AAGCGCATTCGGGATTTCA		

2.3.4 – Cálculo da quantificação relativa

Os dados gerados nas reações de PCR em tempo real foram importados para programa Excel, onde foram conduzidos os cálculos de quantificação da expressão dos genes de relógio *per*, *tim*, *cyc* e *Clk* relativa à expressão do gene *rp49*.

Terminada a reação, o programa *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* versão 1.1, que gerencia a reação de PCR em tempo real, gera um gráfico com o registro da fluorescência de cada poço, a cada ciclo. Uma linha de corte é estabelecida automaticamente no valor de leitura de fluorescência onde todas as reações encontrem-se em sua fase exponencial. Esta linha pode ser ajustada manualmente, caso necessário. O ciclo da PCR no qual a curva de amplificação cruza a linha de corte é chamado C_T (Ciclo de acordo com o *threshold*). Para efeito da quantificação da expressão gênica, primeiramente, foram calculadas as média dos C_T dentre as réplicas de cada amostra, excluídos, quando presentes, os *outliers* de acordo com os valores críticos de Grubbs (Sokal e Rohlf 1995). Em seguida, desse C_T médio de cada amostra era subtraído o C_T mínimo dentre as 12 amostras da série, ou seja, cada grupo de 12 amostras era normalizado pelo C_T mínimo do grupo.

Estando a leitura (C_T) de todos os genes em cada grupo de 12 amostras normalizado pelo C_T mínimo do grupo, prosseguiu-se o cálculo de quantificação relativa, realizado pelo *Comparative C_T Method*, também conhecido como Método do $\Delta\Delta C_T$, ou Método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak e Schmittgen 2001; Pfaffl 2001) tendo como normalizador endógeno o gene *rp49*. As etapas do procedimento de cálculo encontram-se detalhadamente explicadas em manuais da Applied Biosystems (Applied-Biosystems 1997, 2004) disponíveis na internet (<http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/04371095.pdf> e <http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/04303859.pdf>).

A curva final de expressão circadiana de cada gene em cada espécie foi estabelecida pela média entre as curvas normalizadas das diferentes séries de 12 amostras.

A validação da aplicação do Método do $\Delta\Delta C_T$ foi efetuada conforme indicado nos manuais da Applied Biosystems (Applied-Biosystems 1997, 2004) pela comparação entre as curvas padrão de cada par de oligonucleotídeo para genes de relógio com a curva padrão do par de oligonucleotídeo para o gene *rp49* usado como normalizador interno.

2.4 – Efeito da inseminação e hematofagia na expressão dos genes de relógio em fêmeas de *Aedes aegypti*

Foi avaliado o efeito da inseminação e hematofagia na expressão dos genes de relógio *per*, *tim*, *cyc* e *Clk* em fêmeas de *Ae. aegypti*.

A partir de um grupo de cerca de 1000 pupas, fêmeas nascidas num mesmo dia foram separadas em dois grupos de 80 fêmeas virgens e um grupo de 200 fêmeas mantidas com machos nascidos um dia antes, numa proporção de cerca de dois machos para cada fêmea, para garantir a inseminação. As três gaiolas foram providas de solução de sacarose a 10% para a alimentação dos mosquitos e colocadas na incubadora (*Precision Scientific Incubator Mod. 818*) à temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e regime de luz de 12 de claro e 12 horas de escuro.

Após dois dias, foram separados dois grupos de 80 fêmeas dentre aquelas mantidas com os machos para inseminação. Entre os ZTs 5 e 6 deste mesmo dia, um grupo de 80 fêmeas virgens e um grupo de 80 fêmeas inseminadas foram alimentados com sangue em cobaio. Desta maneira, tinha-se quatro grupos de fêmeas: virgens (alimentadas apenas com água açucarada), inseminadas (alimentadas apenas com água açucarada), virgens alimentadas com sangue e inseminadas alimentadas com sangue.

No ZT 11 do dia seguinte à alimentação sangüínea, ou seja, cerca de 30 horas após o repasto sangüíneo, os quatro grupos foram congelados em nitrogênio líquido e separados em cinco amostras de 10 indivíduos. No caso dos dois grupos alimentados com sangue, foram consideradas apenas as fêmeas cujo aspecto do abdômen (cor e volume) tornasse evidente que haviam se alimentado de sangue no dia anterior.

As cinco amostras de cada grupo foram separadas em cabeça e corpo e processadas conforme descrito no item 2.3.2, resultando num total de 10 amostras para cada grupo de fêmea (5 de cabeças e 5 de corpos). Proseguiu-se a quantificação relativa da expressão dos genes de relógio *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* por técnica de PCR em tempo real em placa de 96 poços, tanto para as cinco amostras de cabeças de cada um dos quatro grupos de fêmeas como para as cinco amostras dos respectivos corpos. As cinco amostras dos quatro grupos (virgem, inseminada, virgem alimentada e inseminada alimentada) foram analisadas numa mesma placa para cada gene, com quatro réplicas por amostra. Foi usado *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) em 20 μl de volume final. Os demais detalhes da

metodologia estão de acordo com a descrição no item 2.3.3, e o cálculo para quantificação relativa de acordo com descrição no item 2.3.4.

2.5 – RNA de interferência: tentativa de silenciamento de *timeless* em *Ae. aegypti*

Foi escolhida a técnica de genética reversa com o uso da ferramenta de RNA de interferência (RNAi) (Meister e Tuschl 2004; Novina e Sharp 2004; Sontheimer 2005) para tentar promover o silenciamento da expressão de *tim* em *Aedes aegypti* e avaliar o efeito deste no comportamento da espécie. O aprendizado e aplicação da técnica de RNA de interferência em mosquitos aconteceu junto aos grupos dos Prof. Andréa Crisanti e Prof. Fotis Kafatos, ambos do Imperial College, Londres, que possuem larga experiência na utilização desta técnica (Blandin et al. 2002; Blandin et al. 2004; Brown et al. 2003a; Brown et al. 2003b; Levashina et al. 2001). A metodologia compreendeu síntese *in vitro* de RNA dupla-fita para gene *tim* e injeção do mesmo em fêmeas de *Ae. aegypti* recém emergidas, de forma similar à descrita em Blandin et al. (2002), com o intuito de causar um silenciamento na expressão deste gene e verificar o efeito do mesmo no comportamento circadiano dos mosquitos.

A síntese *in vitro* de RNA dupla-fita tem início com a amplificação por PCR de um fragmento do gene que se deseja silenciar. Este fragmento deverá conter a região escolhida como alvo da ação das endonucleases do sistema de RNAi e, de acordo com a experiência do grupo do Prof. Fotis Kafatos, é adequado que seu tamanho seja entre 600 a 800 pares de bases. É interessante que se escolha como alvo de ação do RNAi uma região inicial do RNA mensageiro. Do contrário, há a possibilidade do mesmo não ser completamente degradado pelo sistema a partir do ponto de clivagem antes de começar sua tradução em proteína. Neste caso, seriam gerados peptídeos que poderiam exercer algum efeito na célula relacionado à função da proteína, interferindo no fenótipo. É importante ainda evitar que a região escolhida como alvo sejam domínios conservados entre diferentes genes, ou, do contrário, pode ser desencadeado o silenciamento de outros genes com seqüência nucleotídica muito semelhante.

Na tentativa de silenciamento por RNA de interferência de um gene de relógio em mosquitos, foi adotado o gene *tim* em *Ae. aegypti*, uma vez que era o único dos genes de relógio cuja seqüência já havia sido obtida quando o estudo de RNA de interferência foi

iniciado. Naquele momento, também não estavam disponíveis no banco de seqüências gênicas os dados do genoma de *Ae. aegypti*.

O grupo controle dos experimentos de injeção de RNA dupla-fita de *tim* em *Ae. aegypti* consistiu de mosquitos injetados com RNA dupla-fita para o gene *LacZ* de *Escherichia coli*.

2.5.1 – Clonagem do fragmento de *tim* de *Ae. aegypti* alvo para o RNA de interferência

O gene *tim* de *Ae. aegypti* compreende uma seqüência longa de 3903 pares de base de região codificante (Anexo I). Para assegurar a eficiência de uma amplificação por PCR da porção inicial do gene, foi sintetizado cDNA de *Ae. aegypti* com *TaqMan Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems) e o uso de oligonucleotídeo anti-senso específico para a seqüência de *tim*, de acordo com o seguinte protocolo: 1 µl de *Buffer* (10x), 2,2 µl de $MgCl_2$ (25mM), 2 µl de dNTP (2,5 mM cada nucleotídeo), 0,5 µl de oligonucleotídeo 3aeexptim3 (5'-CGATCCCGTAAAACCTGTATG-3') a 10µM, 0,2 µl de *RNAse inhibitor* (20 U/µl), 0,25 µl de *Reverse Transcriptase* (50 U/µl) e 3,85 µl de RNA de *Ae. aegypti*, perfazendo um volume total de reação de 10 µl. O RNA foi extraído e purificado de acordo com protocolos descritos nos itens 2.3.2.2 e 2.3.2.3, respectivamente. As condições de temperatura da reação de síntese de cDNA foram as mesmas descritas no item 2.3.2.5.

A partir do cDNA específico para a porção inicial de *tim* de *Ae. aegypti*, foi realizada PCR para amplificação do fragmento desejado com o uso de enzima Tth DNA polimerase (Biotools) de acordo com as especificações do fabricante, e os oligonucleotídeos 5aetim1a (5'-AACGAAATAAGCGGAGAAGG-3') e 3aetim1a (5'- TCCGATAATGTTGATTTCGAACC-3') a um volume final da reação de 40 µl . As condições de ciclos de temperatura da PCR foram: 94°C por 5 minutos; 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 48°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Dez µl do volume da reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2% impregnado com brometo de etídio a 0,5 µg/ml , evidenciando um produto de tamanho esperado, de cerca de 800 pares de base. O restante da reação foi purificada em colunas S-400 (Amersham Biosciences). Etapas subseqüentes de ligação à plasmídeo, clonagem e seqüenciamento seguiram a metodologia descrita no item 2.2.1.

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

Para a síntese de RNA dupla-fita de *tim*, foi realizada primeiramente uma PCR a partir do clone contendo o inserto com a região alvo, obtido pela metodologia descrita no item 2.5.1. A reação foi efetuada com enzima Tth DNA polimerase (Biotools) e volume final de 40 µl, de acordo com as especificações do fabricante, e condições de temperatura de 95°C por 5 minutos; 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto.

Na reação foram usados os oligonucleotídeos 5aetim1bT7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGCGGAGAAGGATGGAATG-3') e 3aetim1bT7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGATGGAAGGAAGTGTATGATTGG-3') internos ao fragmento clonado e ambos contendo a seqüência do promotor T7 nas suas extremidades 5' (bases sublinhadas).

O produto gerado na reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2% impregnado com brometo de etídio 0,5 µg/ml, evidenciando produto de tamanho esperado de 590 pares de base. O restante da reação foi purificado em colunas S-400 (Amersham Biosciences).

A síntese de RNA dupla-fita foi conduzida a partir dos produtos de PCR purificados e uso do kit *MegaScript* (Ambion). Uma vez que o produto de PCR purificado continha a seqüência do promotor T7 em ambas as extremidades, a síntese de RNA foi realizada sobre as duas fitas de DNA, gerando um RNA dupla-fita correspondente a toda a extensão do fragmento.

O RNA sintetizado foi purificado em coluna com o kit *MegaCleaner* (Ambion), e quantificado em espectrofotômetro. A faixa de concentração de RNA dupla-fita aceita para prosseguir para a etapa de injeção nos mosquitos é de 2,5 a 3,5 µg/µl. Uma alíquota de 0,5 µl de cada RNA dupla-fita purificado foi também submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, impregnado com brometo de etídio 0,5 µg/ml, para verificação da integridade do material.

2.5.3 – Grupo Controle

O grupo controle usado para comparação dos resultados de *Ae. aegypti* injetados com RNA dupla-fita para o gene *tim* foi o de *Ae. aegypti* injetados com RNA dupla-fita para *LacZ*.

O processo de obtenção de RNA dupla-fita para *LacZ* teve início com a gentil doação por parte do grupo do Prof. Fotis Kafatos de clone contendo inserto de cerca de 600 pares de base do gene *LacZ* e par de oligonucleotídeos internos à seqüência clonada contendo a seqüência do promotor T7 nas suas extremidades 5'. Os oligonucleotídeos são: LacZ-T7-Forward (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAATCCGACGGGTTGTTACT-3') e LacZ-T7-Reverse (5'-TAATACGACTCACTATAGGGCACCACGCTCATCGATAATTT-3'), sendo os nucleotídeos sublinhados correspondentes à seqüência promotora de T7. Esses oligonucleotídeos e clone com inserto de fragmento de *LacZ* são os mesmos que o grupo do Prof. Fotis Kafatos utiliza para síntese de RNA dupla-fita a ser injetado em grupos controle utilizados em seus estudos.

A partir do clone e par de oligonucleotídeos, todas as etapas seguintes para síntese de RNA dupla-fita para *LacZ* seguiram a mesma metodologia utilizada para a síntese de RNA dupla-fita de *tim*, descrita no item 2.4.2.

2.5.4 – Injeção de RNA dupla-fita em mosquitos adultos e coleta das amostras

As injeções de RNA dupla-fita foram realizadas em fêmeas adultas de *Ae. aegypti* com 2 a 3 dias de idade. Os experimentos iniciais de injeção conduzidos na Inglaterra foram realizados com o uso do micro-injetor manual Nanoject II, da Drummond Scientific. Num segundo momento, de volta ao Brasil, o micro-injetor usado foi FemtoJet da Eppendorf. Em ambos os casos foram usadas as mesmas agulhas feitas a partir de capilares de vidro e fornecidas pelo grupo do Prof. Fotis Kafatos.

Os mosquitos a serem injetados eram adormecidos por resfriamento e colocados sobre uma placa de metal resfriada sobre gelo. Com o auxílio de Estereoscópio Binocular, os mosquitos eram perfurados com a agulha na altura do espiráculo mesotorácico ou na área pós-espiracular (Consoli e Lourenço-de-Oliveria 1994) e então injetado o RNA dupla-fita. O injetor utilizado na Inglaterra permitia a injeção de 69 nanolitros por injeção, e geralmente era efetuada uma injeção por mosquito, mas podendo chegar a um máximo de três caso houvesse refluxo do volume. O injetor usado no Brasil foi ajustado para uma pressão de 200 hectoPascal (hPa) e tempo de injeção de 0,5 segundo.

Nos experimentos conduzidos no laboratório do Prof. Andrea Crisanti foram realizados no total cinco eventos independentes de injeção, onde um total entre 200 a 600 mosquitos eram injetados a cada vez, metade com RNA dupla-fita para *tim* e metade com RNA dupla-fita para *LacZ*. Após a injeção, os mosquitos eram transferidos para pequenas

gaiolas contendo algodão embebido em solução de sacarose a 10%, separados de acordo com o material injetado, e mantidos em insetário por não haver incubadora disponível. Três amostras de quatro indivíduos cada eram coletadas, de ambos os grupos, em diferentes intervalos de tempo após a injeção, de modo que as cinco injeções independentes proporcionassem no final amostras de mosquitos coletados desde 24 horas até sete dias após a injeção. Os resultados desses experimentos não constam nesta tese, mas foram utilizados como informação preliminar para direcionar os experimentos conduzidos posteriormente no Brasil.

Os experimentos de RNA de interferência conduzidos no laboratório do Dr. Alexandre Peixoto (Brasil) também compreendiam dois grupos de fêmeas de *Ae. aegypti*, um injetado com RNA dupla-fita de *timeless* e o grupo controle, injetado com RNA dupla-fita de *LacZ*, num total de 200 a 500 mosquitos injetados a cada experimento. Após as injeções, os mosquitos também eram transferidos para pequenas gaiolas contendo algodão embebido em solução de sacarose a 10%, separados de acordo com o material injetado, mas desta vez eram mantidos em incubadora (*Precision Scientific Incubator Mod. 818*) em regime de fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro e temperatura constante a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Esperava-se algumas horas após a injeção para identificar quais indivíduos haviam se recuperado do procedimento e, então, 32 fêmeas de cada grupo eram encaminhadas para monitoramento da atividade locomotora de acordo com a metodologia descrita no item 2.1. O restante das fêmeas de cada grupo era mantido em gaiolas dentro de uma outra incubadora, sob às mesmas condições daquela onde estava sendo realizado o monitoramento da atividade.

Foram realizados dois experimentos independentes de injeção de RNA dupla-fita no laboratório do Dr. Alexandre Peixoto (Brasil). No primeiro, as fêmeas injetadas foram mantidas em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro por sete dias consecutivos, a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. No segundo experimento, os insetos eram mantidos neste mesmo regime de claro/escuro por dois dias após a injeção e depois entravam em regime de escuro constante por cinco dias. Nos dois experimentos independentes, foram coletadas cinco amostras de quatro indivíduos no terceiro e quarto dia após a injeção, para verificação do efeito das injeções na expressão de *timeless*. As coletas foram realizadas no ZT 11, no caso do primeiro experimento, e CT 11 no caso do segundo.

2.5.5 – Processamento das amostras e análise do efeito do RNA de interferência na expressão gênica

Os mosquitos coletados no terceiro e quarto dia após a injeção de cada um dos dois experimentos independentes de RNAi eram separados em cabeça e corpo. A extração de RNA de cada amostra foi realizada de acordo com metodologia descrita no item 2.3.2.2, mas com metade do volume de cada reagente, uma vez que cada amostra continha apenas quatro cabeças ou corpos de mosquitos. A purificação do RNA extraído foi realizada de acordo com metodologia descrita no item 2.3.2.3 e o volume final de água no qual o RNA foi ressuspensão foi de 80 µl para quatro cabeças e 200 µl para quatro corpos. Esses volumes foram estabelecidos de acordo com metodologia descrita no item 2.3.2.4.

A síntese de cDNA das amostras de corpos e cabeças de *Ae. aegypti* injetados com RNA dupla-fita foi realizada de acordo com a descrição no item 2.3.2.5. Este cDNA foi usado em PCRs em tempo real para a quantificação da expressão do gene *tim*, com as mesmas condições e oligonucleotídeos descritos no item 2.3.3. Foi usado *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) em 20 µl de volume final. O gene *rp49* também foi adotado como normalizador interno e os cálculos para a quantificação relativa seguem a metodologia descrita no item 2.3.4.

O efeito da injeção de RNA dupla-fita de *tim* no silenciamento da expressão em *Ae. aegypti* foi avaliado pela análise comparativa entre a expressão de *tim* neste grupo e a expressão nas amostras de mosquitos injetados com RNA dupla-fita de *LacZ*.

2.6 – Análise estatística dos dados

A análise estatística dos resultados compreendeu análises de variância (ANOVA), o teste *Post-Hoc LSD (Least significant difference)*, o teste *t* de *Student* e a correlação de *Spearman* (Sokal e Rohlf 1995). Os testes *Kolmogorov-Smirnov* e *Levene* foram previamente aplicados para verificar, respectivamente, a normalidade das distribuições e a igualdade de variâncias quando apropriado. Nas análises de variância e correlação dos resultados de quantificação relativa dos genes de relógio, foram utilizados os valores de ΔC_T de cada série de amostras (valores em cada série de 12 amostras primeiramente normalizados pelo mínimo para o resultado de cada gene, e em seguida calculado o ΔC_T).

A determinação da periodicidade endógena do ciclo de atividade/repouso, ou seja, período em livre-curso (τ), foi determinada por análise de autocorrelação dos resultados dos experimentos de monitoramento da atividade/repouso em regime de escuro constante. Em linhas gerais, o número de eventos obtidos em dois pontos de leitura separados por um determinado *lag* temporal (um *lag* = 30 minutos, no caso do presente estudo) são correlacionados. Então, com um *lag* de um ponto de leitura, o ponto 1 é correlacionado com o ponto 2, o 2 com o 3 e assim por diante. No caso de um ciclo de 24 horas, o ponto 1 e o 49, 2 e 50, 3 e 51, etc., devem produzir os mais altos coeficientes de correlação, uma vez que o dado de cada ponto de leitura representa o total de atividade dos 30 minutos anteriores. Os coeficientes de correlação são, então, montados em gráficos contra os *lags* (1, 2, 3, etc.) num autocorrelograma que estende-se por 150 *lags*, no caso do presente estudo. O primeiro pico registrado no autocorrelograma aponta o *lag* da maior correlação. Ainda, linhas horizontais representam, no gráfico, o limite de confiança ($2/\sqrt{n}$, onde n = número de pontos).

3. Resultados

3.1 – Padrão de atividade/repouso de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

3.1.1 – Atividade locomotora em regime de claro/escuro

O padrão de atividade/repouso de fêmeas virgens de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em regime de claro/escuro foi estabelecido com base no monitoramento da atividade locomotora de 32 indivíduos de cada espécie, mantidos em ciclos de 12 horas de claro e 12 horas de escuro por quatro dias consecutivos. Ao final do experimento, apenas um indivíduo de *Ae. aegypti* havia morrido e qualquer registro de sua atividade foi excluído dos cálculos. Sendo assim, 31 indivíduos de *Ae. aegypti* e 32 de *Cx. quinquefasciatus* foram os considerados nas análises do padrão de atividade/repouso em regime de claro/escuro, ilustradas nas Figuras 3.1 a 3.5.

Na Figura 3.1, os resultados do monitoramento da atividade em regime de claro/escuro são apresentados com os valores das médias de Williams entre a atividade individual dos mosquitos de cada espécie. Nota-se uma atividade predominantemente diurna (fase clara) para *Ae. aegypti* (Figura 3.1A) e noturna (fase escura) para *Cx. quinquefasciatus* (Figura 3.1B), ainda que o que mais chame a atenção nesses gráficos seja o grande pico de atividade registrado para ambas as espécies na transição de claro para escuro em todos os dias, sendo a resposta de *Cx. quinquefasciatus* muito mais intensa do que a de *Ae. aegypti*. Na transição de escuro para claro, nota-se um pouco desse efeito em *Ae. aegypti*, mas *Cx. quinquefasciatus* parece não responder à transição de luz nesse sentido.

O pico de atividade registrado na transição de claro para escuro é tão expressivo que perde-se a resolução do gráfico na atividade em outros momentos. Com o intuito de melhor visualizar a diferença no padrão de atividade das duas espécies durante o experimento, os pontos de registro da atividade imediatamente seguintes às transições de luz, tanto de claro para escuro como de escuro para claro, foram interpoladas e em seguida foram calculadas as médias móveis entre três pontos para todo o período analisado, evitando, porém, a mistura entre pontos de leitura de atividade na fase clara com aqueles em fase escura. Para isso, nos pontos adjacentes às transições de luz, a média móvel foi calculada com apenas dois pontos. Os valores então obtidos estão ilustrados nos gráficos da Figura 3.2, onde nota-se mais

claramente o padrão diurno de *Ae. aegypti* (Figura 3.2A) e noturno de *Cx. quinquefasciatus* (Figura 3.2B).

Percebe-se concentração da atividade de *Ae. aegypti* (Figura 3.2A) na segunda metade da fase clara, a partir do ZT 6, e um pico proeminente entre os ZTs 9 e 11, antecipando a transição para a fase escura em poucas horas, após a qual observa-se queda considerável na atividade da espécie, chegando aos valores mais baixos de atividade por volta do ZT 16. Ainda que o tratamento dos dados tenha resultado no desaparecimento do pico de atividade de *Ae. aegypti* registrado no início da fase clara, é ainda possível notar que a atividade dessa espécie aumenta após o acender das luzes. Vale notar que, tanto na Figura 3.1A quanto na Figura 3.2A, o pico principal de atividade de *Ae. aegypti* parece tender a uma bimodalidade em algumas situações.

Mesmo após o tratamento dos dados visando suavizar o efeito da transição de luz, *Cx. quinquefasciatus* ainda demonstra pico proeminente nas primeiras horas da fase escura (Figura 3.2B). A interpolação foi efetuada no registro de atividade 30 minutos após o apagar das luzes no ZT 12, e foi suficiente no caso de *Ae. aegypti* para não se perceber mais o pico exacerbado de atividade. Entretanto, para *Cx. quinquefasciatus* essa atividade intensa perdura além dessa primeira meia hora, e ainda encontra-se alta no ZT 13. No ZT 14 há queda expressiva em todos os dias monitorados, seguida de acréscimo na atividade, que permanece relativamente constante por toda a fase escura. A transição de escuro para claro não apenas não causa pico de atividade em *Cx. quinquefasciatus* como nitidamente exerce inibição da mesma nesta espécie, inibição essa que perdura por toda a fase clara.

Os mesmos dados de atividade foram ainda tratados de modo a evidenciar os resultados em termos de proporção de indivíduos ativos, e não mais de quantidade de atividade. O resultado desta análise encontra-se ilustrado nas Figuras 3.3 e 3.4 que, como no caso das duas anteriores, referem-se no primeiro caso à proporção de indivíduos ativos em cada registro de atividade sem qualquer outro tratamento e, no segundo caso (Figura 3.4), a esses mesmos dados sendo interpoladas as transições de luz e ainda feita a média móvel de três pontos (dois pontos apenas para os registros adjacentes à transição de luz de forma a não misturar atividade registrada em fase clara daquela registrada em fase escura). Nota-se que, sob a ótica da proporção de indivíduos ativos, o padrão da atividade é similar ao observado pela quantidade de atividade (Figuras 3.1 e 3.2), e tal correspondência fica mais evidente ao comparar os gráficos para cada uma dessas abordagens onde houve tratamento para a redução do ruído experimental (Figuras 3.2A e 3.4A). Na figura 3.3, assim como foi para a 3.1, percebe-se um forte efeito da transição de claro para escuro nas duas espécies, ainda que mais

intenso para *Cx. quinquefasciatus* (Figura 3.3B) que para *Ae. aegypti* (Figura 3.3A). A Figura 3.4 suaviza boa parte do ruído experimental contido na Figura 3.3, e pode-se notar mais facilmente detalhes como o vale no ZT 16 de *Ae. aegypti* (Figura 3.4A), onde não mais que 10% dos indivíduos estão ativos em qualquer um dos três dias, e o pico entre os ZTs 9 e 12, onde não menos que 50% dos indivíduos são detectados ativos.

Cx. quinquefasciatus (Figura 3.4B) apresenta proporção muito baixa de indivíduos ativos durante a fase clara, raramente ultrapassando mais que 10% de ativos. Durante a fase escura, é registrado um pico de quase 100% de ativos entre os ZTs 12 e 13 seguido de queda para valores entre 15 e 20% em torno do ZT 15 e ligeiro aumento que perdura flutuando na faixa de 30% de indivíduos ativos pelo resto da fase clara.

O padrão diurno de *Ae. aegypti* e noturno de *Cx. quinquefasciatus* ilustrado tanto na média da atividade (Figuras 3.1 e 3.2) quanto na proporção de indivíduos ativos (Figuras 3.3 e 3.4) é corroborado pelos dados da Figura 3.5. Nela, vê-se a comparação entre a proporção de horas totais de atividade durante o dia e a noite, de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* (proporções médias calculadas a partir das proporções de atividade diurna e noturna dos diferentes indivíduos de cada espécie). Durante a fase clara, concentram-se 70% das horas de atividade de *Ae. aegypti* e apenas 28% das horas de atividade de *Cx. quinquefasciatus*, sendo essa diferença altamente significativa ($t_{61} = 11,513$; $P < 0,001$).

Atividade locomotora de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro

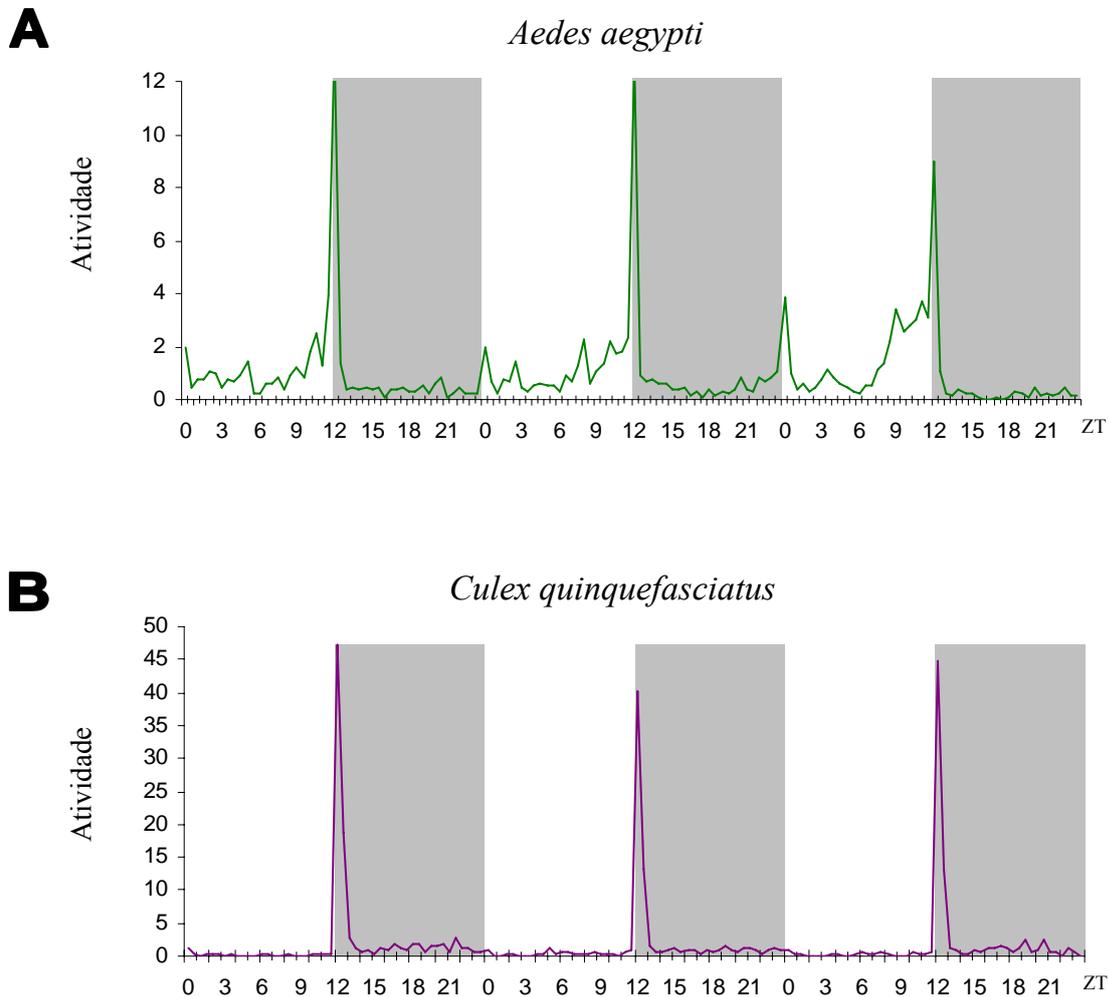


Figura 3.1: Atividade locomotora de (A) *Aedes aegypti* (n= 31) e (B) *Culex quinquefasciatus* (n= 32) monitorada ao longo de quatro dias consecutivos, em regime de 12 horas de claro (fundo branco) e 12 horas de escuro (fundo cinza). No gráfico, o primeiro dia de monitoramento foi suprimido. O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT). O ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, sendo a transição da luz abrupta. Os gráficos representam a média de atividade (média de Williams - eixo das ordenadas) entre os indivíduos de cada espécie, monitorados independentemente, tendo suas atividades registradas a cada 30 minutos.

Atividade locomotora de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro

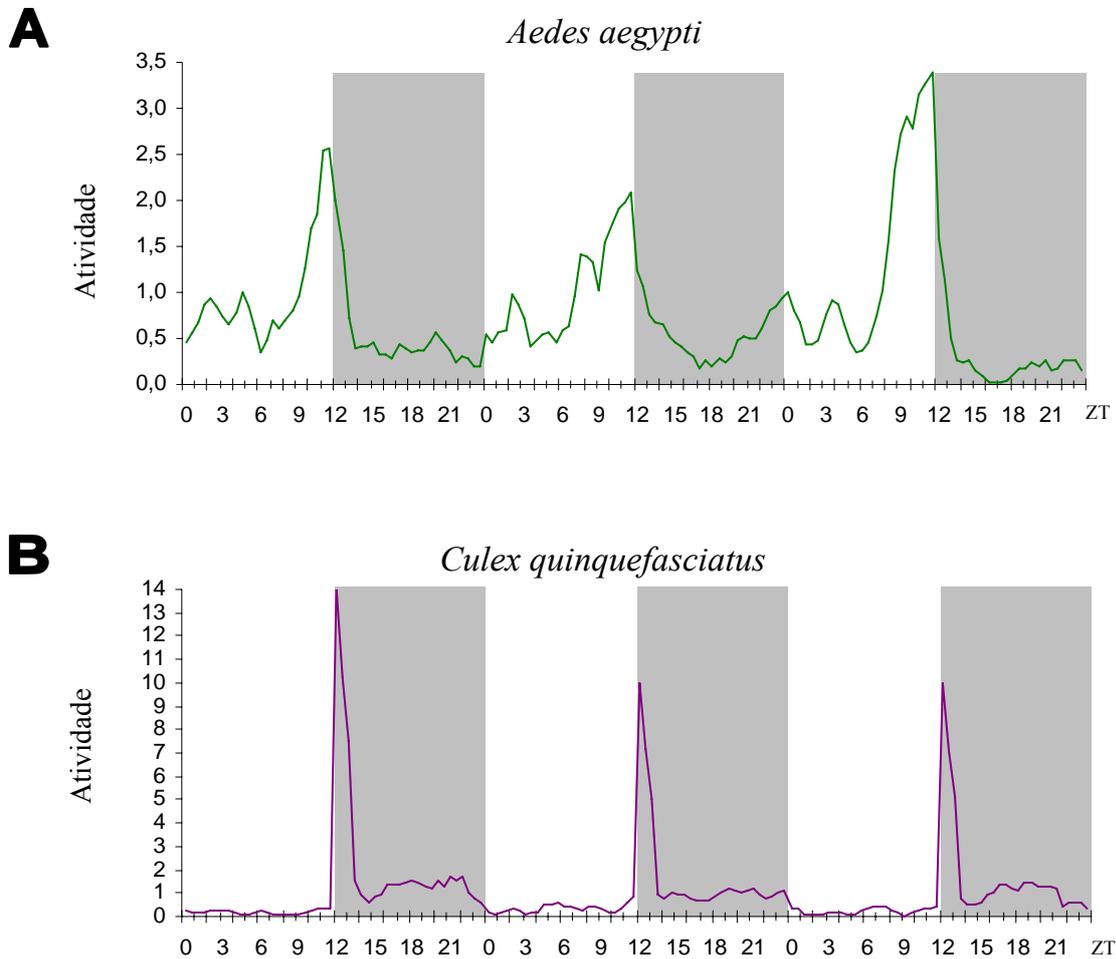


Figura 3.2: Atividade locomotora de (A) *Aedes aegypti* (n= 31) e (B) *Culex quinquefasciatus* (n= 32) monitorada ao longo de quatro dias consecutivos, em regime de 12 horas de claro (fundo branco) e 12 horas de escuro (fundo cinza). No gráfico, o primeiro dia de monitoramento foi suprimido. O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT). O ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, sendo a transição da luz abrupta. Os gráficos representam a média de atividade (média de Williams - eixo das ordenadas) entre os indivíduos de cada espécie, monitorados independentemente, tendo suas atividades registradas a cada 30 minutos. Os dados expressos nos gráficos sofreram dois tratamentos para diminuição de ruído: a) interpolação dos pontos de leitura de atividade logo após as transições de luz (acender ou apagar das luzes) e b) média móvel entre três pontos para cada valor de leitura de atividade, evitando, porém, a mistura entre um ponto de leitura em fase clara e um em fase escura (nesses casos, foi feita a média móvel para dois pontos apenas).

Proporção de indivíduos ativos
(*Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*)
em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro

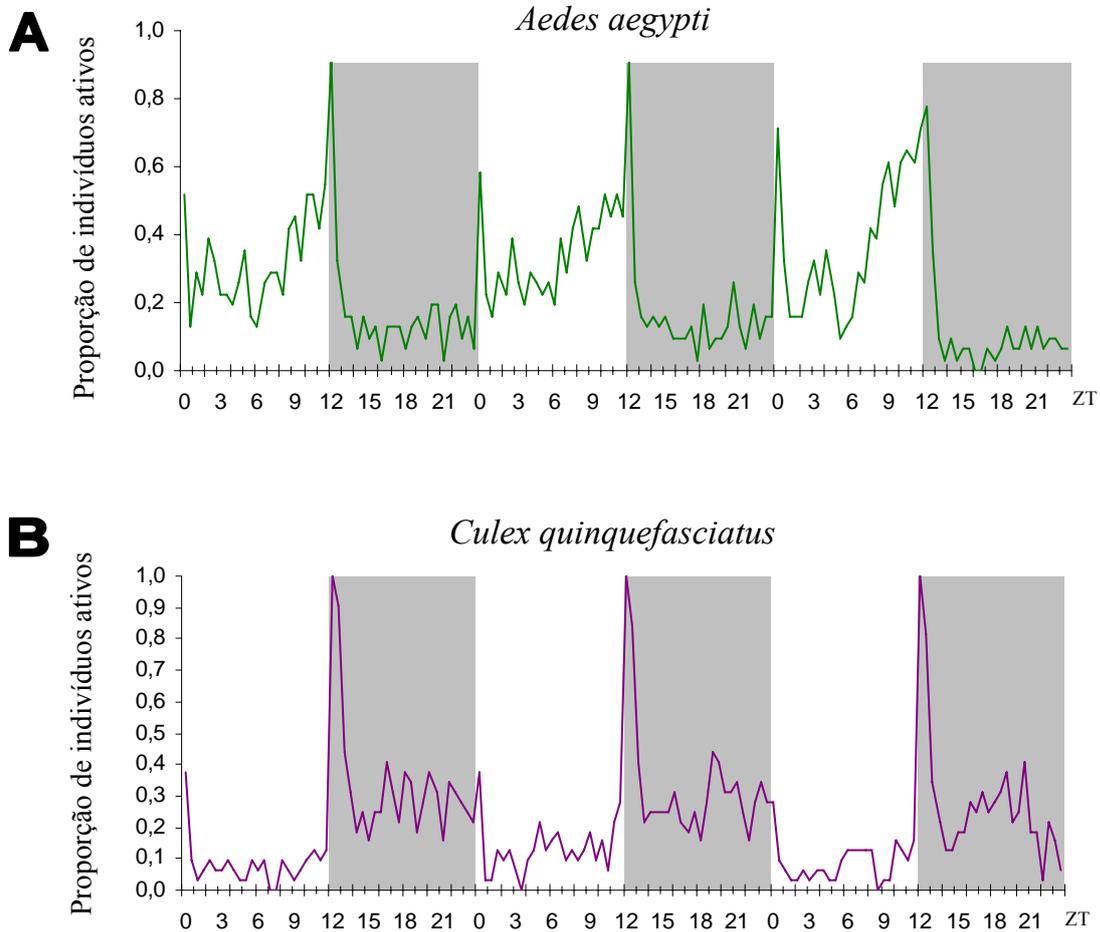


Figura 3.3: Proporção de indivíduos ativos para (A) *Aedes aegypti* (n= 31) e (B) *Culex quinquefasciatus* (n= 32) monitorados ao longo de quatro dias consecutivos, em regime de 12 horas de claro (fundo branco) e 12 horas de escuro (fundo cinza). No gráfico, o primeiro dia de monitoramento foi suprimido. O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT). O ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, sendo a transição da luz abrupta. Os gráficos representam a proporção de indivíduos ativos (eixo das ordenadas) de cada espécie, tendo suas atividades registradas a cada 30 minutos.

Proporção de indivíduos ativos
(*Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*)
em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro

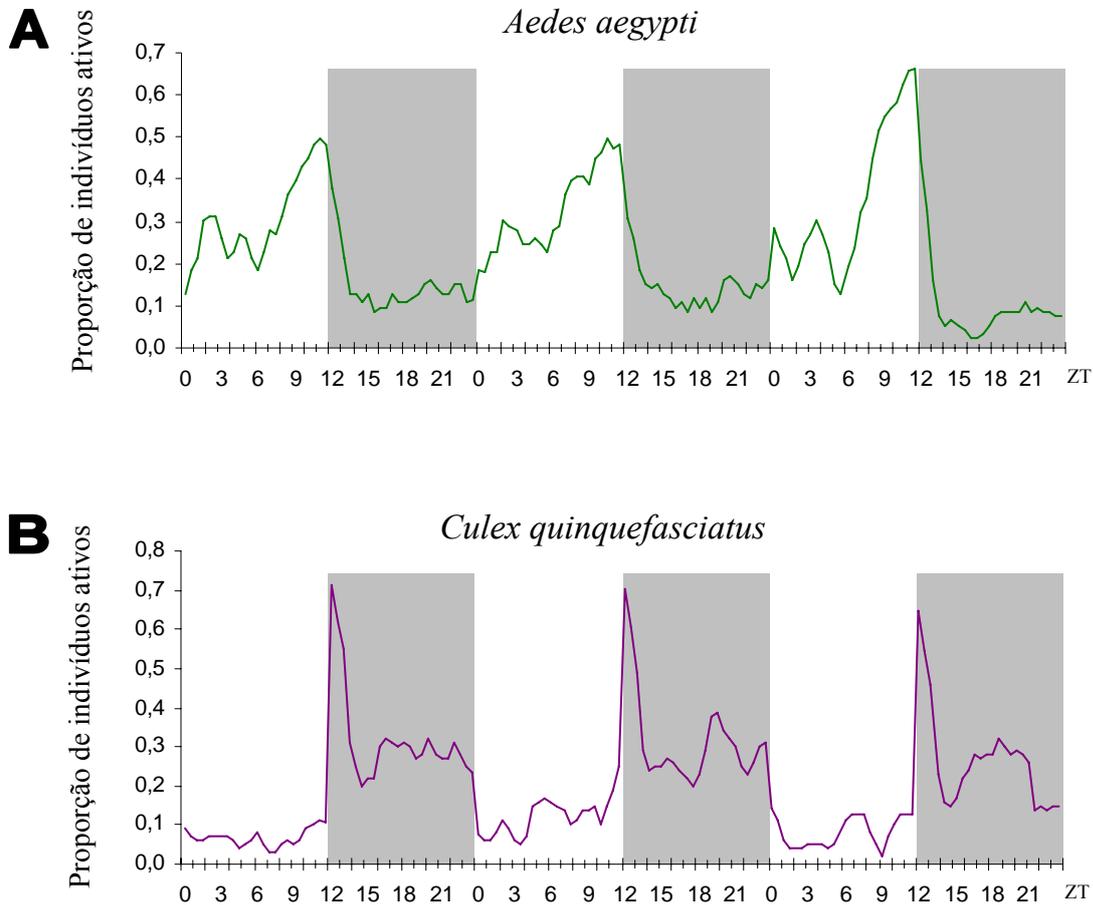


Figura 3.4: Proporção de indivíduos ativos para (A) *Aedes aegypti* (n= 31) e (B) *Culex quinquefasciatus* (n= 32) monitorados ao longo de quatro dias consecutivos, em regime de 12 horas de claro (fundo branco) e 12 horas de escuro (fundo cinza). No gráfico, o primeiro dia de monitoramento foi suprimido. O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT). O ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, sendo a transição da luz abrupta. Os gráficos representam a proporção de indivíduos ativos (eixo das ordenadas) de cada espécie, tendo suas atividades registradas a cada 30 minutos. Os dados expressos nos gráficos sofreram dois tratamentos para diminuição de ruído: a) interpolação dos pontos de leitura de atividade logo após as transições de luz (acender ou apagar das luzes) e b) média móvel entre três pontos para cada valor de leitura de atividade, evitando, porém, a mistura entre um ponto de leitura em fase clara e um em fase escura (nesses casos, foi feita a média móvel para dois pontos apenas).

Proporção de horas de atividade diurna e noturna
de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*
em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro

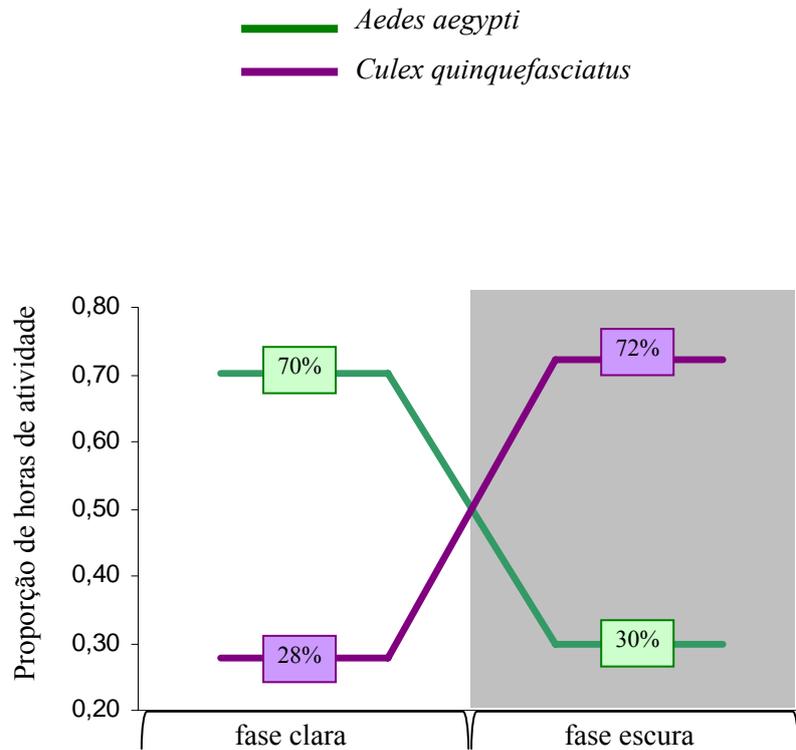


Figura 3.5: Proporção de horas de atividade diurna e noturna de *Aedes aegypti* (n= 31) e *Culex quinquefasciatus* (n= 32). Valores baseados na observação da atividade ao longo dos três dias consecutivos em regime de 12 horas de claro (fundo branco) e 12 horas de escuro (fundo cinza) ilustrados na Figura 3.4. Análise estatística indicou diferença altamente significativa na proporção de atividade diurna entre as duas espécies ($t_{61} = 11,513$; $P < 0,001$).

3.1.2 – Atividade locomotora em regime de escuro constante

Similarmente ao estudo descrito no item 3.1.1 (regime de claro/escuro), foi analisado o padrão de atividade/repouso de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em regime de escuro constante, onde 16 indivíduos de cada espécie permaneceram dois dias em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro e depois passaram a escuro constante por quatro dias. Ao final do experimento, 14 indivíduos de *Ae. aegypti* e 16 de *Cx. quinquefasciatus* ainda encontravam-se vivos e foi com base nos dados de atividades destes que foram conduzidas as análises de atividade em escuro constante, ilustradas nas figuras 3.6 a 3.9. Nas figuras, foi suprimido o primeiro dia, considerado período de adaptação dos indivíduos às condições experimentais. Também foram suprimidos os dois últimos dias em escuro constante, de modo a evitar os dados mais tardios do monitoramento neste regime, quando os indivíduos tendem a sair de sincronia, o que gera muito ruído no cálculo das médias.

Na Figura 3.6, os resultados do monitoramento da atividade em regime de escuro constante são apresentados com os valores das médias de Williams entre a atividade individual dos mosquitos monitorados de cada espécie. Nota-se que *Ae. aegypti* (Figura 3.6A) continua a manter um padrão periódico de atividade/repouso muito semelhante ao que apresenta quando em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, ainda que aparente certo adiantamento. Até mesmo a amplitude da atividade parece não sofrer muita alteração entre a fase claro/escuro e a fase de escuro constante. O pico de atividade imediatamente após o apagar das luzes desaparece em escuro constante e não é observado pico de atividade nas primeiras horas do dia subjetivo. O gráfico de *Cx. quinquefasciatus* (Figura 3.6B) não é tão informativo, uma vez que o pico de atividade promovido pelo apagar das luzes no primeiro dia, e não observado em nenhum outro momento do monitoramento em escuro constante, exige uma escala no gráfico que impede a visualização do padrão de atividade nos demais horários.

A Figura 3.7 foi confeccionada com os mesmos dados da Figura 3.6, mas com o ponto de transição de luz de claro para escuro do primeiro dia de monitoramento sendo interpolado, e ainda sendo calculada a média móvel de três pontos para cada registro de atividade, com exceção do ponto adjacente à transição de luz, onde a média móvel foi de dois pontos (vide explicação do gráfico 3.2 no item 3.1.1). Com esse tratamento, o perfil de atividade de *Ae. aegypti* fica ainda mais claro. Nota-se padrão cíclico de atividade/repouso em escuro constante condizente com o observado em claro/escuro, sendo possível sugerir que um ligeiro acréscimo na atividade seja registrado no início do dia subjetivo, assim como é observado no

início da fase clara. O pico principal de atividade parece sofrer ligeiro adiantamento a cada dia que passa em livre curso. No primeiro dia em escuro constante, a atividade assemelha-se muito ao padrão em regime de claro/escuro, começando a aumentar a partir do CT 6 e tendo o pico entre os CTs 10 e 11. No segundo dia em livre curso, o pico principal de atividade parece sofrer adiantamento considerável. O aumento na atividade começa a ser registrado a partir do CT 3 e o pico recai sobre os CTs 7 a 9. Se observa também um espalhamento da atividade no segundo dia em livre curso.

Apesar da Figura 3.6B não mostrar com clareza o padrão de atividade de *Cx. quinquefasciatus*, o tratamento dos dados descritos para a Figura 3.7 foi eficaz em evidenciar detalhes da atividade dessa espécie (Figura 3.7B). Assim como aconteceu para *Ae. aegypti*, em regime de escuro constante *Cx. quinquefasciatus* também apresenta padrão cíclico de atividade/repouso condizente com o que apresenta em regime de claro/escuro, ainda que com um aparente adiantamento. Nota-se também um espalhamento da atividade no segundo dia de escuridão constante.

A Figura 3.8 mostra a proporção de indivíduos ativos no mesmo experimento apresentado nas Figuras 3.6 e 3.7. Na Figura 3.9, os dados expostos na Figura 3.8 sofreram interpolação da transição de luz e média móvel conforme descrito acima para a Figura 3.7, tornando o perfil do gráfico menos ruidoso e mais simples de ser interpretado.

Na figura 3.9A, verifica-se que, em regime de claro/escuro, mais de 70% das fêmeas de *Ae. aegypti* estão ativas entre os ZTs 7 a 11, caindo para praticamente zero no ZT 17. No primeiro dia em escuro constante, a maior proporção de indivíduos ativos foi registrada entre os CTs 8 e 13, ainda que não tão alta quanto em regime de claro/escuro. A proporção de indivíduos ativos cai no início da noite subjetiva e depois aumenta paulatinamente. No CT 6 do segundo dia em escuro constante cerca de 50% dos mosquitos já estão ativos, e essa proporção sobe para quase 100% no CT 8. A queda na proporção de ativos também é mais gradual e atinge valor mínimo apenas no CT 20 do segundo dia em escuro constante.

A proporção de indivíduos ativos no caso de *Cx. quinquefasciatus* na Figura 3.9A é muito mais ruidosa que a de *Ae. aegypti*, mesmo com o tratamento dos dados. Ainda assim é possível identificar pico na proporção de indivíduos ativos nos dias em escuro constante que parece acumular adiantamento a cada dia em livre curso. No primeiro dia, ainda em regime de claro/escuro, o pico da proporção de ativos recai sobre o ZT 13. No primeiro dia em escuro constante, o pico recai sobre o CT 10 seguido de queda no CT 11 e novo aumento no CT 12. No segundo dia em escuro constante, o pico da proporção de ativos recai sobre o CT 8 seguido de queda entre os CTs 10 e 11 e novo aumento registrado no CT 12.

A comparação entre a proporção de horas totais de atividade no dia e noite subjetivos de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* é ilustrada na Figura 3.10. Durante o dia subjetivo concentraram-se em média 67% do total de horas de atividade de *Ae. aegypti* e 51% das de *Cx. quinquefasciatus* sendo esta diferença significativa ($t_{28} = 2,535$; $P = 0,017$). Note que, como mencionado no Material e Métodos, o dia circadiano usado aqui assume um período de 24 horas e não corresponde ao dia circadiano próprio de cada espécie.

Atividade locomotora de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em regime de escuro constante

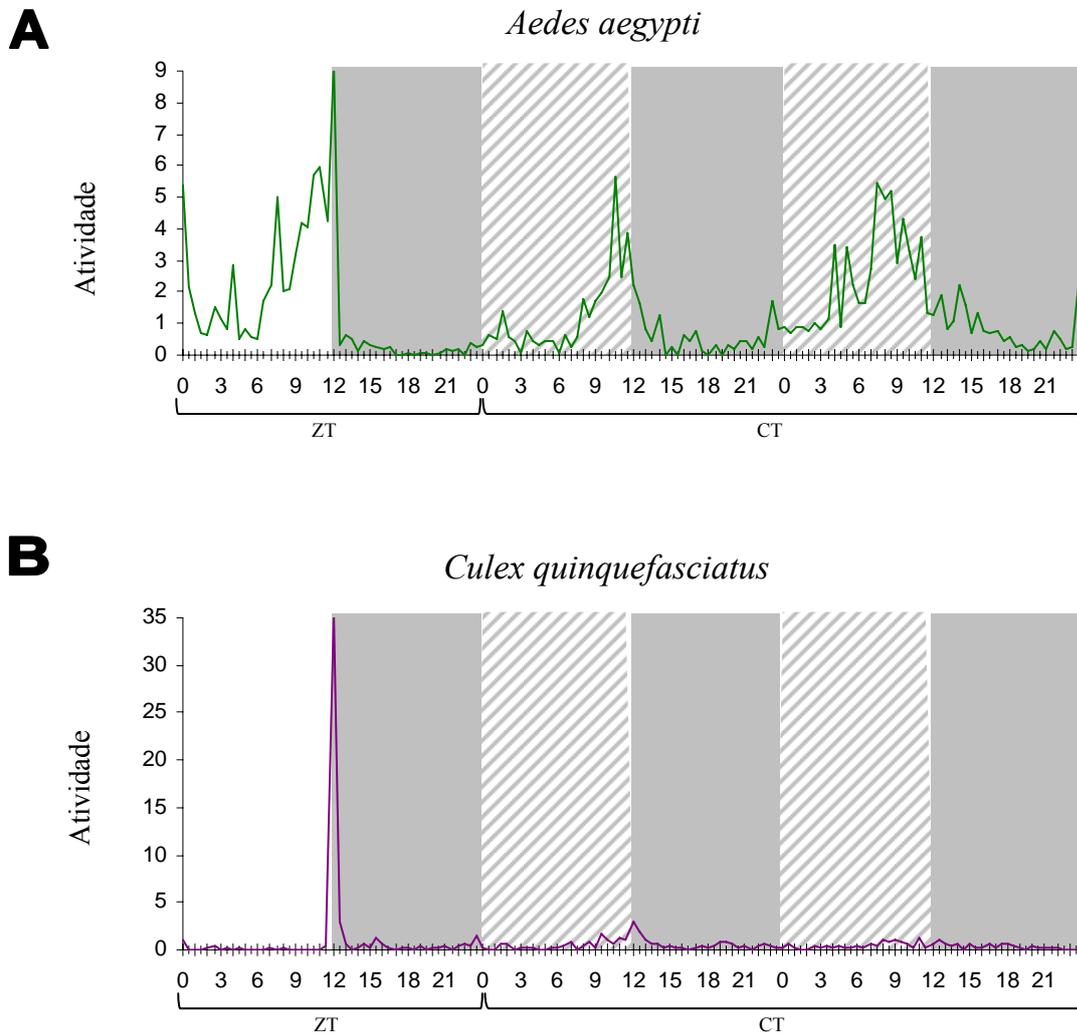


Figura 3.6: Atividade locomotora de (A) *Aedes aegypti* (n= 14) e (B) *Culex quinquefasciatus* (n= 16) monitorada ao longo de dois dias em regime de 12 horas de claro (fundo branco) e 12 horas de escuro (fundo cinza) e quatro dias seguintes em regime de escuro constante. O fundo listrado corresponde ao dia subjetivo (vide material e métodos). O gráfico ilustra o segundo dia em regime de claro/escuro e os dois primeiros em escuro constante. O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT) para o primeiro dia e o *Circadian Time* (CT) para os dois últimos dias. Nos dias em regime de claro/escuro, o ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, sendo a transição da luz abrupta. Os gráficos representam a média de atividade (média de Williams – eixo das ordenadas) entre os indivíduos de cada espécie, monitorados independentemente, tendo suas atividades registradas a cada 30 minutos.

Atividade locomotora de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em regime de escuro constante

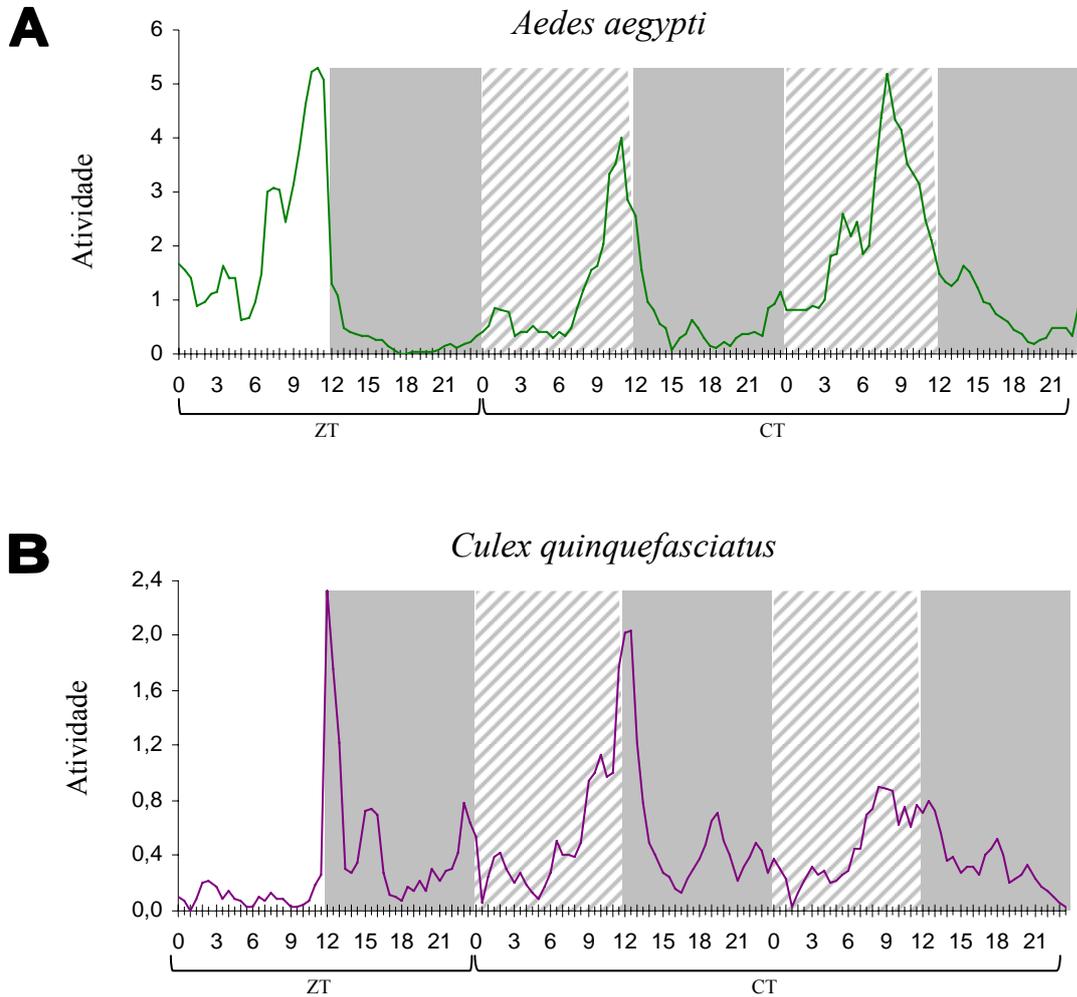


Figura 3.7: Atividade locomotora de (A) *Aedes aegypti* (n= 14) e (B) *Culex quinquefasciatus* (n= 16) monitorada ao longo de dois dias em regime de 12 horas de claro (fundo branco) e 12 horas de escuro (fundo cinza) e quatro dias seguintes em regime de escuro constante. O fundo listrado corresponde ao dia subjetivo (vide material e métodos). O gráfico ilustra o segundo dia em regime de claro/escuro e os dois primeiros em escuro constante. O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT) para o primeiro dia e o *Circadian Time* (CT) para os dois últimos dias. Nos dias em regime de claro/escuro, o ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, sendo a transição da luz abrupta. Os gráficos representam a média de atividade (média de Williams - eixo das ordenadas) entre os indivíduos de cada espécie, monitorados independentemente, tendo suas atividades registradas a cada 30 minutos. Os dados expressos nos gráficos sofreram dois tratamentos para diminuição de ruído: a) interpolação dos pontos de leitura de atividade logo após as transições de luz (acender ou apagar das luzes) e b) média móvel entre três pontos para cada valor de leitura de atividade, evitando, porém, a mistura entre um ponto de leitura em fase clara e um em fase escura (nesses casos, foi feita a média móvel para dois pontos apenas).

Proporção de indivíduos ativos
(*Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*)
em regime de escuro constante

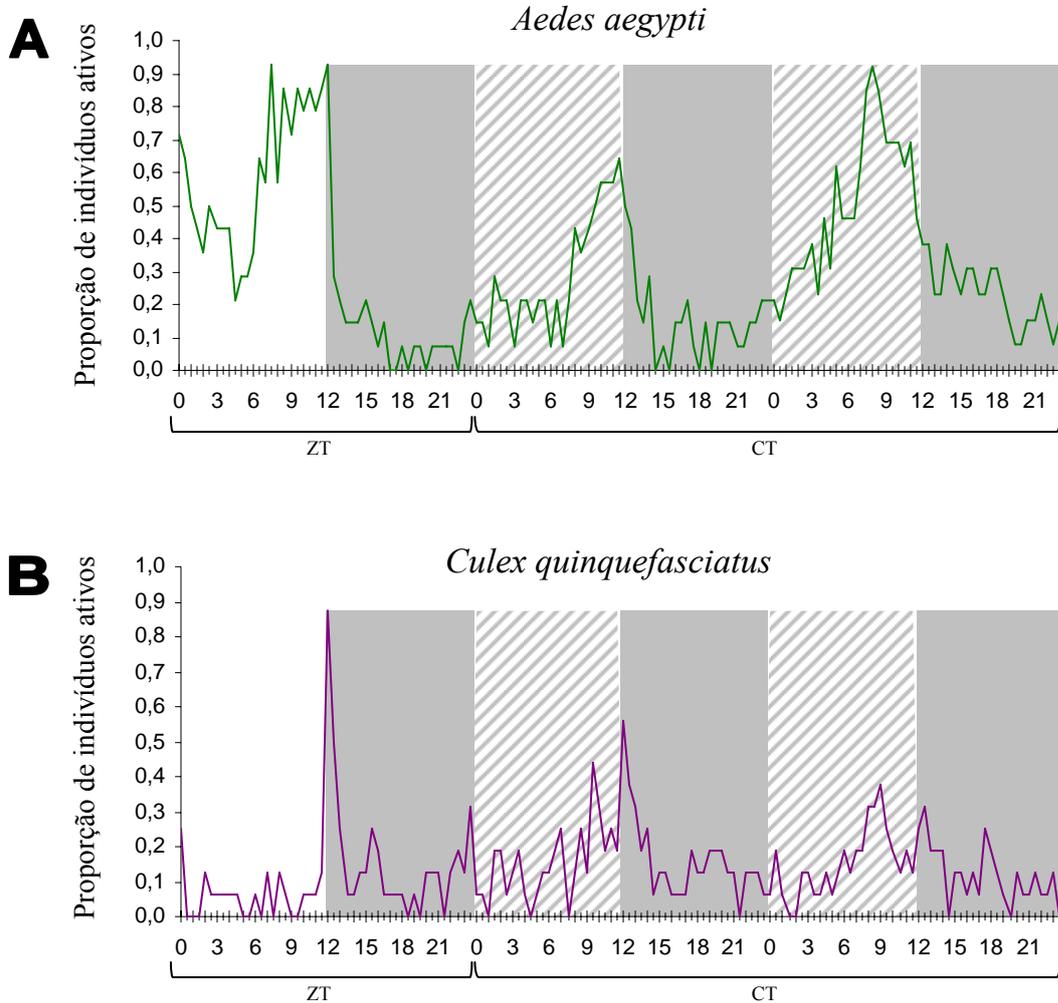


Figura 3.8: Proporção de indivíduos ativos para (A) *Aedes aegypti* (n= 14) e (B) *Culex quinquefasciatus* (n= 16) monitorados ao longo de dois dias em regime de 12 horas de claro (fundo branco) e 12 horas de escuro (fundo cinza) e quatro dias seguintes em regime de escuro constante. O fundo listrado corresponde ao dia subjetivo (vide material e métodos). Os gráficos ilustram o segundo dia em regime de claro/escuro e os dois primeiros em escuro constante. O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT) para o primeiro dia e o *Circadian Time* (CT) para os dois últimos dias. O ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, sendo a transição da luz abrupta. Os gráficos representam a proporção de indivíduos ativos (eixo das ordenadas) de cada espécie, tendo suas atividades registradas a cada 30 minutos.

Proporção de indivíduos ativos
(*Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*)
em regime de escuro constante

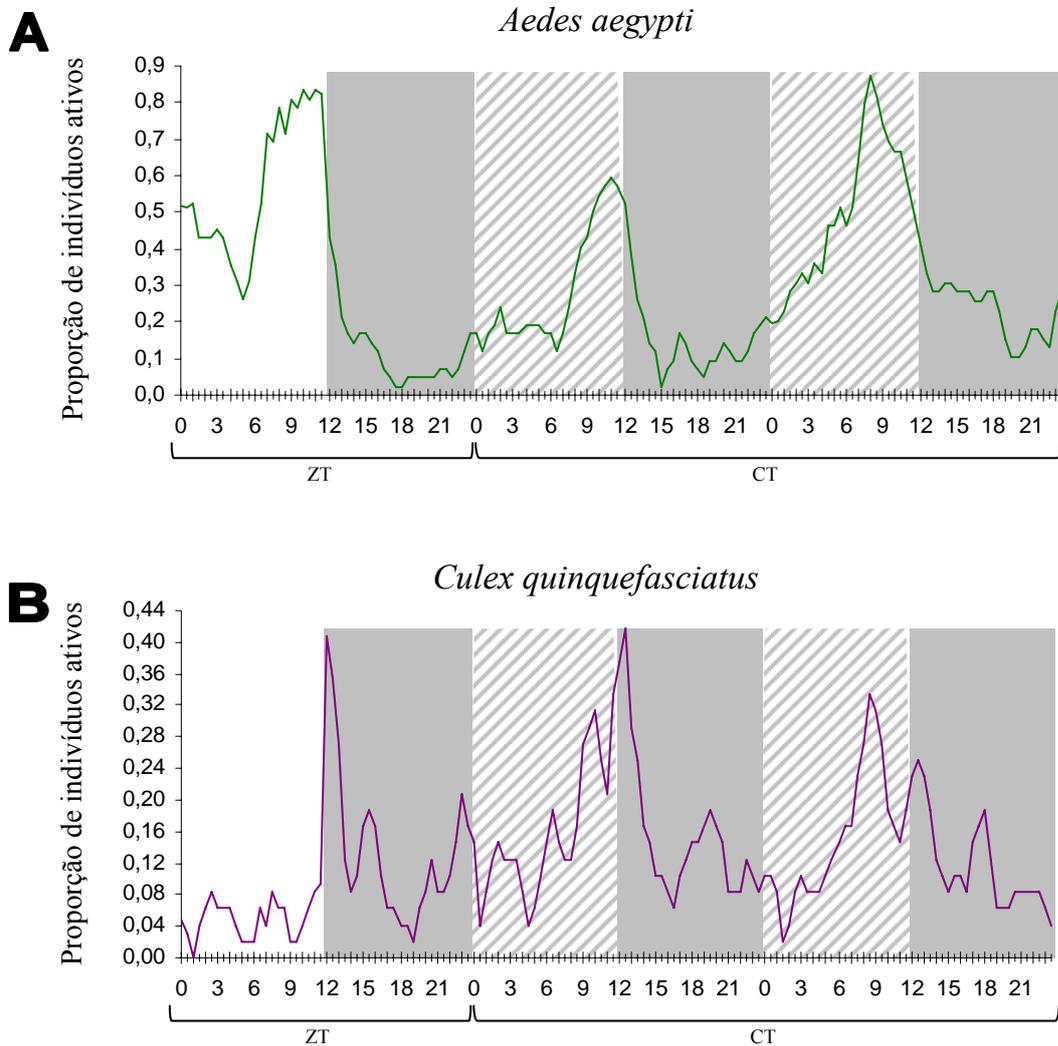


Figura 3.9: Proporção de indivíduos ativos para (A) *Aedes aegypti* (n= 14) e (B) *Culex quinquefasciatus* (n= 16) monitorados ao longo de dois dias em regime de 12 horas de claro (fundo branco) e 12 horas de escuro (fundo cinza) e quatro dias seguintes em regime de escuro constante. O fundo listrado corresponde ao dia subjetivo (vide material e métodos). Os gráficos ilustram o segundo dia em regime de claro/escuro e os dois primeiros em escuro constante. O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT) para o primeiro dia e o *Circadian Time* (CT) para os dois últimos dias. O ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, sendo a transição da luz abrupta. Os gráficos representam a proporção de indivíduos ativos (eixo das ordenadas) de cada espécie, tendo suas atividades registradas a cada 30 minutos. Os dados expressos nos gráficos sofreram dois tratamentos para diminuição de ruído: a) interpolação dos pontos de leitura de atividade logo após as transições de luz (acender ou apagar das luzes) e b) média móvel entre três pontos para cada valor de leitura de atividade, evitando, porém, a mistura entre um ponto de leitura em fase clara e um em fase escura (nesses casos, foi feita a média móvel para dois pontos apenas).

Proporção de horas de atividade no dia e noite subjetivos de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em regime de escuro constante

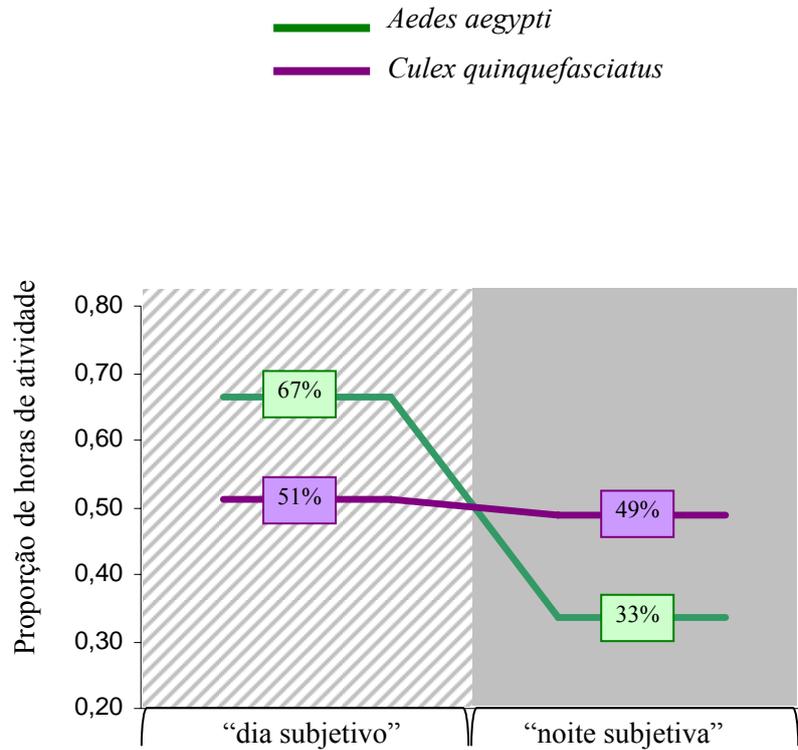


Figura 3.10: Proporção de horas de atividade de *Aedes aegypti* (n= 14) e *Culex quinquefasciatus* (n= 16). Valores baseados na observação da atividade ao longo de dois dias consecutivos em regime de escuro constante (fundo listrado: “dia subjetivo”; fundo cinza: “noite subjetiva” - vide material e métodos) ilustrados na Figura 3.9. Análise estatística indicou diferença significativa na proporção de atividade “diurna” (dia subjetivo) entre as duas espécies ($t_{28}= 2,535$; $P= 0,017$).

3.1.3 – Período da atividade em livre-curso (τ)

Os experimentos de monitoramento do ritmo de atividade locomotora de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em regime de escuro constante perduraram por dois dias a mais do que o ilustrado nas figuras 3.6 à 3.9, perfazendo um total de quatro dias consecutivos em escuro constante. O resultado do monitoramento da atividade locomotora ao longo destes quatro dias foi utilizado para a determinação do período endógeno de cada espécie, ou seja, aquele que a espécie mantém quando em livre-curso, representado pela letra grega τ (*tau*) (vide introdução). O registro da atividade foi convertido em proporção de indivíduos ativos a cada ponto de registro de atividade e calculada a média móvel entre três pontos ao longo de todo o período dos quatro dias considerados. Com esses valores foram efetuados os cálculos de autocorrelação para cada espécie.

O resultado do cálculo de autocorrelação da atividade de *Ae. aegypti* em escuro constante encontra-se graficamente exposto na Figura 3.11, e a de *Cx. quinquefasciatus* na Figura 3.12. O gráfico de autocorrelação de *Ae. aegypti* mostra um pico no *lag* 45, apontando para um τ de 22 horas e 30 minutos⁶. No caso de *Cx. quinquefasciatus* o gráfico de autocorrelação não é tão claro, mas sugere um período de 24 horas. Entretanto, análise utilizando média móvel de cinco pontos aponta para τ entre 22 e 23 horas, com pico entre os *lags* 44 a 46 (dados não mostrados).

⁶ O registro da atividade era feito a cada 30 minutos (vide material e métodos). Desta forma, o pico de autocorrelação recaindo sobre o *lag* 45 significa que o pico da atividade aconteceu em escuro constante no 45º registro de atividade. Trinta minutos = 0,5 hora. Então, dividindo 45 por 2 tem-se o momento do pico de atividade em horas, ou seja, 22,5 horas.

Autocorrelação da atividade locomotora de *Culex quinquefasciatus*

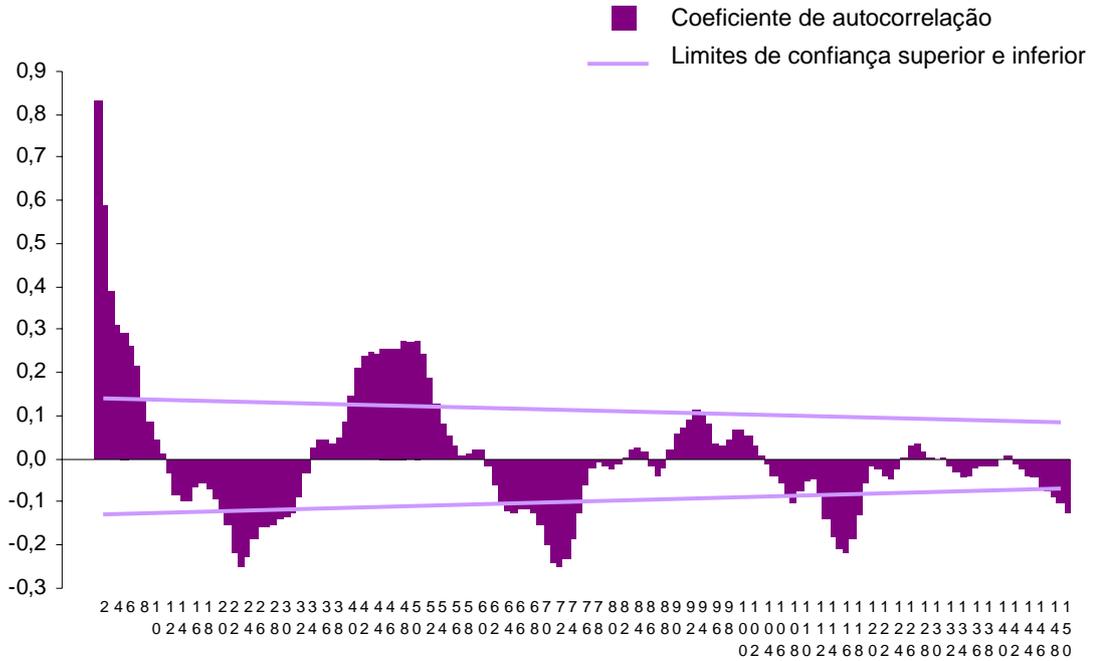


Figura 3.12: Autocorrelação da atividade locomotora de *Culex quinquefasciatus*. Foram utilizados os registros da atividade locomotora dos 16 indivíduos monitorados no experimento ilustrado na Figura 3.6B, considerando quatro dias nos quais os mosquitos foram mantidos em escuro constante (os dois que aparecem na Figura 3.9B mais dois seguintes a eles, não ilustrados na figura). Os dados foram convertidos em percentual de indivíduos ativos e ainda calculada a média móvel de três pontos, e só então foi calculada a autocorrelação com 150 lags. O eixo das abscissas indica o valor do coeficiente de autocorrelação e o eixo das ordenadas indica o lag da autocorrelação. O pico da primeira curva não está bem definido. Parece recair no lag 48, o que indica período (τ) de 24 horas, mas análise utilizando média móvel de cinco pontos sugere período menor, entre 22 a 23 horas (pico entre os lags 44 e 46 – resultados não mostrados).

3.2 – Curva de expressão circadiana dos genes de relógio em *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

Foi investigado o padrão de expressão temporal dos genes de relógio *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em cabeça de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* mantidos em regime de claro/escuro e escuro constante, bem como nos corpos de fêmeas de *Ae. aegypti* mantidos em claro/escuro. Os resultados da expressão de cada gene nessas espécies encontram-se descritos a seguir.

3.2.1 – Expressão em cabeça de fêmea de *Aedes aegypti*

A expressão de *period* em cabeça de fêmeas de *Ae. aegypti* mantidas em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro encontra-se ilustrada na Figura 3.13A. A análise de variância (ANOVA) indicou diferença altamente significativa da expressão entre os ZT ($F_{11,36} = 22,625$; $P < 0,001$) e o perfil do gráfico evidencia um ciclo diário de grande amplitude na abundância de *period*. O valor mais baixo foi registrado no ZT 7 e o pico no ZT 17, sendo da ordem de 50 vezes a diferença na abundância entre esses dois pontos. Análise utilizando o teste LSD demonstrou que a diferença entre pico e vale do gráfico também é altamente significativa ($P < 0,001$), e apontou ainda os ZTs 1 a 11 e 23 como significativamente diferentes no pico, e os ZTs 1, 3 e 9 a 23 como significativamente diferentes do vale ($P < 0,05$).

A Figura 3.13B ilustra o padrão de expressão de *period* em cabeça de fêmeas de *Ae. aegypti* mantidas em regime de escuro constante. Análise de variância (ANOVA) indicou diferença altamente significativa entre os CTs ($F_{11,36} = 22,530$; $P < 0,001$) e o perfil do gráfico evidencia o padrão rítmico da expressão. Os pontos de menor e maior abundância de *period* foram registrados, respectivamente, nos CTs 7 e 17. A diferença na expressão do gene entre estes dois pontos, da ordem de 35 vezes, é altamente significativa de acordo com o teste LSD ($P < 0,001$), que apontou ainda os CTs 1 a 13, 21 e 23 como significativamente diferentes no pico, e os CTs 1, 3 e 11 a 23 como significativamente diferentes do vale ($P < 0,05$).

O perfil de expressão de *timeless* em cabeça de fêmeas de *Ae. aegypti* mantidas em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro está ilustrada na Figura 3.14A. Apesar da análise de variância (ANOVA) ter indicado diferença não significativa entre ZTs ($F_{11,36} = 1,113$; $P = 0,379$), foi efetuado o teste LSD, a título ilustrativo, que indicou diferença

significativa ($P= 0,018$) entre pico e vale do gráfico, que recaem sobre os ZTs 13 e 23, respectivamente. Ainda assim, a variação na expressão gênica entre esses pontos é de apenas 2,5 vezes. O mesmo teste LSD apontou os ZTs 3, 5, 9, 17 e 23 como significativamente diferentes do pico, mas o ZT 13 como o único significativamente diferente do vale ($P< 0,05$).

A expressão de *timeless* em cabeça de fêmeas de *Ae. aegypti* mantidas em escuro constante encontra-se ilustrada na Figura 3.14B, e neste caso a análise de variância (ANOVA) indicou diferença altamente significativa entre os pontos analisados ($F_{11,36}= 5,299$; $P< 0,001$), e o perfil do gráfico demonstra o padrão de ciclagem do gene. O registro do menor valor de expressão de *timeless* foi nos CTs 5 e 7, enquanto o pico da expressão no CT 15, e a diferença na abundância do gene entre pico e vale do gráfico foi de apenas 3 vezes. Teste LSD aponta para diferença altamente significativa entre os pontos de menor e maior abundância de expressão gênica ($P< 0,001$), indicando ainda os CTs 3 a 9 como significativamente diferentes do pico e os CTs 11 a 23 como significativamente diferentes do vale ($P< 0,05$).

As Figuras 3.15A e 3.15B ilustram a expressão de *cycle* em cabeça de fêmeas de *Ae. aegypti* em regime de claro/escuro e escuro constante, respectivamente, e para ambas a análise de variância (ANOVA) indicou diferença altamente significativa da expressão entre os pontos considerados: entre ZTs na Figura 3.15A ($F_{11,36}= 8,026$; $P< 0,001$) e entre CTs, na Figura 3.15B ($F_{11,36}= 13,717$; $P< 0,001$). O ciclo circadiano da expressão de *cycle* nas duas condições é evidenciado pelo perfil da curva de cada gráfico. Em regime de claro/escuro (Figura 3.15A), o pico de expressão deste gene recai sobre o ZT 3 e o vale no ZT 11, sendo a diferença entre esses pontos da ordem de 12 vezes. Teste LSD demonstrou que a diferença entre pico e vale do gráfico é altamente significativa ($P< 0,001$), e apontou os ZTs 9 a 21 como significativamente diferentes no pico, e os ZTs 1 a 9 e 19 a 23 como significativamente diferentes do vale ($P< 0,05$). A Figura 3.15B, que mostra o mesmo gene expresso em regime de escuro constante, apresenta pico no CT 1 e vale no CT 15 com uma diferença na abundância de *cycle* na ordem de 8 vezes. Teste de comparação LSD demonstrou que, neste caso, a diferença entre pico e vale do gráfico também é altamente significativa ($P< 0,001$), e que são significativamente diferentes ($P< 0,05$) do pico os CTs 7 a 9 e do vale os CTs 1 a 11 e 17 a 23.

O padrão de expressão circadiana de *Clock* também foi investigado em regime de claro/escuro (Figura 3.16A) e escuro constante (Figura 3.16B), mas a análise de variância (ANOVA) indicou diferença não significativa tanto entre ZTs, no gráfico da Figura 3.16A ($F_{11,36}= 1,712$; $P= 0,131$), quanto entre CTs, no gráfico da Figura 3.16B ($F_{11,36}= 1,431$; $P= 0,222$). Ainda assim, testes de comparação LSD foram conduzidos em caráter ilustrativo e

indicaram diferenças significativas entre pico e vale de ambos os gráficos (Figura 3.16A: $P=0,010$; Figura 3.16B: $P< 0,018$). Na Figura 3.16A, pico e vale recaem sobre os ZTs 3 e 9, respectivamente, e a diferença na abundância de *Clock* é da ordem de 3 vezes. Teste LSD apontou ainda os ZTs 9, 11 e 17 como significativamente diferentes do pico e ZTs 1 a 5, 21 e 23 como significativamente diferentes do vale ($P< 0,05$). Na Figura 3.17B, o pico de abundância de *Clock* acontece no CT 21 e o valor mais baixo no CT 9, sendo a diferença entre eles em torno de 2,5 vezes. Para este gráfico, Teste LSD indicou os CTs 9 e 13 como significativamente diferentes do pico e CTs 1 e 21 como significativamente diferentes do vale ($P< 0,05$).

Expressão de *period* em cabeça de fêmeas de *Aedes aegypti*

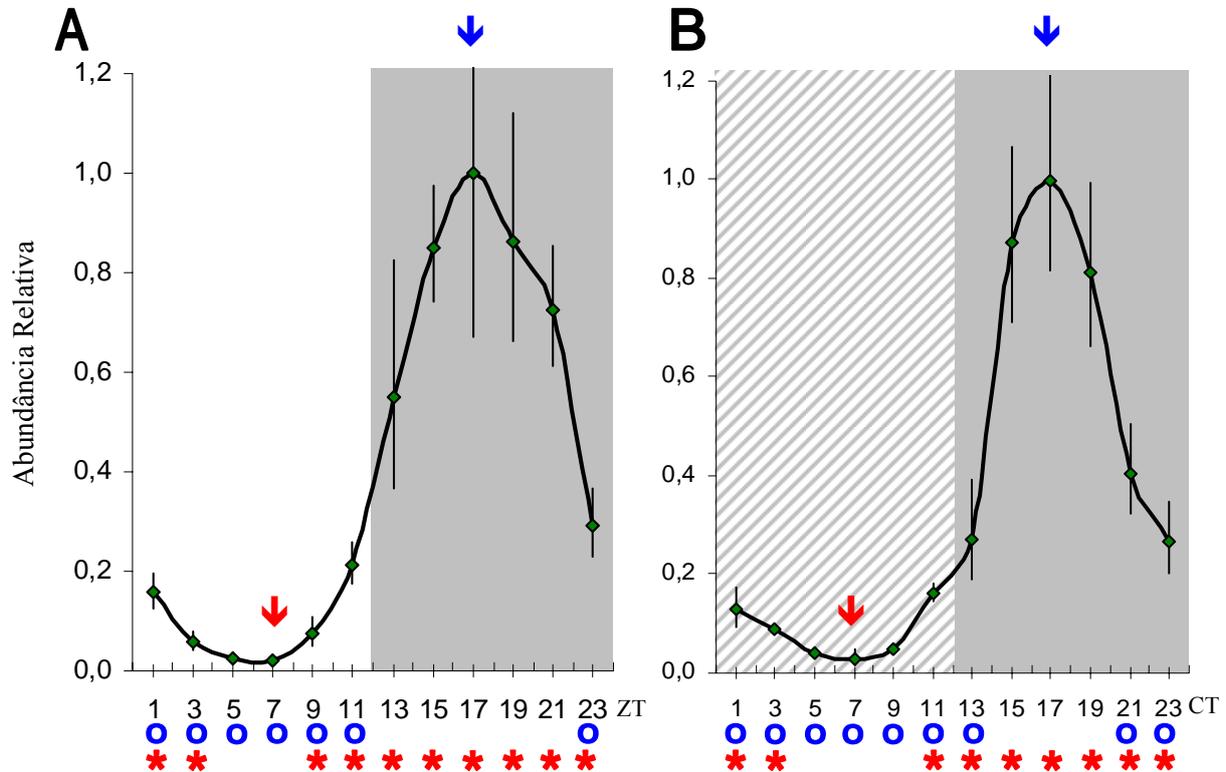


Figura 3.13: Expressão de *period* em cabeça de fêmeas de *Aedes aegypti*. A) Expressão em regime de 12 horas de luz (fundo branco) e 12 horas de escuro (fundo cinza). O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT). O ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, sendo a transição da luz abrupta. B) Expressão em regime de escuro constante; o eixo das abscissas indica o *Circadian Time* (CT) e o fundo em padrão de listras representa o “dia subjetivo” (vide material e métodos), enquanto o fundo cinza representa a “noite subjetiva”. Os gráficos mostram os valores de abundância relativa (eixo das ordenadas) da expressão gênica baseados na média entre quatro experimentos independentes e as barras verticais representam uma faixa de variação de valores baseados no erro padrão da média. O eixo das ordenadas está padronizado para valor máximo de 1,2 (parte da barra de erro do ponto máximo dos gráficos foi cortada em função da padronização). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença altamente significativa tanto entre ZTs, no gráfico A ($F_{11,36} = 22,625$; $P < 0,001$), quanto entre CTs, no gráfico B ($F_{11,36} = 22,530$; $P < 0,001$). O pico de cada gráfico é apontado por \downarrow e o vale por \downarrow , e teste de comparação LSD demonstrou que a diferença entre esses pontos em ambos os gráficos também é altamente significativa ($P < 0,001$). O gráfico A sugere oscilação da abundância de expressão gênica na ordem de 50 vezes, e o gráfico B de 35 vezes. Com base nos resultados do teste LSD, pontos significativamente diferentes ($P < 0,05$) do pico são indicados por \circ e os diferentes do vale por $*$.

Expressão de *timeless* em cabeça de fêmeas de *Aedes aegypti*

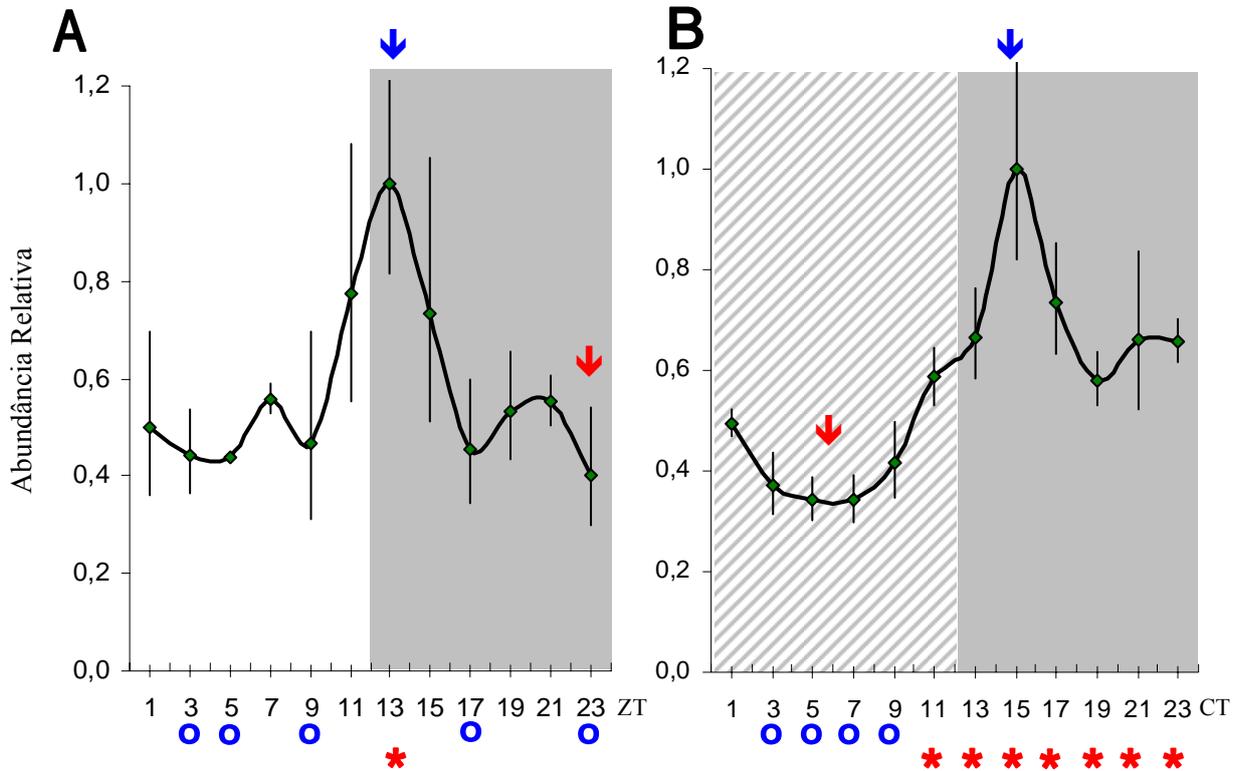


Figura 3.14: Expressão de *timeless* em cabeça de fêmeas de *Aedes aegypti*. A) Expressão em regime de 12 horas de luz (fundo branco) e 12 horas de escuro (fundo cinza). O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT). O ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, sendo a transição da luz abrupta. B) Expressão em regime de escuro constante; o eixo das abscissas indica o *Circadian Time* (CT) e o fundo em padrão de listras representa o “dia subjetivo” (vide material e métodos), enquanto o fundo cinza representa a “noite subjetiva”. Os gráficos mostram os valores de abundância relativa (eixo das ordenadas) da expressão gênica baseados na média entre quatro experimentos independentes e as barras verticais representam uma faixa de variação de valores baseados no erro padrão da média. O eixo das ordenadas está padronizado para valor máximo de 1,2. A análise de variância (ANOVA) indicou diferença não significativa entre ZTs, no gráfico A ($F_{11,36} = 1,113$; $P = 0,379$), porém altamente significativa entre CTs, no gráfico B ($F_{11,36} = 5,299$; $P < 0,001$). O pico de cada gráfico é apontado por ↓ e o vale por ↓, e teste de comparação LSD demonstrou que a diferença entre esses pontos em ambos os gráficos é significativa (gráfico A: $P = 0,018$; gráfico B: $P < 0,001$). O gráfico A sugere oscilação da abundância de expressão gênica na ordem de 2,5 vezes, e o gráfico B de 3 vezes. Com base nos resultados do teste LSD, pontos significativamente diferentes ($P < 0,05$) do pico são indicados por ○ e os diferentes do vale por *. A rigor o cálculo de LSD não é aplicável em dados cuja análise de variância não é significativa, como a representada no gráfico A, mas aqui foi mostrada a título ilustrativo.

Expressão de *cycle* em cabeça de fêmeas de *Aedes aegypti*

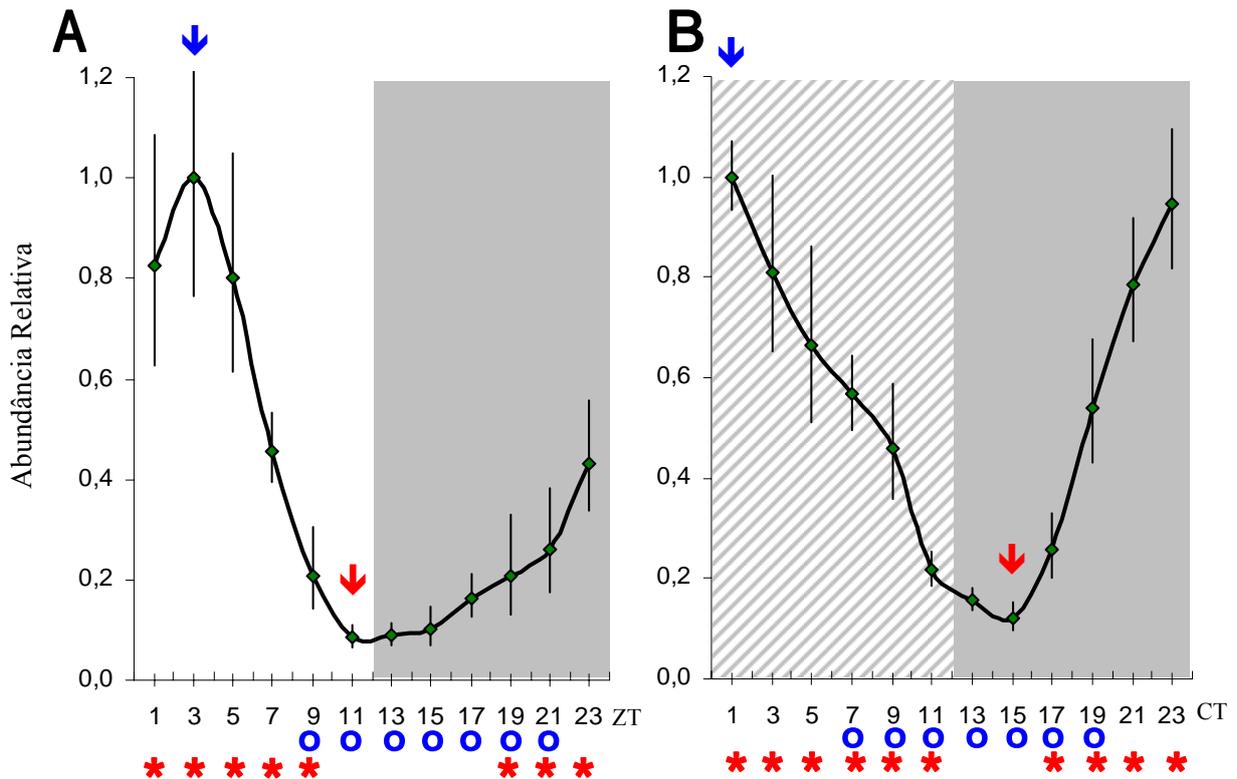


Figura 3.15: Expressão de *cycle* em cabeça de fêmeas de *Aedes aegypti*. A) Expressão em regime de 12 horas de luz (fundo branco) e 12 horas de escuro (fundo cinza). O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT). O ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, sendo a transição da luz abrupta. B) Expressão em regime de escuro constante; o eixo das abscissas indica o *Circadian Time* (CT) e o fundo em padrão de listras representa o “dia subjetivo” (vide material e métodos), enquanto o fundo cinza representa a “noite subjetiva”. Os gráficos mostram os valores de abundância relativa (eixo das ordenadas) da expressão gênica baseados na média entre quatro experimentos independentes e as barras verticais representam uma faixa de variação de valores baseados no erro padrão da média. O eixo das ordenadas está padronizado para valor máximo de 1,2 (parte da barra de erro do ponto máximo do gráfico A foi cortada em função da padronização). Cada gráfico foi estabelecido pela média entre quatro experimentos independentes e as barras verticais representam o erro padrão da média. A análise de variância (ANOVA) indicou diferença altamente significativa tanto entre ZTs, no gráfico A ($F_{11,36} = 8,026$; $P < 0,001$) quanto entre CTs, no gráfico B ($F_{11,36} = 13,717$; $P < 0,001$). O pico de cada gráfico é apontado por \downarrow e o vale por \downarrow , e o teste LSD demonstrou que a diferença entre esses pontos em ambos os gráficos também é altamente significativa ($P < 0,001$). O gráfico A sugere oscilação da abundância de expressão gênica na ordem de 12 vezes, e o gráfico B de 8 vezes. Com base nos resultados do teste LSD, pontos significativamente diferentes ($P < 0,05$) do pico são indicados por \circ e os diferentes do vale por $*$.

Expressão de *Clock* em cabeça de fêmeas de *Aedes aegypti*

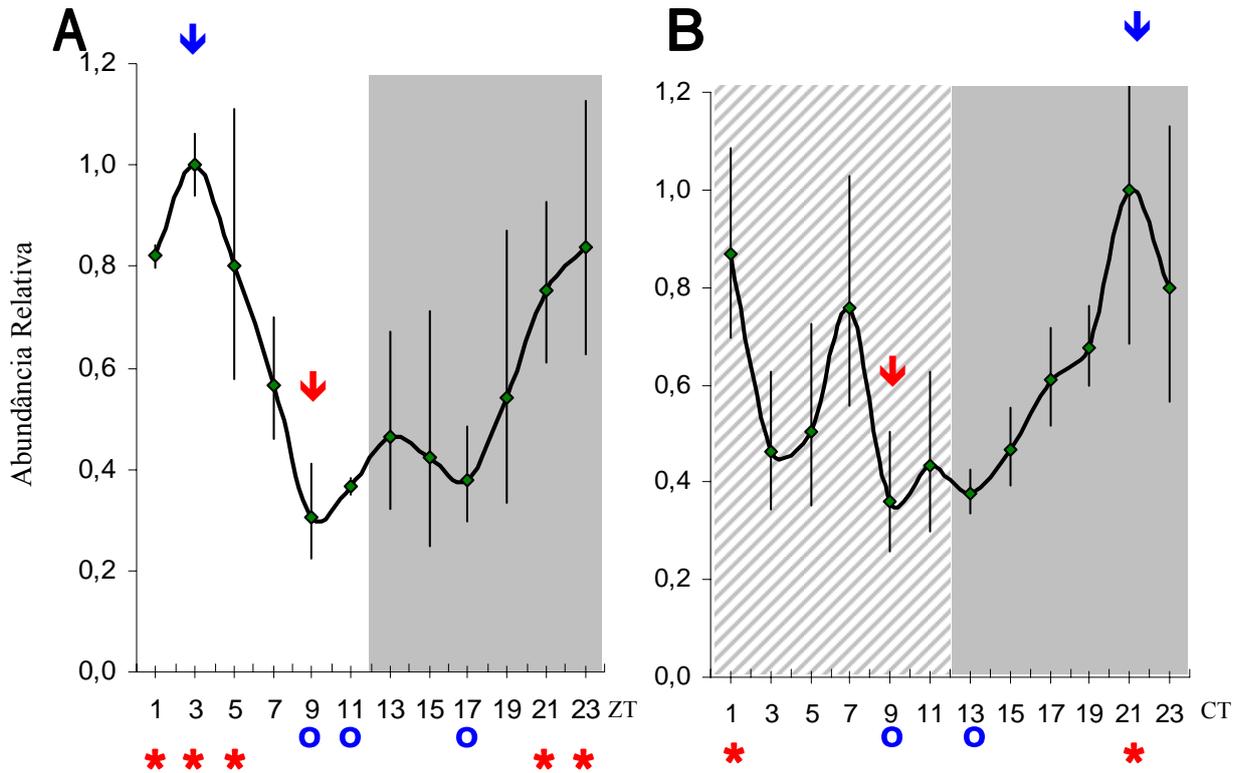


Figura 3.16: Expressão de *Clock* em cabeça de fêmeas de *Aedes aegypti*. A) Expressão em regime de 12 horas de luz (fundo branco) e 12 horas de escuro (fundo cinza). O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT). O ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, sendo a transição da luz abrupta. B) Expressão em regime de escuro constante; o eixo das abscissas indica o *Circadian Time* (CT) e o fundo em padrão de listras representa o “dia subjetivo” (vide material e métodos), enquanto o fundo cinza representa a “noite subjetiva”. Os gráficos mostram os valores de abundância relativa (eixo das ordenadas) da expressão gênica baseados na média entre quatro experimentos independentes e as barras verticais representam uma faixa de variação de valores baseados no erro padrão da média. O eixo das ordenadas está padronizado para valor máximo de 1,2 (parte da barra de erro do ponto máximo do gráfico B foi cortada em função da padronização). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença não significativa tanto entre ZTs, no gráfico A ($F_{11,36} = 1,712$; $P = 0,131$), quanto entre CTs, no gráfico B ($F_{11,36} = 1,431$; $P = 0,222$). O pico de cada gráfico é apontado por ↓ e o vale por ↓, e teste de comparação LSD demonstrou que a diferença entre esses pontos em ambos os gráficos é significativa (gráfico A: $P = 0,010$; gráfico B: $P < 0,018$). O gráfico A sugere oscilação da abundância de expressão gênica na ordem de 3 vezes, e o gráfico B de 2,5 vezes. Com base nos resultados do teste LSD, pontos significativamente diferentes ($P < 0,05$) do pico são indicados por ○ e os diferentes do vale por *. A rigor o cálculo de LSD não é aplicável em distribuição cuja análise de variância não é significativa, como a representada no gráfico A, mas aqui foi mostrada a título ilustrativo.

3.2.2 – Expressão em corpo de fêmea de *Aedes aegypti*

Dentre os quatro experimentos de 12 amostras temporais coletadas num intervalo de 24 horas em regime de 12 horas de claro e 12 horas, os corpos (decapitados) de três deles foram usados para verificação do padrão de expressão dos genes de relógio *period*, *timeless* e *cycle*, e dois para *Clock*, e encontram-se ilustrada na Figura 3.17, nos gráficos A, B, C e D, respectivamente. A análise de variância (ANOVA) indicou só haver diferença significativa entre ZTs para *period*, no gráfico A ($F_{11,23} = 2,744$; $P = 0,020$), não sendo significativa para *timeless*, no gráfico B ($F_{11,23} = 1,334$; $P = 0,269$), *cycle*, no gráfico C ($F_{11,24} = 1,435$; $P = 0,221$), nem para *Clock*, no gráfico D ($F_{11,23} = 0,958$; $P = 0,958$). Teste LSD foi conduzido para todos os gráficos para determinar se a diferença entre pico e vale de cada um deles era significativa. No caso dos gráficos B, C e D não é tecnicamente cabível esta análise por conta do resultado do teste de variância, mas, mesmo assim, o teste LSD foi realizado a título ilustrativo. Os resultados foram diferenças significativas apenas entre pico e vale nos gráficos A ($P = 0,002$), B ($P = 0,013$) e C ($P = 0,020$). Ainda com base nos resultados do teste LSD, pontos significativamente diferentes ($P < 0,05$) do pico no gráfico A são os ZTs 1 a 3, e do vale os ZTs 11 a 23. No gráfico B, apenas o ZT 5 é significativamente diferente do pico e os ZTs 1, 9, 13, 15 e 19 a 23 diferentes do vale ($P < 0,05$). No gráfico C, os ZTs 13 e 17 a 21 são significativamente diferentes do pico e os ZTs 5 e 7 diferentes do vale ($P < 0,05$). A ordem de grandeza da oscilação da abundância de expressão gênica nos gráficos é de 5 vezes no gráfico A, 1,8 vezes no gráfico B e 2 vezes no gráfico C.

Expressão de *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em corpo de fêmeas de *Aedes aegypti*

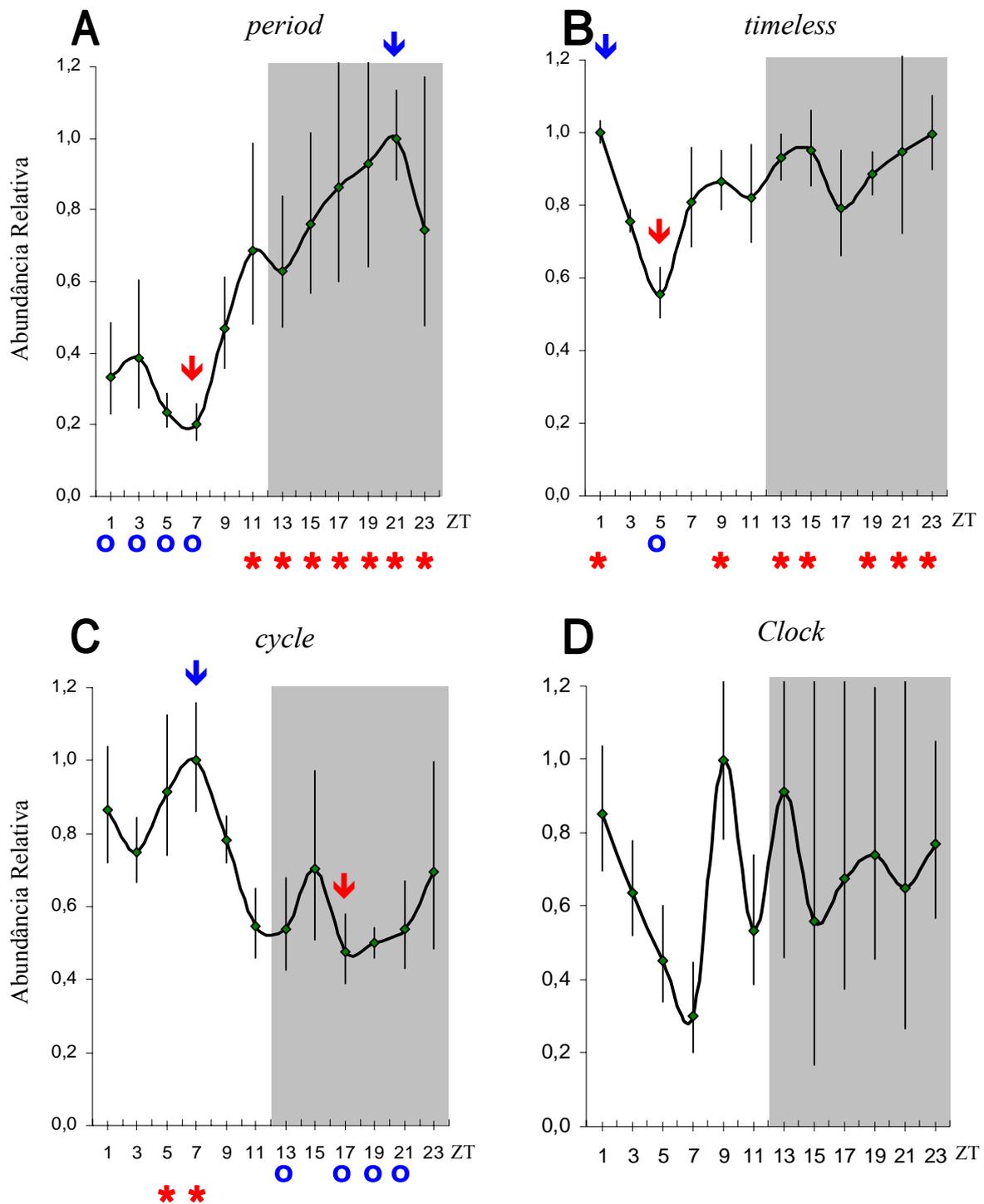


Figura 3.17: Legenda na próxima página

Figura 3.17: Expressão em regime de 12 horas de luz (fundo branco) e 12 horas de escuro (fundo cinza) dos genes (A) *period*, (B) *timeless*, (C) *cycle* e (D) *Clock* em corpo (decapitado) de fêmeas de *Aedes aegypti*. O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT). O ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, sendo a transição da luz abrupta. Os gráficos mostram os valores de abundância relativa (eixo das ordenadas) da expressão gênica baseados na média entre três experimentos independentes, no caso dos gráficos A, B e C, e dois experimentos no caso do gráfico D, e as barras verticais representam uma faixa de variação de valores baseados no erro padrão da média. O eixo das ordenadas está padronizado para valor máximo de 1,2 (parte da barra de erro foi algumas vezes cortada em função da padronização: gráfico A nos ZTs 17 e 19; gráfico B no ZT 21 e no gráfico C nos ZTs 9, 13, 15, e 21). A análise de variância (ANOVA) indicou só haver diferença significativa entre ZTs para *period*, no gráfico A ($F_{11,23} = 2,744$; $P = 0,020$), não sendo significativa para *timeless*, no gráfico B ($F_{11,23} = 1,334$; $P = 0,269$), *cycle*, no gráfico C ($F_{11,24} = 1,435$; $P = 0,221$), nem para *Clock*, no gráfico D ($F_{11,23} = 0,958$; $P = 0,958$). O pico de cada gráfico é apontado por ↓ e o vale por ▼, e o teste LSD demonstrou que a diferença entre esses pontos é significativa nos gráficos A ($P = 0,002$), B ($P = 0,013$) e C ($P = 0,020$). Apesar de não cabível devido à análise de variância não indicar diferenças significativas entre ZTs, o teste de LSD para os gráficos B, C e D foi conduzido a título ilustrativo também para os valores desses gráficos. O gráfico A sugere oscilação da abundância de expressão gênica na ordem de 5 vezes, o gráfico B de 1,8 vezes e o C de 2 vezes. Com base nos resultados do teste LSD, pontos significativamente diferentes ($P < 0,05$) do pico são indicados por ○ e os diferentes do vale por *.

3.2.3 – Expressão em cabeça de fêmea de *Culex quinquefasciatus*

A expressão de *period* em cabeça de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* mantidas em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro encontra-se ilustrada na Figura 3.18A, e em regime de escuro constante na Figura 3.18B. A análise de variância (ANOVA) indicou diferença altamente significativa da expressão entre os ZT na Figura 3.18A ($F_{11,12}= 179,683$; $P < 0,001$) e entre os CTs na Figura 3.18B ($F_{11,12}= 51,981$; $P < 0,001$), sendo o perfil de ciclagem da abundância da expressão gênica em cada condição evidenciada por cada os gráficos, que sugerem amplitude de mais de 50 vezes entre pico e vale em ambos. Teste LSD comprovou ser a diferença entre pico e vale altamente significativa nos dois gráficos ($P < 0,001$). Na Figura 3.18A, o valor mais baixo foi registrado no ZT 5, seguido do ZT 7 com valor praticamente idêntico, e o mais alto registrado no ZT 17. O teste LSD apontou ainda os ZTs 1 a 11, 21 e 23 como significativamente diferentes do pico e ZTs 1, 3 e 9 a 23 com significativamente diferentes do vale ($P < 0,05$). Na Figura 3.18B, o valor mais baixo foi registrado no CT 7 e mais alto no CT 17. Teste LSD indicou os CTs 1 a 11, 21 e 23 como significativamente diferentes do pico e CTs 1, 3 e 9 a 23 como significativamente diferentes do vale ($P < 0,05$).

A Figura 3.19 ilustra o resultado da expressão de *timeless*, em intervalo de 24 horas, em cabeça de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, em regime de claro/escuro (Figura 3.19A) e escuro constante (Figura 3.19B). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa tanto entre ZTs, no gráfico A ($F_{11,12}= 8,397$; $P < 0,001$), quanto entre CTs, no gráfico B ($F_{11,12}= 58,379$; $P < 0,001$), e teste de comparação LSD demonstrou diferenças altamente significativas entre pico e vale em ambos os gráficos ($P < 0,001$). Na Figura 3.19A, o pico recai sobre o ZT 17 que, também de acordo com o teste LSD, é significativamente diferente dos ZTs 1 a 3 ($P < 0,05$). O vale recai sobre o ZT 3, que é significativamente diferente dos ZTs 9 a 11. A amplitude de abundância da expressão gênica neste gráfico fica em torno de 8 vezes. Na Figura 3.19B, o CT 15 configura o pico e é significativamente diferente dos CTs 1 a 13 e 19 a 23, enquanto o vale localiza-se no CT 5 e é significativamente diferente dos CTs 1 e 9 a 23 ($P < 0,05$). A amplitude de abundância da expressão gênica neste gráfico fica em torno de 10 vezes.

As Figuras 3.20A e 3.20B ilustram os resultados da expressão de *cycle* em intervalo de 24 horas, respectivamente em regime de claro/escuro e escuro constante. A análise de variância (ANOVA) indicou diferença altamente significativa tanto entre ZTs, no gráfico A ($F_{11,12}= 15,218$; $P < 0,001$), quanto entre CTs, no gráfico B ($F_{11,12}= 23,649$; $P < 0,001$). Teste

LSD demonstrou que a diferença entre pico e vale em ambos os gráficos também é altamente significativa ($P < 0,001$). O mesmo teste indica ainda que na Figura 3.20A os ZTs 5 a 23 são significativamente diferentes do pico, que recai sobre o ZT 1, e os ZTs 1 a 3 e 15 a 23 significativamente diferentes do vale, no ZT 11 ($P < 0,05$). Na Figura 3.20B o pico encontra-se no CT 3 e é significativamente diferente dos CTs 9 a 19, enquanto o vale, no CT 13, é significativamente diferente dos CTs 1 a 11 e 17 a 23 ($P < 0,05$). A amplitude de abundância da expressão gênica nos gráficos da Figura 3.20 ficaram entre 16 vezes no gráfico A e 9 vezes no gráfico B.

Os resultados da expressão de *Clock* em cabeça de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* mantidas em regime de claro/escuro e escuro constante estão representados nas Figuras 3.21A e 3.21B, respectivamente. A análise de variância (ANOVA) indicou diferença não significativa tanto entre ZTs, no gráfico A ($F_{11,12} = 1,823$; $P = 0,158$), quanto entre CTs, no gráfico B ($F_{10,11} = 2,615$; $P = 0,065$). Apesar de não ser adequado para amostras com resultados não significativos na análise de variância, o teste LSD foi feito a título ilustrativo e apontou diferenças altamente significativas entre pico e vale em ambos os gráficos (gráfico A: $P = 0,013$; gráfico B: $P < 0,002$). O mesmo teste indica que, na Figura 3.21A, os ZTs 9 a 15 seriam significativamente diferentes do pico, no ZT 1, e que os ZTs 1 e 23 diferentes do vale, no ZT 11 ($P < 0,05$). Na Figura 3.21B, os CTs 9 a 11 aparecem com significativamente diferentes do pico, no CT 21, e os CTs 1 a 5, 15, 17, 21 e 23 como significativamente diferentes do vale, no CT 11 ($P < 0,05$). Pela diferença registrada entre pico e vale nos gráficos da Figura 3.21, é sugerida amplitude de abundância da expressão de *Clock* na faixa de duas vezes na Figura 3.21A e de três na Figura 3.21B.

Expressão de *period* em cabeça de fêmeas de *Culex quinquefasciatus*

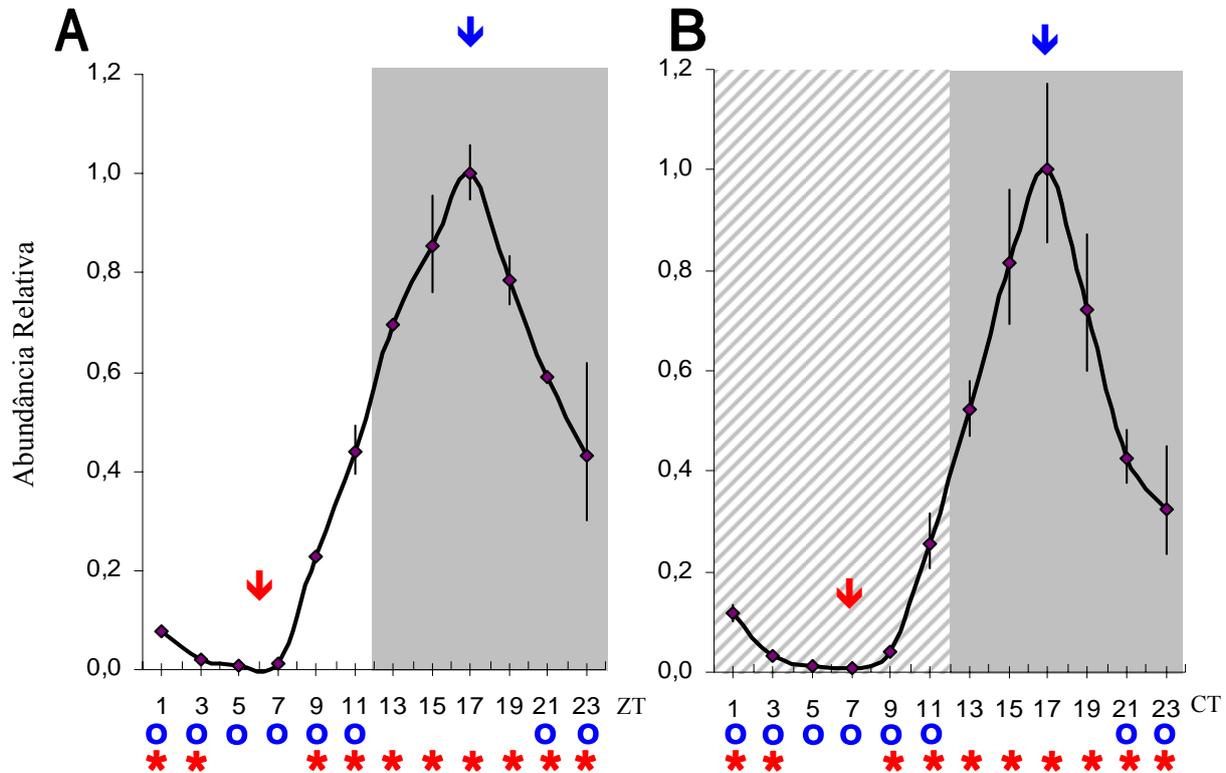


Figura 3.18: Expressão de *period* em cabeça de fêmeas de *Culex quinquefasciatus*. A) Expressão em regime de 12 horas de luz (fundo branco) e 12 horas de escuro (fundo cinza). O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT). O ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, sendo a transição da luz abrupta. B) Expressão em regime de escuro constante; o eixo das abscissas indica o *Circadian Time* (CT) e o fundo em padrão de listras representa o “dia subjetivo” (vide material e métodos), enquanto o fundo cinza representa a “noite subjetiva”. Os gráficos mostram os valores de abundância relativa (eixo das ordenadas) da expressão gênica baseados na média entre dois experimentos independentes, e as barras verticais representam uma faixa de variação de valores baseados no erro padrão da média. O eixo das ordenadas está padronizado para valor máximo de 1,2. A análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa tanto entre ZTs, no gráfico A ($F_{11,12}= 179,683$; $P < 0,001$), quanto entre CTs, no gráfico B ($F_{11,12}= 51,981$; $P < 0,001$). Os gráficos sugerem oscilação da abundância de expressão gênica na ordem de mais de 50 vezes. O pico de cada gráfico é apontado por ↓ e o vale por ↓, e o teste LSD demonstrou que a diferença entre esses pontos em ambos os gráficos também é altamente significativa ($P < 0,001$). Com base nos resultados do teste LSD, pontos significativamente diferentes ($P < 0,05$) do pico são indicados por ○ e os diferentes do vale por *.

Expressão de *timeless* em cabeça de fêmeas de *Culex quinquefasciatus*

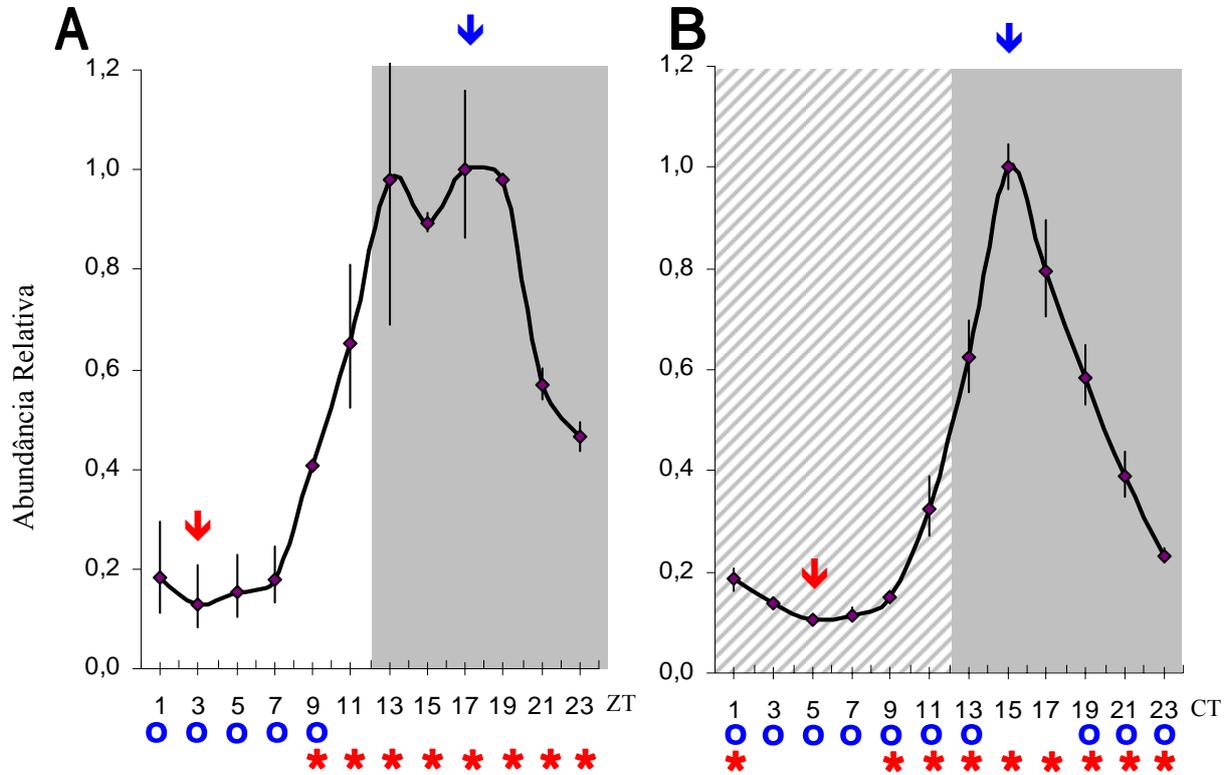


Figura 3.19: Expressão de *timeless* em cabeça de fêmeas de *Culex quinquefasciatus*. A) Expressão em regime de 12 horas de luz (fundo branco) e 12 horas de escuro (fundo cinza). O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT). O ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, sendo a transição da luz abrupta. B) Expressão em regime de escuro constante; o eixo das abscissas indica o *Circadian Time* (CT) e o fundo em padrão de listras representa o “dia subjetivo” (vide material e métodos), enquanto o fundo cinza representa a “noite subjetiva”. Os gráficos mostram os valores de abundância relativa (eixo das ordenadas) da expressão gênica baseados na média entre dois experimentos independentes, e as barras verticais representam uma faixa de variação de valores baseados no erro padrão da média. O eixo das ordenadas está padronizado para valor máximo de 1,2 (parte da barra de erro do ZT 13 do gráfico A foi cortada em função da padronização). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa tanto entre ZTs, no gráfico A ($F_{11,12}=8,397$; $P < 0,001$), quanto entre CTs, no gráfico B ($F_{11,12}=58,379$; $P < 0,001$). O gráfico A sugere oscilação da abundância de expressão gênica na ordem de 8 vezes, e o gráfico B de 10 vezes. O pico de cada gráfico é apontado por ↓ e o vale por ↓, e teste de comparação LSD demonstrou que a diferença entre esses pontos em ambos os gráficos também é altamente significativa ($P < 0,001$). Com base nos resultados do teste LSD, pontos significativamente diferentes ($P < 0,05$) do pico são indicados por ○ e os diferentes do vale por *.

Expressão de *cycle* em cabeça de fêmeas de *Culex quinquefasciatus*

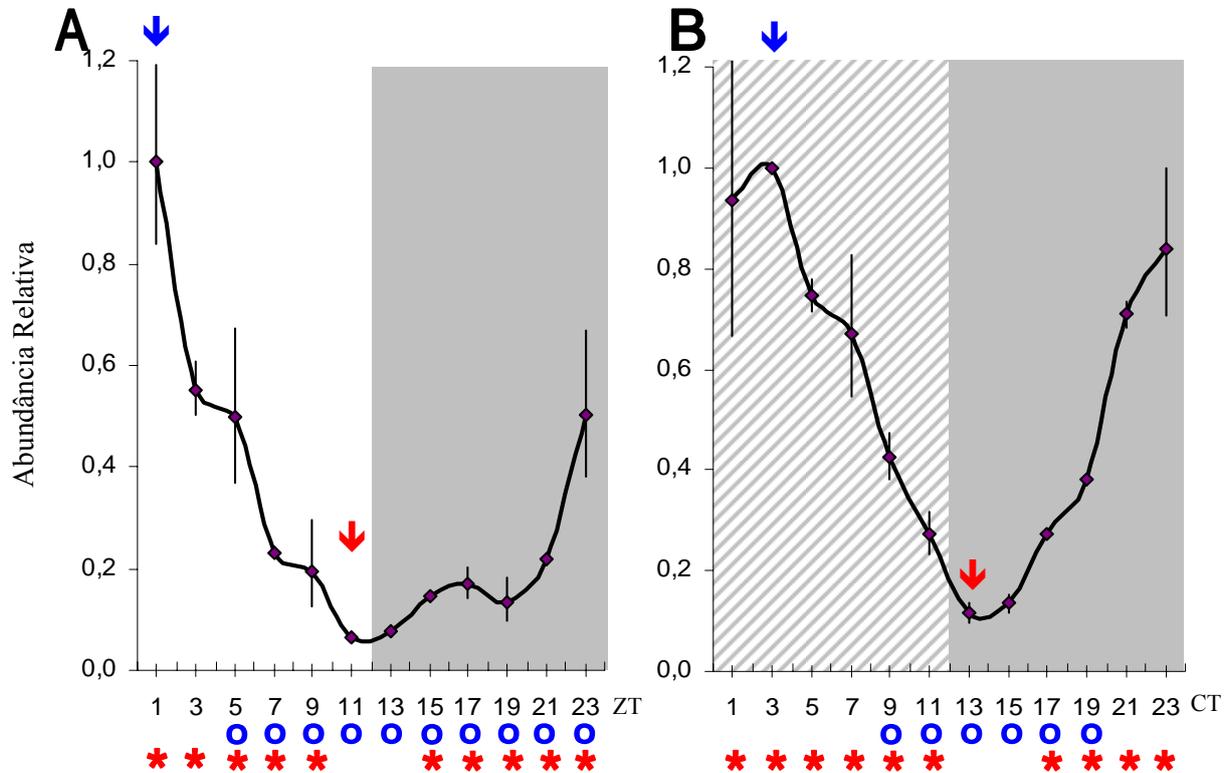


Figura 3.20: Expressão de *cycle* em cabeça de fêmeas de *Culex quinquefasciatus*. A) Expressão em regime de 12 horas de luz (fundo branco) e 12 horas de escuro (fundo cinza). O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT). O ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, sendo a transição da luz abrupta. B) Expressão em regime de escuro constante; o eixo das abscissas indica o *Circadian Time* (CT) e o fundo em padrão de listras representa o “dia subjetivo” (vide material e métodos), enquanto o fundo cinza representa a “noite subjetiva”. Os gráficos mostram os valores de abundância relativa (eixo das ordenadas) da expressão gênica baseados na média entre dois experimentos independentes, e as barras verticais representam uma faixa de variação de valores baseados no erro padrão da média. O eixo das ordenadas está padronizado para valor máximo de 1,2 (parte da barra de erro do primeiro ponto de cada gráfico foi cortada em função da padronização). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa tanto entre ZTs, no gráfico A ($F_{11,12} = 15,218$; $P < 0,001$), quanto entre CTs, no gráfico B ($F_{11,12} = 23,649$; $P < 0,001$). O pico de cada gráfico é apontado por ↓ e o vale por ↓, e teste de comparação LSD demonstrou que a diferença entre esses pontos em ambos os gráficos também é altamente significativa ($P < 0,001$). O gráfico A sugere oscilação da abundância de expressão gênica na ordem de 16 vezes, e o gráfico B de 9 vezes. Com base nos resultados do teste LSD, pontos significativamente diferentes ($P < 0,05$) do pico são indicados por ○ e os diferentes do vale por *.

Expressão de *Clock* em cabeça de fêmeas de *Culex quinquefasciatus*

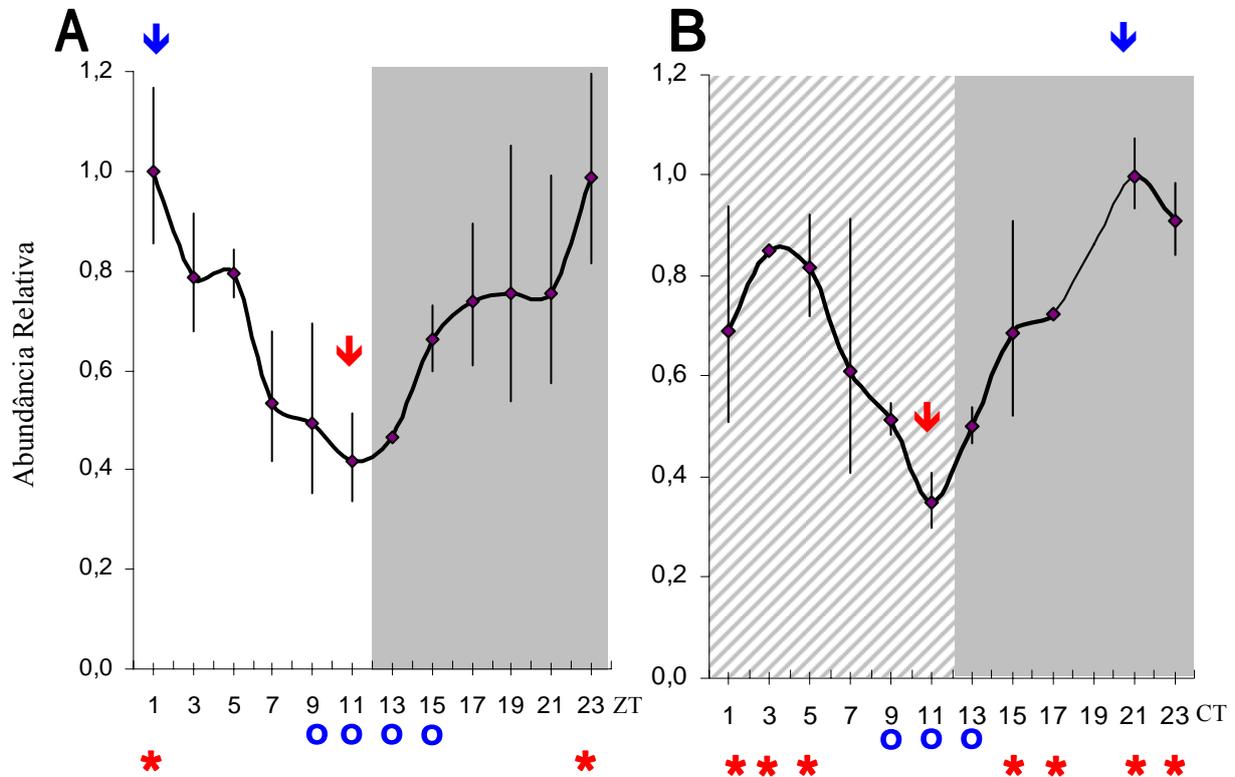


Figura 3.21: Expressão de *Clock* em cabeça de fêmeas de *Culex quinquefasciatus*. A) Expressão em regime de 12 horas de luz (fundo branco) e 12 horas de escuro (fundo cinza). O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT). O ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, sendo a transição da luz abrupta. B) Expressão em regime de escuro constante; o eixo das abscissas indica o *Circadian Time* (CT) e o fundo em padrão de listras representa o “dia subjetivo” (vide material e métodos), enquanto o fundo cinza representa a “noite subjetiva”. Os gráficos mostram os valores de abundância relativa (eixo das ordenadas) da expressão gênica baseados na média entre dois experimentos independentes, e as barras verticais representam uma faixa de variação de valores baseados no erro padrão da média. O eixo das ordenadas está padronizado para valor máximo de 1,2. Houve problema técnico na leitura do CT19 e este ponto foi interpolado no gráfico (linha mais fina). A análise de variância (ANOVA) indicou diferença não significativa tanto entre ZTs, no gráfico A ($F_{11,12} = 1,823$; $P = 0,158$), quanto entre CTs, no gráfico B ($F_{10,11} = 2,615$; $P = 0,065$). O pico de cada gráfico é apontado por ↓ e o vale por ↓, e o teste LSD demonstrou que a diferença entre esses pontos em ambos os gráficos é significativa (gráfico A: $P = 0,013$; gráfico B: $P < 0,002$). O gráfico A sugere oscilação da abundância de expressão gênica na ordem de 2 vezes, e o gráfico B de 3 vezes. Com base nos resultados do teste LSD, pontos significativamente diferentes ($P < 0,05$) do pico são indicados por O e os diferentes do vale por *. Apesar de, a rigor, o cálculo de LSD não ser aplicável em dados cuja análise de variância não apresentou diferenças significativas, como as representadas nos gráficos A e B, os pontos são indicados com caráter ilustrativo.

3.2.4 – Correlação intra e inter específica da expressão dos genes de relógio

Análises de correlação de *Spearman* foram realizadas com os resultados expostos nos itens 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3 com o objetivo de comparar as curvas de expressão gênica em várias combinações possíveis. Os resultados de tais cálculos encontram-se listados nas Tabelas 3.1 a 3.6. A primeira categoria de correlações envolve comparações entre os genes de relógio dentro de um mesmo grupo de amostras, e estão listadas nas tabelas 3.1 a 3.5. Na Tabela 3.1 encontram-se as correlações entre as curvas de expressão gênica dos genes de relógio *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em cabeças de *Ae. aegypti*, em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, e indicam correlação significativa e negativa entre a curva de expressão do gene *cycle* e *period* ($(r_s)_{12} = -0,622$; $P = 0,031$), assim como entre *cycle* e *timeless* ($(r_s)_{12} = -0,657$; $P = 0,020$). Entre *cycle* e *Clock* foi encontrada correlação significativa e positiva ($(r_s)_{12} = 0,811$; $P = 0,001$).

Os coeficientes de correlação entre esses genes em cabeça de *Ae. aegypti* em regime de escuro constante encontram-se na Tabela 3.2, e foram significativos positivamente entre *period* e *timeless* ($(r_s)_{12} = 0,902$; $P < 0,001$) e entre *cycle* e *Clock* ($(r_s)_{12} = 0,650$; $P = 0,022$). Correlação negativa um pouco acima do limite de significância foi encontrada entre *timeless* e *cycle* ($(r_s)_{12} = -0,502$; $P = 0,096$).

As mesmas comparações foram feitas entre a expressão dos genes de relógio em corpo de fêmeas de *Ae. aegypti* mantidas em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro (Tabela 3.3), e foi encontrada correlação positiva altamente significativa entre *period* e *cycle* ($(r_s)_{12} = 0,895$; $P < 0,001$) e positiva um pouco além do limite de significância entre *timeless* e *Clock* ($(r_s)_{12} = 0,517$; $P = 0,085$).

Para *Cx. quinquefasciatus* também foram feitos cálculos de correlação entre a expressão dos genes de relógio em cabeça de fêmeas mantidas em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, expostos na Tabela 3.4, onde valores positivos altamente significativos foram encontrados entre *period* e *timeless* ($(r_s)_{12} = 0,949$; $P < 0,001$) e entre *cycle* e *Clock* ($(r_s)_{12} = 0,813$; $P = 0,001$). Correlação negativa significativa foi encontrada quando comparados os genes *period* e *cycle* ($(r_s)_{12} = -0,671$; $P = 0,017$) e *timeless* e *cycle* ($(r_s)_{12} = -0,774$; $P = 0,003$).

Os coeficientes de correlação dessas mesmas comparações feitas em resultados de expressão de genes de relógio em cabeça de *Cx. quinquefasciatus* mantidos em escuro constante estão listados na Tabela 3.5, onde vê-se valores positivos significativos entre *period*

e *timeless* ($(r_s)_{12} = 0,972$; $P < 0,001$) e entre *cycle* e *Clock* ($(r_s)_{11} = 0,665$; $P = 0,026$). Coeficiente negativo significativo foi encontrado para *cycle* e *period* ($(r_s)_{12} = -0,623$; $P = 0,030$) e *cycle* e *timeless* ($(r_s)_{12} = -0,722$; $P = 0,008$).

A segunda categoria de correlações envolve comparações das curvas de expressão dos genes de relógio gene a gene entre diferentes tipos de amostra, e encontram-se listadas na Tabela 3.6. Quando comparadas às amostras de *Ae. aegypti* em regime de claro/escuro com aquelas em escuro constante, foram encontradas correlações positivas altamente significativas para *period* ($(r_s)_{12} = 0,986$; $P < 0,001$) e *cycle* ($(r_s)_{12} = 0,874$; $P < 0,001$), e para *Clock* o valor ficou no limite de significância ($(r_s)_{12} = 0,559$; $P = 0,059$). A mesma comparação para *Cx. quinquefasciatus* (regime de claro/escuro com regime de escuro constante) indicou valores de correlação positiva altamente significativa para todos os quatro genes de relógio analisados (*period*: $(r_s)_{12} = 0,979$; $P < 0,001$, *timeless*: $(r_s)_{12} = 0,921$; $P < 0,001$, *cycle*: $(r_s)_{12} = 0,925$; $P < 0,001$, *Clock*: $(r_s)_{11} = 0,800$; $P = 0,003$).

Para *Ae. aegypti* ainda foram feitas comparações da expressão dos genes de relógio entre cabeça e corpo, sendo positivas e significativas apenas as correlações entre *period* ($(r_s)_{12} = 0,909$; $P < 0,001$) e *cycle* ($(r_s)_{12} = 0,615$; $P = 0,033$).

Comparações da expressão gênica inter-específica (entre *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*) foram feitas para mosquitos mantidos em regime de claro/escuro, sendo altamente significativas e positivas as correlações entre *period* ($(r_s)_{12} = 0,965$; $P < 0,001$), *cycle* ($(r_s)_{12} = 0,951$; $P < 0,001$) e *Clock* ($(r_s)_{12} = 0,827$; $P = 0,001$). As mesmas comparações em mosquitos mantidos em regime de escuro constante indicaram correlação positiva altamente significativa para todos os quatro genes de relógio analisados (*period*: $(r_s)_{12} = 0,986$; $P < 0,001$, *timeless*: $(r_s)_{12} = 0,944$; $P < 0,001$, *cycle*: $(r_s)_{12} = 0,956$; $P < 0,001$ e *Clock*: $(r_s)_{11} = 0,682$; $P = 0,021$).

Tabela 3.1: Coeficientes de correlação de *Spearman* (r_s) entre expressão dos genes de relógio *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em cabeças de *Aedes aegypti*, em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

<i>Ae. aegypti</i> cabeças - claro/escuro	<i>timeless</i>	<i>cycle</i>	<i>Clock</i>
<i>period</i>	$(r_s)_{12} = 0,217$ ($P = 0,499$)	$(r_s)_{12} = -0,622$ ($P = 0,031$)	$(r_s)_{12} = -0,343$ ($P = 0,276$)
<i>timeless</i>		$(r_s)_{12} = -0,657$ ($P = 0,020$)	$(r_s)_{12} = -0,517$ ($P = 0,085$)
<i>cycle</i>			$(r_s)_{12} = 0,811$ ($P = 0,001$)

Tabela 3.2: Coeficientes de correlação de *Spearman* (r_s) entre expressão dos genes de relógio *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em cabeças de *Aedes aegypti*, em regime de escuro constante.

<i>Ae. aegypti</i> cabeças - escuro constante	<i>timeless</i>	<i>cycle</i>	<i>Clock</i>
<i>period</i>	$(r_s)_{12} = 0,902$ ($P < 0,001$)	$(r_s)_{12} = -0,406$ ($P = 0,191$)	$(r_s)_{12} = 0,133$ ($P = 0,681$)
<i>timeless</i>		$(r_s)_{12} = -0,502$ ($P = 0,096$)	$(r_s)_{12} = -0,004$ ($P = 0,991$)
<i>cycle</i>			$(r_s)_{12} = 0,650$ ($P = 0,022$)

Tabela 3.3: Coeficientes de correlação de *Spearman* (r_s) entre expressão dos genes de relógio *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em corpos de *Aedes aegypti*, em regime 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

<i>Ae. aegypti</i> corpos - claro/escuro	<i>timeless</i>	<i>cycle</i>	<i>Clock</i>
<i>period</i>	$(r_s)_{12} = 0,343$ ($P = 0,276$)	$(r_s)_{12} = -0,895$ ($P < 0,001$)	$(r_s)_{12} = 0,231$ ($P = 0,471$)
<i>timeless</i>		$(r_s)_{12} = 0,147$ ($P = 0,649$)	$(r_s)_{12} = 0,517$ ($P = 0,085$)
<i>cycle</i>			$(r_s)_{12} = 0,301$ ($P = 0,342$)

Tabela 3.4: Coeficientes de correlação de *Spearman* (r_s) entre expressão dos genes de relógio *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em cabeças de *Culex quinquefasciatus*, em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

<i>Cx. quinquefasciatus</i> cabeças - claro/escuro	<i>timeless</i>	<i>cycle</i>	<i>Clock</i>
<i>period</i>	$(r_s)_{12} = 0,949$ ($P < 0,001$)	$(r_s)_{12} = -0,671$ ($P = 0,017$)	$(r_s)_{12} = -0,322$ ($P = 0,307$)
<i>timeless</i>		$(r_s)_{12} = -0,774$ ($P = 0,003$)	$(r_s)_{12} = -0,419$ ($P = 0,175$)
<i>cycle</i>			$(r_s)_{12} = 0,813$ ($P = 0,001$)

Tabela 3.5: Coeficientes de correlação de *Spearman* (r_s) entre expressão dos genes de relógio *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em cabeças de *Culex quinquefasciatus*, em regime de escuro constante.

<i>Cx. quinquefasciatus</i> cabeças - escuro constante	<i>timeless</i>	<i>cycle</i>	<i>Clock</i> *
<i>period</i>	$(r_s)_{12} = 0,972$ ($P < 0,001$)	$(r_s)_{12} = -0,623$ ($P = 0,030$)	$(r_s)_{11} = 0,018$ ($P = 0,958$)
<i>timeless</i>		$(r_s)_{12} = -0,722$ ($P = 0,008$)	$(r_s)_{11} = -0,118$ ($P = 0,729$)
<i>cycle</i>			$(r_s)_{11} = 0,665$ ($P = 0,026$)

Tabela 3.6: Coeficientes de correlação de *Spearman* (r_s) para a comparação entre a expressão dos genes de relógio *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* e a expressão desses mesmos genes em duas amostras distintas, indicadas na primeira coluna.

	<i>period</i>	<i>timeless</i>	<i>cycle</i>	<i>Clock</i>
Expressão em cabeça de <i>Aedes aegypti</i> regime claro/escuro X escuro constante	$(r_s)_{12} = 0,986$ ($P < 0,001$)	$(r_s)_{12} = 0,337$ ($P = 0,284$)	$(r_s)_{12} = 0,874$ ($P < 0,001$)	$(r_s)_{12} = 0,559$ ($P = 0,059$)
Expressão em cabeça de <i>Culex quinquefasciatus</i> regime claro/escuro X escuro constante	$(r_s)_{12} = 0,979$ ($P < 0,001$)	$(r_s)_{12} = 0,921$ ($P < 0,001$)	$(r_s)_{12} = 0,925$ ($P < 0,001$)	$(r_s)_{11} = 0,800$ ($P = 0,003$)
Expressão em <i>Aedes aegypti</i> em regime claro/escuro cabeça X corpo	$(r_s)_{12} = 0,909$ ($P < 0,001$)	$(r_s)_{12} = 0,238$ ($P = 0,457$)	$(r_s)_{12} = 0,615$ ($P = 0,033$)	$(r_s)_{12} = -0,119$ ($P = 0,713$)
<i>Culex quinquefasciatus</i> X <i>Aedes aegypti</i> Expressão em cabeça em regime claro/escuro	$(r_s)_{12} = 0,965$ ($P < 0,001$)	$(r_s)_{12} = 0,445$ ($P = 0,147$)	$(r_s)_{12} = 0,951$ ($P < 0,001$)	$(r_s)_{12} = 0,827$ ($P = 0,001$)
<i>Culex quinquefasciatus</i> X <i>Aedes aegypti</i> Expressão em cabeça em regime de escuro constante	$(r_s)_{12} = 0,986$ ($P < 0,001$)	$(r_s)_{12} = 0,944$ ($P < 0,001$)	$(r_s)_{12} = 0,956$ ($P < 0,001$)	$(r_s)_{11} = 0,682$ ($P = 0,021$)

3.3 – Efeito da inseminação e alimentação sanguínea na expressão de genes de relógio em *Aedes aegypti*

A expressão de *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* foi investigada em cabeça e corpo de grupos de quatro categorias diferentes de fêmeas de *Ae. aegypti*, cada uma em um peculiar estado fisiológico: 1) virgens e não alimentadas com sangue, 2) inseminadas e não alimentadas com sangue, 3) virgens alimentadas com sangue e 4) inseminadas e alimentadas com sangue. Os resultados dessas análises referentes à expressão gênica na cabeça das fêmeas encontram-se ilustrados Figura 3.22, e os resultados referentes aos corpos na Figura 3.23. Cada figura apresenta um gráfico para cada gene, comparando a expressão do gene em questão entre as quatro categorias de fêmeas de *Ae. aegypti* nos diferentes estados fisiológicos. Cálculos de análise de variância (ANOVA) de dois fatores foram executados para avaliar o efeito da inseminação e da ingestão de sangue, bem como o efeito da interação entre essas duas variáveis, na expressão de cada gene analisado. Esses cálculos foram realizados independentemente para corpo e cabeça e os resultados encontram-se na legenda das respectivas figuras (Figuras 3.22 e 3.23).

Os resultados em cabeça de fêmeas de *Ae. aegypti* (Figura 3.22) não mostram efeito significativo da inseminação, isoladamente, na expressão de *period* ($F_{1,14}= 3,140$; $P= 0,098$), *timeless* ($F_{1,15}= 1,289$; $P= 0,274$), *cycle* ($F_{1,16}= 1,173$; $P= 0,295$) ou *Clock* ($F_{1,15}= 0,802$; $P= 0,385$). Entretanto, o efeito da alimentação foi significativo para *period* ($F_{1,14}= 15,637$; $P= 0,001$) e *cycle* ($F_{1,16}= 6,917$; $P= 0,018$), e ficou perto do limite de significância para *timeless* ($F_{1,15}= 3,901$; $P= 0,067$) e *Clock* ($F_{1,15}= 3,159$; $P= 0,096$). O efeito da interação entre inseminação e alimentação não foi significativo em nenhum dos genes: *period* ($F_{1,14}= 0,020$; $P= 0,888$), *timeless* ($F_{1,15}= 1,622$; $P= 0,222$), *cycle* ($F_{1,16}= 2,896$; $P= 0,108$) e *Clock* ($F_{1,15}= 0,115$; $P= 0,739$).

A Figura 3.23 expõe de forma equivalente os resultados obtidos nas amostras dos corpos das fêmeas. Neste caso, o efeito da inseminação também não foi significativo na expressão de nenhum dos quatro genes: *period* ($F_{1,15}= 1,554$; $P= 0,232$), *timeless* ($F_{1,16}= 1,162$; $P= 0,297$), *cycle* ($F_{1,16}= 1,090$; $P= 0,312$) e *Clock* ($F_{1,16}= 1,352$; $P= 0,262$). Contudo, o efeito da alimentação foi significativo para todos eles: *period* ($F_{1,15}= 36,353$; $P< 0,001$), *timeless* ($F_{1,16}= 8,562$; $P= 0,010$), *cycle* ($F_{1,16}= 6,635$; $P= 0,020$) e *Clock* ($F_{1,16}= 9,364$; $P= 0,007$). Assim como verificado para a expressão gênica na cabeça, o efeito da interação entre inseminação e alimentação na expressão dos genes de relógio no corpo das fêmeas também

não foi significativo para nenhum dos quatro genes (*period*: $F_{1,15} = 2,076$; $P < 0,170$; *timeless*: $F_{1,16} = 0,213$; $P = 0,650$; *cycle*: $F_{1,16} = 1,006$; $P = 0,331$; e *Clock*: $F_{1,16} = 0,085$; $P = 0,775$).

Expressão de *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em cabeça de fêmeas de *Aedes aegypti* virgens, inseminadas, alimentadas (sangue) e inseminadas e alimentadas (sangue)

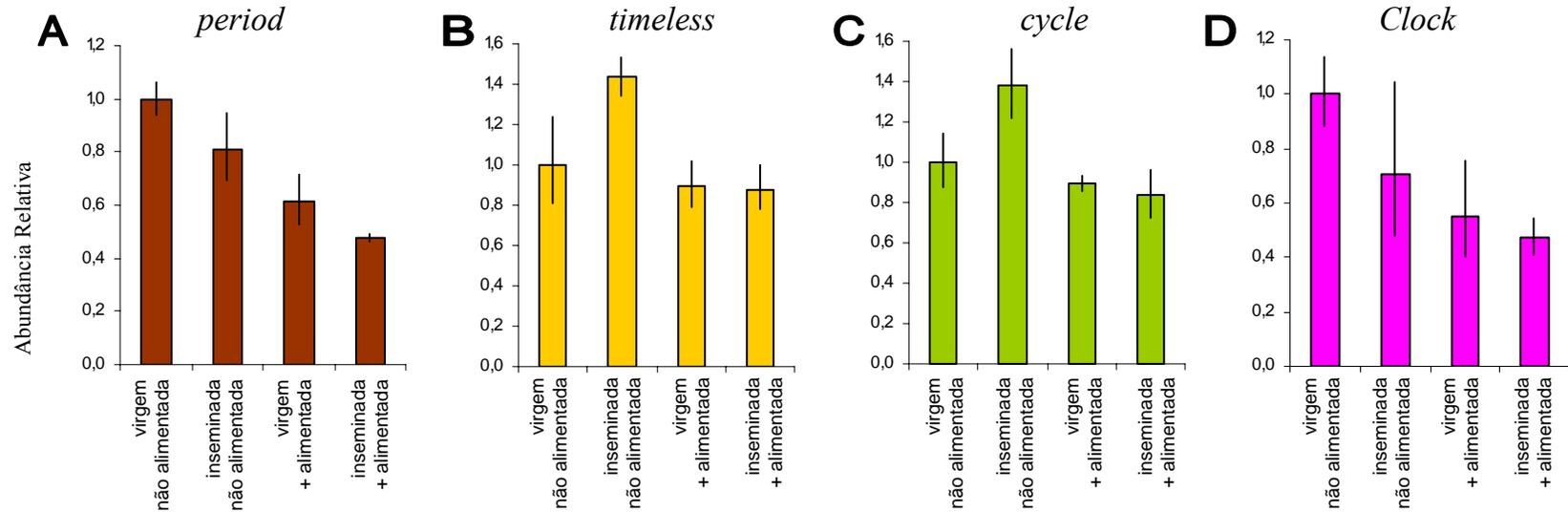


Figura 3.22: Expressão dos genes (A) *period*, (B) *timeless*, (C) *cycle* e (D) *Clock* em cabeça de fêmeas de *Aedes aegypti*. Os gráficos mostram os valores de abundância relativa (eixo das ordenadas) da expressão gênica de quatro categorias: fêmeas virgens (e não alimentadas com sangue), inseminadas (e não alimentadas com sangue), virgens alimentadas com sangue e inseminadas alimentadas com sangue, representadas nas quatro colunas de cada gráfico, e normalizados pela categoria “fêmeas virgens não alimentadas com sangue” (primeira barra de cada um dos gráficos). Os valores obtidos foram baseados na média entre cinco amostras de mosquitos para cada categoria, tendo sido em todas elas mantidos os insetos num regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, e coletados cerca de 30 horas após o repasto sangüíneo e meia hora antes do apagar das luzes. As barras verticais representam uma faixa de variação de valores baseados no erro padrão da média. Análises de variância (ANOVA) de dois fatores (inseminação e ingestão de sangue) indicam que o efeito da inseminação na expressão não foi significativo em nenhum dos quatro genes (A: $F_{1,14} = 3,140$; $P = 0,098$; B: $F_{1,15} = 1,289$; $P = 0,274$; C: $F_{1,16} = 1,173$; $P = 0,295$) e D: $F_{1,15} = 0,802$; $P = 0,385$), mas o da alimentação foi significativo no caso de *period* (A: $F_{1,14} = 15,637$; $P = 0,001$) e *cycle* (C: $F_{1,16} = 6,917$; $P = 0,018$), e ficou perto do limite de significância para *timeless* (B: $F_{1,15} = 3,901$; $P = 0,067$) e *Clock* (D: $F_{1,15} = 3,159$; $P = 0,096$). O efeito da interação entre inseminação e alimentação não foi significativo em nenhum dos genes (A: $F_{1,14} = 0,020$; $P = 0,888$; B: $F_{1,15} = 1,622$; $P = 0,222$; C: $F_{1,16} = 2,896$; $P = 0,108$; D: $F_{1,15} = 0,115$; $P = 0,739$).

Expressão de *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em corpos de fêmeas de *Aedes aegypti* virgens, inseminadas, alimentadas com sangue e inseminadas e alimentadas com sangue

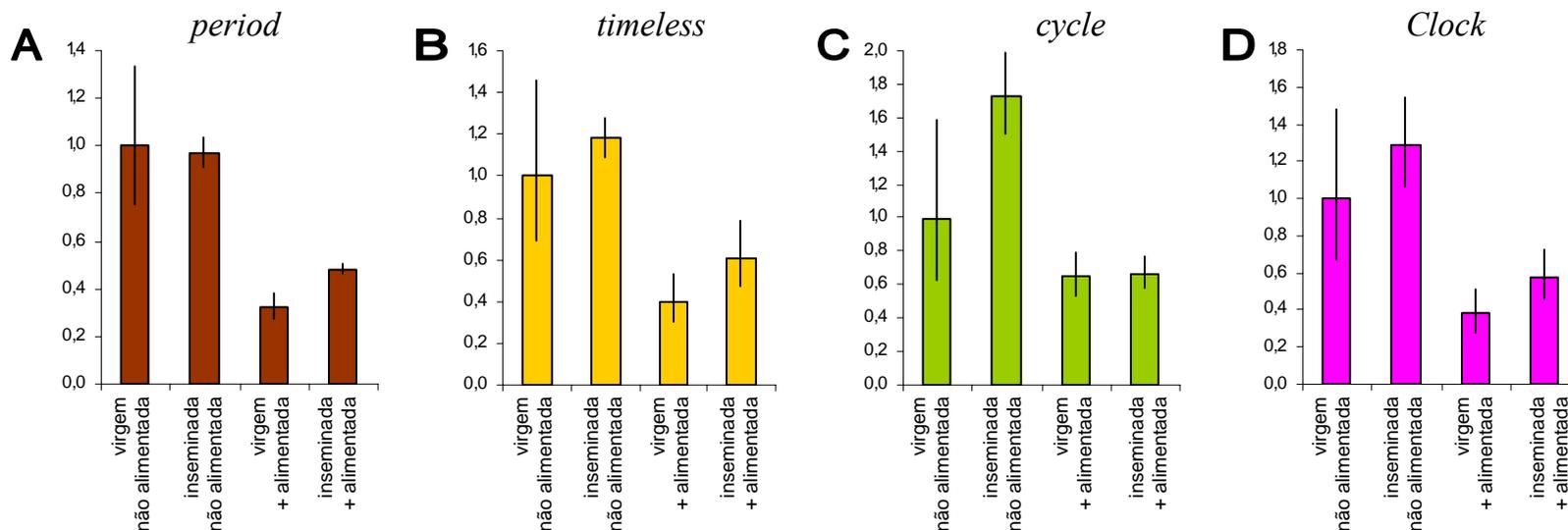


Figura 3.23: Expressão dos genes (A) *period*, (B) *timeless*, (C) *cycle* e (D) *Clock* em corpos de fêmeas de *Aedes aegypti*. Os gráficos mostram os valores de abundância relativa (eixo das ordenadas) da expressão gênica de quatro categorias: fêmeas virgens (e não alimentadas com sangue), inseminadas (e não alimentadas com sangue), virgens alimentadas com sangue e inseminadas alimentadas com sangue, representadas nas quatro colunas de cada gráfico, e normalizados pela categoria “fêmeas virgens não alimentadas com sangue” (primeira barra de cada um dos gráficos). Os valores obtidos foram baseados na média entre cinco amostras de mosquitos para cada categoria, tendo sido em todas elas mantidos os insetos num regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, e coletados cerca de 30 horas após o repasto sanguíneo e meia uma hora antes do apagar das luzes. As barras verticais representam uma faixa de variação de valores baseados no erro padrão da média. Análises de variância (ANOVA) de dois fatores (inseminação e ingestão de sangue) indicam que o efeito da inseminação na expressão não foi significativo em nenhum dos quatro genes (A: $F_{1,15} = 1,554$; $P = 0,232$; B: $F_{1,16} = 1,162$; $P = 0,297$; C: $F_{1,16} = 1,090$; $P = 0,312$; e D: $F_{1,16} = 1,352$; $P = 0,262$), mas que o da alimentação foi significativo para todos eles (A: $F_{1,15} = 36,353$; $P < 0,001$; B: $F_{1,16} = 8,562$; $P = 0,010$; C: $F_{1,16} = 6,635$; $P = 0,020$ e D: $F_{1,16} = 9,364$; $P = 0,007$). O efeito da interação entre inseminação e alimentação não foi significativo em nenhum dos genes (A: $F_{1,15} = 2,076$; $P < 0,170$; B: $F_{1,16} = 0,213$; $P = 0,650$; C: $F_{1,16} = 1,006$; $P = 0,331$; e D: $F_{1,16} = 0,085$; $P = 0,775$).

3.4 – RNA de interferência: Injeção de RNA dupla-fita de *timeless*

A técnica de RNA de interferência foi adotada na tentativa de proporcionar o silenciamento de genes de relógio em *Ae. aegypti*. Numa análise preliminar, foi realizada injeção de RNA dupla-fita de *timeless*, sendo investigados os efeitos no padrão de atividade/repouso dos mosquitos e na expressão do gene em tentativa de silenciamento. Os resultados foram sempre comparados com o grupo controle composto por indivíduos injetados com RNA dupla-fita do gene bacteriano *LacZ*.

3.4.1 – Expressão de *timeless* em cabeça e corpo de *Aedes aegypti* injetado com RNA dupla-fita de *timeless* e de *LacZ*

A capacidade de silenciamento da expressão de *timeless* por injeção de RNA dupla-fita deste gene em tórax de fêmeas de *Ae. aegypti* foi avaliada através de dois experimentos independentes de injeção. No primeiro, os insetos foram mantidos em regime de claro/escuro e no segundo de escuro constante. Em ambos foram analisadas amostras do terceiro e quarto dias após cada injeção e os resultados encontram-se expostos graficamente na Figura 3.24.

A significância dos resultados ilustrados na Figura 3.24 foi testada por análise de variância de quatro fatores, para avaliar o efeito de 1) material injetado (RNA dupla-fita de *LacZ* ou de *timeless*); 2) dia após a injeção (dia três ou quatro); 3) parte do corpo (cabeça ou corpo); 4) experimento de injeção (primeiro ou segundo) na expressão de *timeless*. Os resultados dessa análise estão listados na Tabela 3.7 e a interpretação combinada da Figura 3.24 e com esta tabela contribui com o melhor entendimento dos resultados. A Tabela 3.7A lista o efeito dos fatores um a um. Desta forma, observando os gráficos na Figura 3.24, podemos entender que o efeito geral na expressão de *timeless* dos dois diferentes RNA dupla-fita injetado foi significativamente diferente ($F_{1,58} = 11,796$; $P = 0,001$), ao considerarmos conjuntamente a expressão em corpos e cabeças dos dias três e quatro após a injeção dos dois experimentos. A análise dos demais fatores um a um apontou ainda para diferenças significativas na expressão de *timeless* entre os dias analisados ($F_{1,58} = 67,933$; $P < 0,001$), bem como entre cabeça e corpo ($F_{1,58} = 218,147$; $P < 0,001$), mas não houve diferença significativa na expressão de *timeless* entre as duas injeções ($F_{1,58} = 0,124$; $P = 0,726$).

A Tabela 3.7B trata dos resultados da análise de variância considerando os fatores aos pares. Sob essa abordagem, as duas únicas interações de fatores que exercem efeito

significativo na diferença da expressão de *timeless* foram o dia após a injeção e o material injetado ($F_{1,58} = 9,708$; $P = 0,003$) e o dia após a injeção e a parte do corpo analisada ($F_{1,58} = 8,226$; $P = 0,006$). Esses resultados comprovam que os efeitos evidenciados nas Figuras 3.24A e 3.24B de diferença na expressão de *timeless* entre mosquitos injetados com RNA dupla-fita de *LacZ* e de *timeless* nos dia três e quatro após a injeção são significativos, como são também as diferenças na expressão a cada dia entre cabeça e corpo.

A Tabela 3.7C lista os resultados da análise de variância ao considerar a interação dos fatores três a três, mas nenhum efeito significativo na expressão de *timeless* foi observado com essa abordagem. Tão pouco é significativo o efeito da interação dos quatro fatores na expressão de *timeless* ($F_{1,58} = 0,292$; $P = 0,591$), como mostrado na Tabela 3.7D.

Efeito da injeção de RNA dupla-fita de *timeless*
na expressão de *timeless*
em corpo e cabeça de fêmeas de *Aedes aegypti*

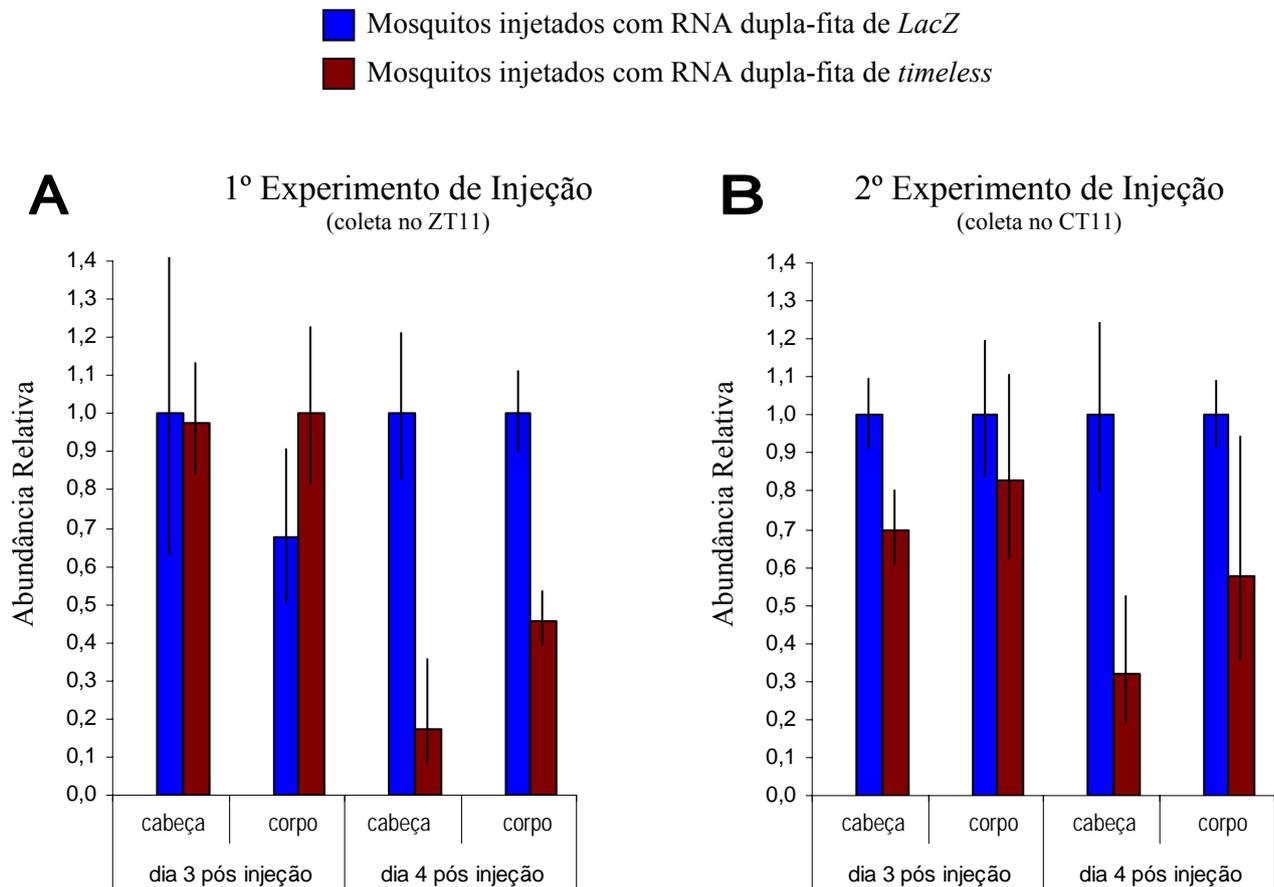


Figura 3.24: Resultado dos dois experimentos independentes de injeção de RNA dupla-fita em fêmeas adultas de *Aedes aegypti*. Os gráficos ilustram a quantificação relativa de *timeless* no grupo injetado com RNA dupla-fita de *timeless* (em vermelho-escuro) e no grupo controle, RNA dupla-fita de *LacZ* (em azul), em amostras coletadas no 3º e 4º dia após cada injeção. A expressão de *timeless* foi investigada separadamente em cabeça e corpo dessas amostras. (A) Primeiro experimento de injeção, no qual, após o dia da injeção, os mosquitos foram mantidos em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro (vide Figura 3.25A e 3.26A). (B) Segundo experimento de injeção, no qual, após o dia da injeção, os mosquitos foram mantidos em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro por dois dias e depois mantidos em escuro constante (vide Figura 3.25B e 3.26B). As amostras foram coletadas (A) em regime de claro/escuro, uma hora antes do apagar das luzes (ZT11 – vide material e métodos), e em (B) em regime de escuro constante, na 11ª hora do dia subjetivo (CT11 - vide material e métodos). Resultados dos testes estatísticos para os dados destes gráficos encontram-se na Tabela 3.7.

Tabela 3.7: Análise de variância de quatro fatores (ANOVA 4-ways) para os resultados de análise da expressão de *timeless* ilustrados na figura 3.24. Foram testados os efeitos de 1) RNA dupla-fita injetado (de *LacZ* ou de *timeless*), 2) o dia após a injeção (dia 3 ou 4), 3) parte do corpo (cabeça ou corpo, onde “corpo” considera-se tudo menos a cabeça) e 4) Injeção (1ª ou 2ª injeção). (A) Análise de variância do efeito de cada fator, um a um, na expressão de *timeless*. (B) Análise de variância do efeito dos fatores, considerando a interação entre eles par a par, na expressão de *timeless*. (C) Análise de variância do efeito dos fatores, considerando a interação entre eles três a três, na expressão de *timeless*. (D) Análise de variância do efeito da interação dos quatro fatores na expressão de *timeless*.

		Fator	
A	Efeito dos Fatores um a um	RNA dupla-fita injetado (<i>LacZ</i> ou <i>tim</i>)	$F_{1,58} = 11,796$ ($P = 0,001$)
		Dia após injeção (dia 3 ou 4)	$F_{1,58} = 67,933$ ($P < 0,001$)
		Parte do corpo (cabeça ou corpo)	$F_{1,58} = 218,147$ ($P < 0,001$)
		Injeção (1ª ou 2ª injeção)	$F_{1,58} = 0,124$ ($P = 0,726$)
B	Efeito da interação entre dois fatores	- RNA dupla-fita injetado (<i>LacZ</i> ou <i>tim</i>) - Dia após injeção (dia 3 ou 4)	$F_{1,58} = 9,708$ ($P = 0,003$)
		- RNA dupla-fita injetado (<i>LacZ</i> ou <i>tim</i>) - Parte do corpo (cabeça ou corpo)	$F_{1,58} = 1,827$ ($P = 0,182$)
		- RNA dupla-fita injetado (<i>LacZ</i> ou <i>tim</i>) - Injeção (1ª ou 2ª injeção)	$F_{1,58} = 0,532$ ($P = 0,469$)
		- Dia após injeção (dia 3 ou 4) - Parte do corpo (cabeça ou corpo)	$F_{1,58} = 8,226$ ($P = 0,006$)
		- Dia após injeção (dia 3 ou 4) - Injeção (1ª ou 2ª injeção)	$F_{1,58} = 1,352$ ($P = 0,250$)
		- Parte do corpo (cabeça ou corpo) - Injeção (1ª ou 2ª injeção)	$F_{1,58} = 0,041$ ($P = 0,840$)
		C	Efeito da interação entre três fatores
- RNA dupla-fita injetado (<i>LacZ</i> ou <i>tim</i>) - Dia após injeção (dia 3 ou 4) - Injeção (1ª ou 2ª injeção)	$F_{1,58} = 0,958$ ($P = 0,332$)		
- RNA dupla-fita injetado (<i>LacZ</i> ou <i>tim</i>) - Parte do corpo (cabeça ou corpo) - Injeção (1ª ou 2ª injeção)	$F_{1,58} = 0,006$ ($P = 0,937$)		
- Dia após injeção (dia 3 ou 4) - Parte do corpo (cabeça ou corpo) - Injeção (1ª ou 2ª injeção)	$F_{1,58} = 0,702$ ($P = 0,406$)		

Continuação na próxima página

Tabela 3.7: Continuação

D	Efeito da interação entre os quatro fatores	
	- RNA dupla-fita injetado (<i>LacZ</i> ou <i>tim</i>)	$F_{1,58} = 0,292$ ($P = 0,591$)
	- Dia após injeção (dia 3 ou 4)	
	- Parte do corpo (cabeça ou corpo)	
- Injeção (1ª. ou 2ª. injeção)		

3.4.2 – Efeito no padrão de atividade/repouso

O padrão de atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* injetadas com RNA dupla-fita de *timeless* foi comparada com aquela de indivíduos injetados com RNA dupla-fita de *LacZ* nos dois experimentos independentes, o primeiro mantido em regime de claro/escuro (Figuras 3.25A e 3.26A) e o segundo em escuro constante (Figuras 3.25B e 3.26B).

A Figura 3.25A ilustra o resultado da atividade da primeira injeção em valores da média (média de Williams) entre o monitoramento individual dos mosquitos que chegaram vivos até o final do experimento, tendo sido em número de 30 tanto aqueles injetados com RNA dupla-fita de *timeless* como os injetados com RNA dupla-fita de *LacZ*. Nota-se perfil semelhante de atividade entre os dois grupos, destacando-se apenas um ligeiro aumento no quarto dia após a injeção da atividade do grupo injetado com dupla-fita de *timeless* em relação ao grupo injetado com RNA dupla-fita de *LacZ*.

A Figura 3.25B expõe os resultados do monitoramento da atividade/repouso dos indivíduos da segunda injeção, tendo chegados vivos até o final do experimento 30 indivíduos injetados com RNA dupla-fita de *timeless* e 27 injetados com RNA dupla-fita de *LacZ*. O padrão entre os dois grupos parece novamente muito similar, com exceção do quarto dia após a injeção (segundo dia em escuro constante), e talvez também no quinto, onde, desta vez, repara-se uma ligeira diminuição da atividade no grupo injetado com RNA dupla-fita de *timeless* em relação àquele injetado com RNA dupla-fita de *LacZ*.

Os mesmos resultados foram analisados em relação à proporção de indivíduos ativos a cada ponto de leitura de atividade e ainda sendo interpolados nos pontos de leitura da atividade imediatamente após cada transição de luz (acender ou apagar das luzes) e em seguida tratados com cálculo de média móvel de três valores, sendo evitada a mistura entre pontos de leitura em fase clara e fase escura (com isso, as médias móveis dos pontos adjacentes às transições de luz foram calculadas com dois pontos apenas). Os resultados do monitoramento da atividade mediante esses tratamentos encontram-se expostos na Figura 3.26A, no caso do experimento mantido em regime de claro/escuro por sete dias, e na Figura 3.26B para o experimento mantido em escuro constante nos cinco últimos dias do monitoramento. Na Figura 3.26A, percebe-se mais uma vez o aumento da atividade do grupo injetado com RNA dupla-fita de *timeless* em relação ao injetado com RNA dupla-fita de *LacZ* no quarto dia após a injeção, enquanto na Figura 3.26B o efeito de diminuição da mesma também no quarto dia após a injeção, que parece repetir-se no quinto dia.

Análise estatística de variância de dois fatores (ANOVA 2-ways) foi aplicada para avaliar o efeito do material injetado e do experimento de injeção no padrão de atividade dos mosquitos. O teste foi executado com base nos dados da quantidade de atividade de cada indivíduo (geradores das Figuras 3.25A e 3.25B), porém considerando o somatório da atividade dos registros de atividade (em valores do logaritmo na base dez do valor de leitura da atividade somado um) a cada dia para cada um dos indivíduos de cada grupo.

A Tabela 3.8 mostra os resultados da análise de variância quando considerados os dias 3 a 7 de cada injeção. Os dois primeiros dias foram excluídos por estarem, no caso da segunda injeção, ainda em regime de claro/escuro. É também aconselhável excluí-los em consideração a um período de recuperação dos mosquitos pós-trauma da injeção, e período de adaptação ao equipamento de monitoramento da atividade. Considerando apenas os dias 3 a 7 foi possível fazer uma análise de variância de dois fatores, testando o efeito do material injetado e o regime de fotoperíodo do monitoramento. Os resultados da análise apontam para uma diferença significativa na atividade dos mosquitos em relação ao regime de luz a que são submetidos ($F_{1,112}= 8,814$; $P= 0,004$) mas não em relação ao material injetado ($F_{1,112}= 0,295$; $P= 0,588$). Na interação dos dois fatores o efeito também não é significativo ($F_{1,112}= 1,059$; $P= 0,306$). Sendo assim, considerando esse período como um todo, não há efeito do material injetado na atividade dos mosquitos.

Entretanto, uma vez que a disposição visual dos gráficos 3.25 e 3.26 sugere efeito diferenciado na atividade no quarto e quinto dia, a análise de variância foi repetida para estes dias separadamente. A Tabela 3.9A exibe os resultados para a análise do quarto dia após a injeção, onde foram encontrados valores significativos na variância da atividade considerando a interação entre o efeito do material injetado e do regime de luz ($F_{1,112}= 5,176$; $P= 0,025$). Quando analisados separadamente, o efeito dos fatores foi significativo para o regime de luz ($F_{1,112}= 4,066$; $P= 0,046$) porém não significativo para o material injetado ($F_{1,112}= 0,040$; $P= 0,842$).

Apesar da sugestão visual do gráfico, o quinto dia após a injeção (Tabela 3.9B) não demonstrou variação significativa da atividade em relação ao efeito do material injetado, seja considerado isoladamente ($F_{1,112}= 0,043$; $P= 0,836$) ou na interação com o regime de luz ($F_{1,112}= 1,606$; $P= 0,208$). Foi significativo o apenas resultado do efeito do fotoperíodo separadamente ($F_{1,112}= 12,868$; $P< 0,001$).

Atividade locomotora de *Aedes aegypti* injetados com RNA dupla-fita (*LacZ* e *timeless*)

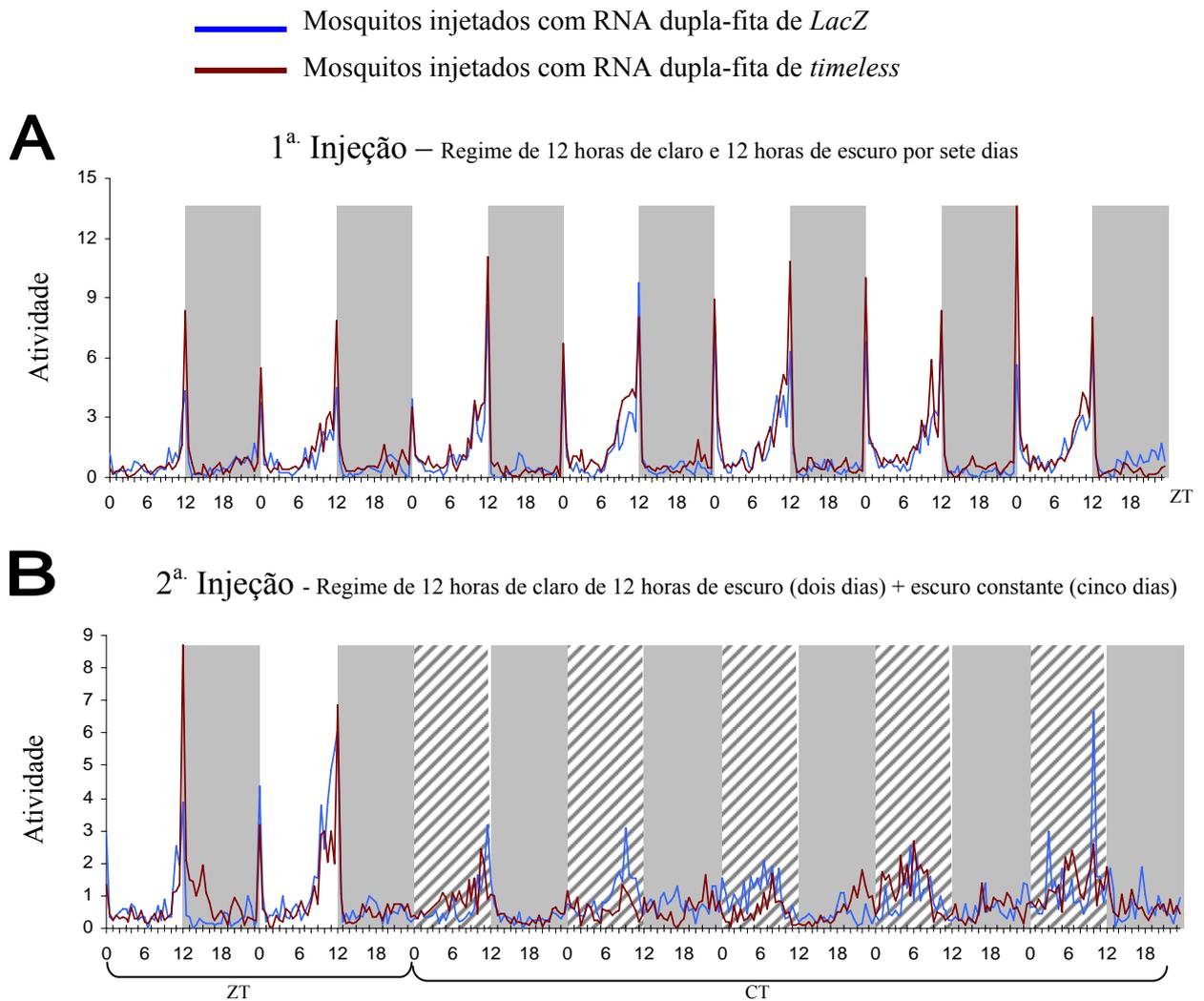


Figura 3.25: Atividade locomotora de *Aedes aegypti* monitorada ao longo de sete dias após a injeção com RNA dupla-fita de *LacZ* e com RNA dupla-fita de *timeless* em grupos independentes. (A) Indivíduos mantidos constantemente em regime de 12 horas de claro e 12 de escuro. (B) Indivíduos mantidos por dois dias em regime de 12 horas de claro e 12 de escuro e em seguida em escuro constante por cinco dias. O fundo branco indica a fase clara, o fundo cinza indica a fase escura (noite real ou subjetiva) e o fundo listrado o “dia subjetivo” (vide material e métodos). O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT) para os dias em regime de claro/escuro e o *Circadian Time* (CT) para os dias em regime de escuro constante. Nos dias em regime de claro/escuro, o ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, sendo a transição da luz abrupta. Os gráficos representam a média de atividade (média de Williams - eixo das ordenadas) entre os indivíduos para cada grupo (injetados com RNA dupla-fita de *LacZ* ou *timeless*), monitorados independentemente, tendo suas atividades registradas a cada 30 minutos.

Proporção de indivíduos ativos (*Aedes aegypti*) injetados com RNA dupla-fita (*LacZ* e *timeless*)

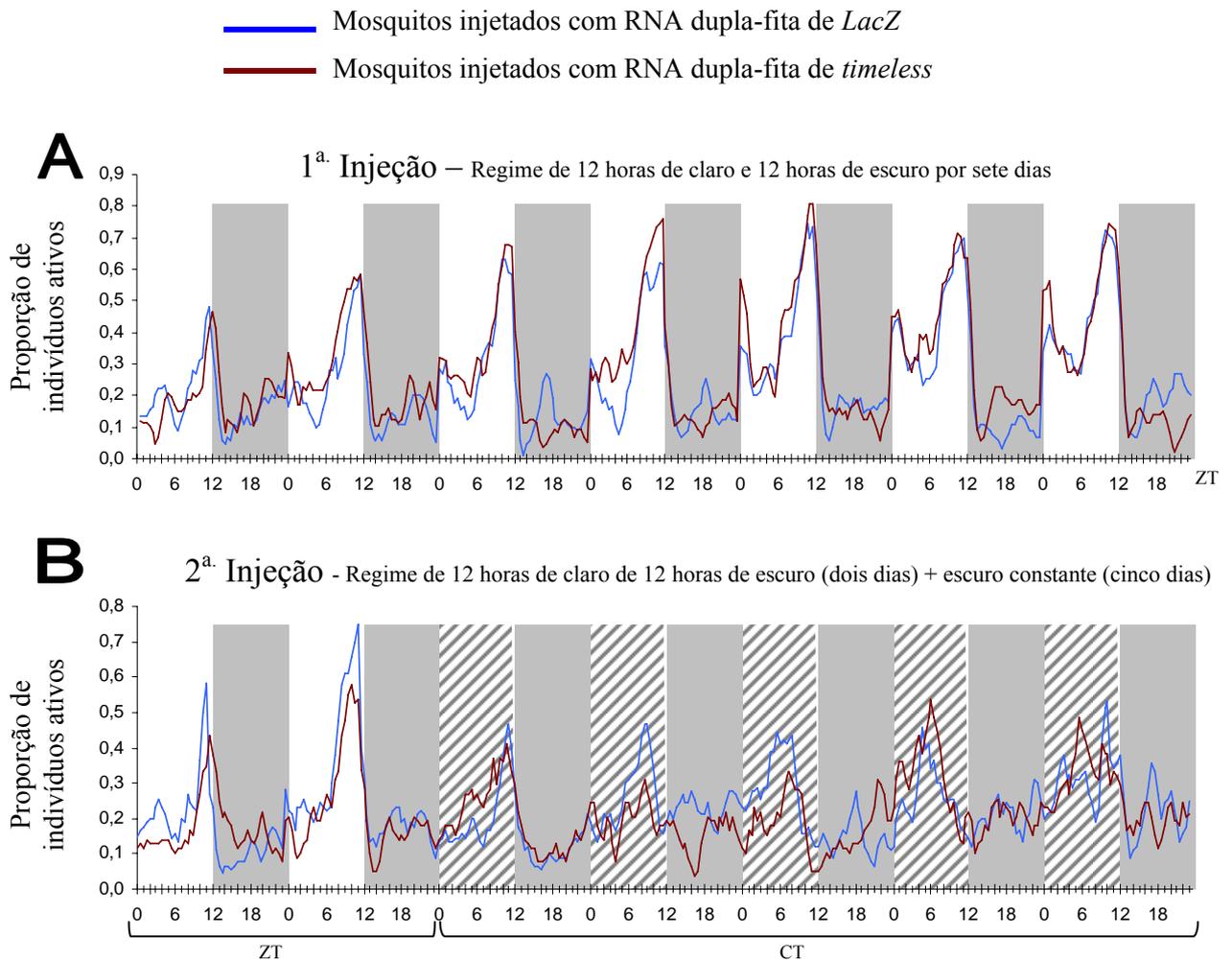


Figura 3.26: Proporção de indivíduos (*Aedes aegypti*) ativos ao longo de sete dias de monitoramento após a injeção com RNA dupla-fita de *LacZ* e com RNA dupla-fita de *timeless* em grupos independentes. (A) Indivíduos mantidos constantemente em regime de 12 horas de claro e 12 de escuro. (B) Indivíduos mantidos por dois dias em regime de 12 horas de claro e 12 de escuro e em seguida em escuro constante por cinco dias. O fundo branco indica a fase clara, o fundo cinza indica a fase escura (noite real ou subjetiva) e o fundo listrado o “dia subjetivo” (vide material e métodos). O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT) para os dias em regime de claro/escuro e o *Circadian Time* (CT) para os dias em regime de escuro constante. Nos dias em regime de claro/escuro, o ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, sendo a transição da luz abrupta. Os gráficos representam a proporção de indivíduos ativos (eixo das ordenadas) em cada grupo, tendo suas atividades registradas a cada 30 minutos. Os dados expressos nos gráficos sofreram dois tratamentos para diminuição de ruído: a) interpolação dos pontos de leitura de atividade logo após as transições de luz (acender ou apagar das luzes) e b) média móvel entre três pontos para cada valor de leitura de atividade, evitando, porém, a mistura entre um ponto de leitura em fase clara e um em fase escura (nesses casos, foi feita a média móvel para dois pontos apenas).

Tabela 3.8: Análise de variância de dois fatores (ANOVA 2-ways) da atividade locomotora de *Aedes aegypti* no período total entre o 3º e 7º dias após a injeção para o efeito do RNA dupla-fita injetado (de *LacZ* ou de *timeless*) e do regime do fotoperíodo (12 horas de luz e 12 horas de escuro ou escuro constante). O teste foi executado com base nos mesmos resultados geradores das Figuras 3.25A e 3.25B, porém considerando o somatório da atividade (em valores do logaritmo na base dez do valor de leitura da atividade somado um) a cada dia, para cada indivíduo de cada grupo.

Período total entre 3º e 7º dias após a injeção	
Fatores	
	- RNA dupla-fita injetado (<i>LacZ</i> ou <i>tim</i>) $F_{1,112} = 0,295$ ($P = 0,588$)
	- Regime do fotoperíodo (claro/escuro ou escuro constante) $F_{1,112} = 8,814$ ($P = 0,004$)
Interação entre fatores	- RNA dupla-fita injetado (<i>LacZ</i> ou <i>tim</i>) - Regime do fotoperíodo (claro/escuro ou escuro constante) $F_{1,112} = 1,059$ ($P = 0,306$)

Tabela 3.9: Análise de variância de dois fatores (ANOVA 2-ways) da atividade locomotora de *Aedes aegypti* (A) no 4º dia após a injeção e (B) 5º dia após a injeção, para o efeito do RNA dupla-fita injetado (de *LacZ* ou de *timeless*) e do regime do fotoperíodo (12 horas de luz e 12 horas de escuro ou escuro constante). O teste foi executado com base nos mesmos resultados geradores das Figuras 3.25A e 3.25B, porém considerando o somatório da atividade dos registros de atividade (em valores do logaritmo na base dez do valor de leitura da atividade somado um) a cada dia, para cada indivíduo de cada grupo.

4º dia após a injeção	
Fatores	
	- RNA dupla-fita injetado (<i>LacZ</i> ou <i>tim</i>) $F_{1,112} = 0,040$ ($P = 0,842$)
	- Regime do fotoperíodo (claro/escuro ou escuro constante) $F_{1,112} = 4,066$ ($P = 0,046$)
Interação entre fatores	- RNA dupla-fita injetado (<i>LacZ</i> ou <i>tim</i>) - Regime do fotoperíodo (claro/escuro ou escuro constante) $F_{1,112} = 5,176$ ($P = 0,025$)

5º dia após a injeção	
Fatores	
	- RNA dupla-fita injetado (<i>LacZ</i> ou <i>tim</i>) $F_{1,112} = 0,043$ ($P = 0,836$)
	- Regime do fotoperíodo (claro/escuro ou escuro constante) $F_{1,112} = 12,868$ ($P < 0,001$)
Interação entre fatores	- RNA dupla-fita injetado (<i>LacZ</i> ou <i>tim</i>) - Regime do fotoperíodo (claro/escuro ou escuro constante) $F_{1,112} = 1,606$ ($P = 0,208$)

3.4.3 – Período em livre-curso (τ) da atividade de *Aedes aegypti* injetado com RNA dupla-fita de *timeless* e *LacZ*

Os dados do monitoramento da atividade de *Ae. aegypti* injetados com RNA dupla-fita de *timeless* e RNA dupla-fita de *LacZ* foram aproveitados ainda para a determinação do período em livre-curso (τ) da atividade desses mosquitos através de cálculo de autocorrelação. No cálculo, foram considerados os valores percentuais de indivíduos ativos a cada ponto de registro de atividade, e tratados com média móvel de 3 pontos, de 5 dias mantidos em escuro constante, ou seja, foram utilizados os valores dos dias 3 a 7 após a injeção, ilustrados na Figura 3.26B. Os resultados dos cálculos de autocorrelação da atividade de *Ae. aegypti* injetado com RNA dupla-fita e monitorados em escuro constante encontram-se graficamente expostos nas Figuras 3.26 e 3.27, e apontam para τ igual a 22 horas e 30 minutos no caso dos mosquitos injetados com RNA dupla-fita de *LacZ* (Figura 3.27) e igual a 23 horas e 30 minutos no caso daqueles injetados com RNA dupla-fita de *timeless* (Figura 3.28).

A Figura 3.29 oferece destaque para a diferença entre as autocorrelações da atividade de *Ae. aegypti* injetados com RNA dupla-fita de *LacZ* e de *timeless*, ao ilustrar a sobreposição da primeira curva de valores positivos dos gráficos 3.27 e 3.28. Nota-se em detalhe o *lag* de pico para cada curva, sendo *lag* 44 ou 45 e correspondentes a um período de 22 horas ou 22 horas e 30 minutos para mosquitos injetados com RNA dupla-fita de *LacZ* e *lag* 47 e correspondente a um período de 23 horas e 30 minutos para aqueles injetados com RNA dupla-fita de *timeless*. O gráfico auxilia também na visualização do perfil mais espalhado para a direita (no sentido de um τ maior) da curva de autocorrelação da atividade de *Ae. aegypti* injetados com RNA dupla-fita de *timeless* do que o obtido para os injetados com RNA dupla-fita de *LacZ*, sugerindo maior variação dos períodos individuais de cada mosquito no primeiro caso.

Sobreposição do primeiro pico dos gráficos de autocorrelação da atividade de *Aedes aegypti* injetado com RNA dupla-fita de *LacZ* e injetado com RNA dupla-fita de *timeless*

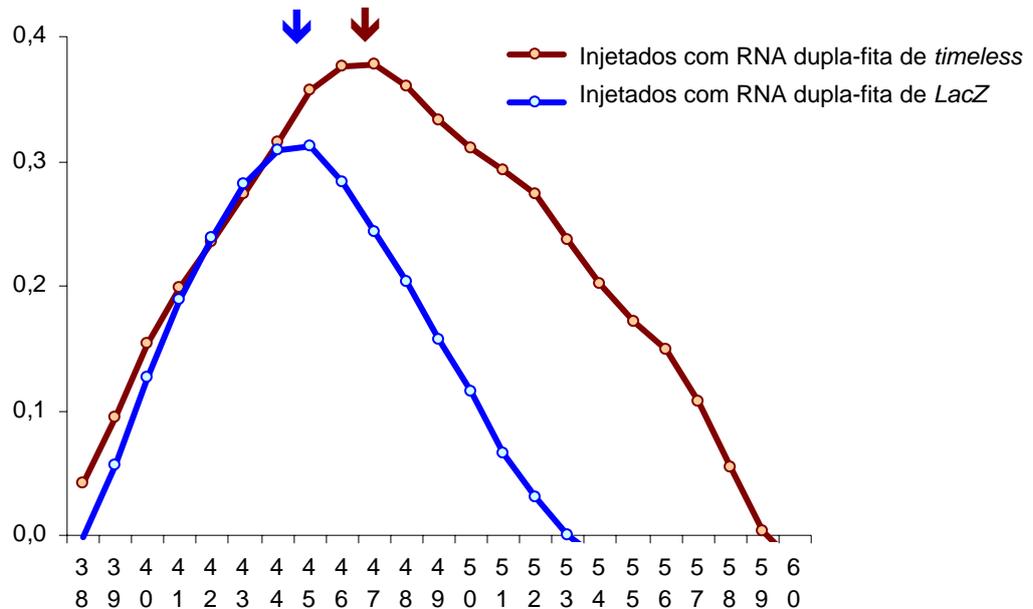


Figura 3.29: Sobreposição do primeiro pico dos gráficos de autocorrelação da atividade de *Aedes aegypti* injetado com RNA dupla-fita de *LacZ* (Figura 3.27) e injetado com RNA dupla-fita de *timeless* (Figura 3.28). O eixo das ordenadas indica o valor do coeficiente de autocorrelação e o eixo das abscissas indica o *lag* da autocorrelação. O pico da curva de coeficiente de autocorrelação de indivíduos injetados com RNA dupla-fita de *LacZ* recai sobre o *lag* 44 e 45, o que corresponde a um período de 22 horas ou 22 horas e 30 minutos, e está indicado no gráfico por ↓. O pico da curva de coeficiente de autocorrelação de indivíduos injetados com RNA dupla-fita de *timeless* recai sobre o *lag* 47, o que corresponde a um período de 23 horas e 30 minutos, e está indicado no gráfico por ↓. No caso desta última curva, não apenas o pico recai em *lag* mais avançado, mas também o perfil da curva é mais espalhado, sugerindo que a variação dos períodos individuais de cada mosquito é maior no grupo de injetados com RNA dupla-fita de *timeless* do que o observado no grupo de injetados com RNA dupla-fita de *LacZ*.

4. Discussão

Ae. aegypti e *Cx. quinquefasciatus* estão entre as espécies de mosquitos mais estudadas no mundo, por serem de fácil criação em laboratório e principalmente por agregarem vários aspectos de interesse do ponto de vista epidemiológico, como serem cosmopolitas, antropofílicas (apesar de também se alimentarem em outros mamíferos e aves), urbanas, e vetoras de parasitoses e/ou viroses a humanos e animais. *Cx. quinquefasciatus*, pertencente ao complexo *Cx. pipiens*, é vetor da filariose humana causada pelo Nematelminto *Wuchereria bancrofti* e conhecida como filariose bancroftiana, cujo sintoma mais característico é a elefantíase (Rey 1991). Esse mosquito é ainda transmissor do vírus do Oeste do Nilo, o que tem atraído ainda mais a atenção da comunidade científica para essa espécie nos últimos anos (Anderson e Main 2006; Elizondo-Quiroga et al. 2005; Savage et al. 2006; Sirigireddy et al. 2006). *Ae. aegypti*, por sua vez, destaca-se como vetor dos vírus causadores da Dengue e da Febre Amarela (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994; Forattini 2002), e é também amplamente utilizado como modelo para estudos de malária por ser hospedeiro de *Plasmodium gallinaceum* (James 2002; James et al. 1999).

Esse conjunto de fatores contribuem para que *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* estejam entre as espécies de mosquito com maior quantidade de informação disponível na literatura, ainda que não muitos trabalhos abordem nestas espécies o estudo do relógio biológico em condições de laboratório, e menos ainda enfocando os genes envolvidos com a regulação do comportamento. O presente trabalho visa contribuir nesse sentido com uma abordagem comparativa do padrão de expressão dos quatro principais genes reguladores do relógio biológico em insetos entre o mosquito diurno *Ae. aegypti* e o noturno *Cx. quinquefasciatus*. São ainda aprofundadas em *Ae. aegypti* algumas investigações acerca da expressão desses mesmos genes em diferentes estados fisiológicos das fêmeas. Os estudos nessa espécie estendem-se ainda à aplicação de técnicas de RNA de interferência para verificação do efeito no silenciamento da expressão gênica e no padrão de atividade dos mosquitos.

4.1 – Padrão de atividade/repouso de *Aedes aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*

Estudos realizados em ambiente de laboratório sobre o padrão de atividade de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* há muito demonstraram ser a primeira uma espécie

tipicamente diurna e a segunda noturna (Clements 1999). A maioria de tais estudos, principalmente os mais antigos, vale-se de aparatos acústicos que detectam a atividade de vôo dos insetos [e. g. (Bennet-Clark 1984; Jones 1963; Peterson 1979; Rowley et al. 1987)], ainda que alguns façam uso de equipamento foto-eletrônico baseado em feixes de luz infra-vermelha para detecção do movimento seja de vôo ou locomoção [e. g. (Chiba et al. 1992; Chiba et al. 1993; Kasai e Chiba 1987; Kawada e Takagi 2004; Shinkawa et al. 1994)]. O padrão de atividade/repouso de fêmeas virgens das linhagens de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* utilizadas neste estudo foi estabelecido com base no segundo tipo de equipamento, ou seja, foto-eletrônico com uso de feixes de luz infra-vermelha para detecção do movimento.

4.1.1 – Atividade em regime de claro/escuro

Os resultados obtidos em regime de claro/escuro para o padrão de atividade locomotora de *Ae. aegypti* evidenciam o comportamento tipicamente diurno da espécie, de perfil bimodal e concentração da atividade a partir da segunda metade da fase clara (Figuras 3.1A, 3.2A, 3.3A e 3.4A). Esse padrão está de acordo com o descrito para os machos (Anexo I), e é o mesmo encontrado para essa espécie por outros autores em diversas oportunidades (Jones 1981; Rowland e Lindsay 1986; Taylor e Jones 1969).

Os resultados de *Cx. quinquefasciatus* mostraram padrão nitidamente noturno com forte pico de resposta ao apagar das luzes mas não ao acender das mesmas (Figuras 3.1B, 3.2B, 3.2B e 3.4B). Os resultados estão de acordo com a literatura, excetuando-se a ausência do pico de atividade na transição de luz da fase escura para a fase clara normalmente registrado não somente nesta espécie como também em outras do complexo *Cx. pipiens* (Chiba et al. 1992; Chiba et al. 1993; Clements 1999; Jones 1982; Jones e Gubbins 1979; Shinkawa et al. 1994). Entretanto, os autores comentam ainda que a diminuição da temperatura de 25°C para 20°C ou 15°C causa redução gradual no pico de atividade de transição de fase escura para fase clara, apesar de não surtir efeito no pico registrado ao apagar das luzes. Ainda assim, o presente trabalho parece ser o único onde *Cx. quinquefasciatus* não demonstra qualquer incremento na atividade em resposta ao acender das luzes quando mantido a 25°C, sugerindo tratar-se de uma idiosincrasia da linhagem utilizada neste estudo.

Vários autores trabalhando com diferentes espécies concluíram que picos diferentes de atividade estariam sendo regulados por osciladores independentes (Bell-Pedersen et al. 2005; Christensen e Lewis 1982; Daan e Berde 1978; Helfrich-Forster 2000; Kawato e Suzuki 1980; Pittendrigh e Daan 1976). Em mosquitos, já nas primeiras investigações sobre atividade, autores encontram evidências para essa mesma explicação na regulação de diferentes picos de atividade. Jones (Jones 1982) propõe que os dois picos principais de atividade por eles registrados em fêmeas virgens de *Cx. quinquefasciatus* mantidas tanto em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro como em escuro constante seriam regulados por osciladores internos independentes, onde o pico próximo à transição de fase escura para clara seria uma manifestação de um oscilador “secundário” (*slave*) vinculado a um oscilador central. Outros autores chegam a conclusões semelhantes trabalhando com *Cx. pipiens pallens* (Chiba et al. 1993) e *Cx. pipiens molestus* (Chiba e Tomioka 1992). Esta seria uma explicação para as observações onde registram-se perturbações no segundo pico de atividade de *Cx. quinquefasciatus* (correspondente aos primeiros momentos de claro ou primeiras horas do dia subjetivo) sem que seja detectada qualquer alteração no pico das primeiras horas de escuro ou noite subjetiva. Como exemplo, estão a depressão da atividade decorrente da redução da temperatura, descrita acima, ou a antecipação do segundo pico no caso de fêmeas inseminadas (Jones 1982), e ainda a total ausência do segundo pico nos registros do presente estudo, ainda que o primeiro pico se faça presente. Acredita-se que a existência de multi-osciladores independentes, regulando o ritmo circadiano e os diferentes picos de atividade neste intervalo, proporcione melhor adaptabilidade das espécies a viver em faixa de latitude mais ampla, ajudando na adaptação a diferentes regimes de fotoperíodo que mudam não somente conforme a latitude mas também em relação às estações do ano (Clements 1999; Taylor 1969, 1977).

Ainda que *Ae. aegypti* demonstre aumento tanto na quantidade de atividade (Figuras 3.1A e 3.2A) quanto na proporção de indivíduos ativos (Figuras 3.3A e 3.4A) no momento de transição de fase escura para clara, o efeito da transição de fase clara para escura é muito mais evidente. No caso de *Cx. quinquefasciatus* (Figura 3.1B), neste momento de transição de luz a média de atividade é ainda maior que a observada para *Ae. aegypti* (Figura 3.1A). Na Figura 3.3, pontos imediatamente após o apagar das luzes registram 100% de indivíduos ativos no caso de *Cx. quinquefasciatus* e em torno de 90% no caso de *Ae. aegypti*. A transição no outro sentido, sem efeito notório em *Cx. quinquefasciatus*, causa, em média, estímulo para a atividade em apenas cerca de 60% dos indivíduos de *Ae. aegypti*.

Ae. aegypti e *Cx. quinquefasciatus* apresentaram padrões de atividade diametralmente opostos em relação às fases clara e escura do dia (Figura 3.5). O caráter diurno de *Ae. aegypti* manifesta-se com 70% das horas de atividade da espécie sendo registradas na fase clara, enquanto o caráter noturno de *Cx. quinquefasciatus* exprime-se em 72% de suas horas de atividade acontecendo na fase escura.

4.1.2 – Atividade em regime de escuro constante

A manutenção de um ritmo na ausência de indicadores ambientais de passagem de tempo é a característica fundamental para reconhecimento deste como endogenamente regulado pelo organismo. Por esse motivo, um dos objetivos deste trabalho foi a investigação do padrão de atividades em regime de escuro constante das linhagens de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* usadas nos demais experimentos. Os resultados apontam para um período em livre-curso (τ) de 22 horas e 30 minutos para *Ae. aegypti*, ou seja, a média dos indivíduos acumula a cada dia que passa em escuro constante um adiantamento de cerca de 1 hora e 30 minutos no ciclo de atividade (Figura 3.11). Taylor e Jones (Taylor e Jones 1969) encontraram também um período em livre-curso de 22,5 horas para fêmeas virgens de *Ae. aegypti* mantidas em escuro constante. Estes autores concluem ainda não haver evidências de perfil bimodal de atividade em *Ae. aegypti*, pois ao entrar em regime de escuro constante, detectaram apenas o pico correspondente ao registrado ao fim do dia subjetivo. As Figuras 3.6A, 3.7A, 3.8A e 3.9A mostram exatamente o mesmo resultado.

No caso de *Cx. quinquefasciatus*, o resultado não é muito preciso devido ao grande ruído experimental. A autocorrelação ilustrada na Figura 3.12 sugere τ de 24 horas, mas tratamento dos dados visando suavizar o ruído insinua um período entre 22 e 23 horas (resultados não mostrados). Para esclarecer a questão, seria necessário novo experimento de monitoramento com um número maior de indivíduos. O fato é que, em escuro constante, nota-se um adiantamento da fase do pico principal de atividade (Figuras 3.7B e 3.9B). Jones (Jones 1982), trabalhando com *Cx. quinquefasciatus*, apresenta gráficos de atividade que sugerem adiantamento de fase para fêmeas mantidas em escuro constante, mas não indica valor preciso ou aproximado para τ .

Ainda que os resultados apresentados neste trabalho para τ das duas espécies tenham sido calculados com base no valor da proporção de indivíduos ativos, como nos resultados

mostrados nas Figuras 3.8 e 3.9, esse fenômeno de adiantamento pode também ser observado nos gráficos de quantidade média de atividade das Figuras 3.6 e 3.7. Na primeira delas, facilmente identifica-se em *Ae. aegypti* (Figura 3.6A) o adiantamento no pico de atividade principal da espécie ao longo dos dias em escuro constante. Entretanto, para *Cx. quinquefasciatus* (Figura 3.6B) este efeito não é visível devido ao pico de resposta à transição para a fase escura, mas o tratamento dado aos resultados na Figura 3.7 permite o acompanhamento do adiantamento dos picos principais de atividade não somente em *Ae. aegypti* (Figura 3.7A) como também em *Cx. quinquefasciatus* (Figura 3.7B).

É interessante notar que, no caso das duas espécies, o pico principal de atividade do segundo dia em escuro constante parece mais “espalhado” e até mesmo tendendo à fragmentação em mais de um pico. Esse efeito é explicado pela variação individual do τ que faz com que indivíduos com períodos mais curtos ou mais longos que a média saiam cada vez mais de sincronia uns em relação aos outros com o passar dos dias em escuro constante, desconfigurando o pico representativo da média da espécie. Isto também é observado em *Drosophila* (Peixoto, comunicação pessoal).

A comparação entre os gráficos das Figuras 3.2A e 3.7A permite concluir que, apesar do adiantamento de cerca de 1 hora e 30 minutos a cada dia em escuro constante, detectado com base na proporção de indivíduos ativos, e ligeiro “espalhamento” do pico no segundo dia em escuro constante na Figura 3.7A, o perfil geral da atividade de *Ae. aegypti* é mantido praticamente o mesmo na ausência de luz. Isso comprova a regulação endógena do ritmo de atividade. Taylor e Jones (Taylor e Jones 1969) mostram que *Ae. aegypti* mantém, em escuro constante, ritmo de atividade com período de 22,5 horas, mas que a quantidade de atividade registrada seria muito reduzida em relação àquela detectada no atual estudo. Entretanto, é importante ressaltar que, naquela oportunidade, os autores adotaram método de registro da atividade de vôo, e não da atividade locomotora, o que possivelmente justifica a diferença entre os resultados.

No caso de *Cx. quinquefasciatus*, a comparação entre os perfis dos gráficos nas Figuras 3.2B e 3.7B não mostra uma reprodução tão fiel como encontrado para *Ae. aegypti*. Observando-se a escala de cada gráfico, nota-se parte do motivo de um perfil tão mais ruidoso em 3.7B do que em 3.2B. Uma outra possível influência seria o número de indivíduos monitorados que, por ter sido menor no caso da Figura 3.7B, estaria gerando mais ruído no perfil da média. Jones (Jones 1982) trabalhou com 33 indivíduos (cerca de o dobro do usado nesta oportunidade no experimento em escuro constante) e conseguiu demonstrar que a linhagem de *Cx. quinquefasciatus* com a qual trabalhou sustentava ritmo bimodal de atividade

em escuro constante, semelhante ao observado em regime de claro/escuro. Apesar da Figura 3.7B não exibir padrão tão similar ao da Figura 3.2B, ainda assim pode-se notar o pico principal de atividade acumulando adiantamento a cada dia em escuro constante. O pico principal de atividade, que em regime de claro/escuro acontece no início da noite, passa a tender na direção do dia subjetivo. É interessante perceber ainda que essa tendência também manifesta-se no “espalhamento” do pico da atividade média, mais pronunciado na direção do dia subjetivo. Este fato gera um efeito interessante, notado na comparação entre as Figuras 3.7B e 3.7A: *Cx. quinquefasciatus* passa a apresentar um perfil de atividade mais semelhante ao de *Ae. aegypti* quando essas espécies são mantidas na ausência de luz.

A proporção de indivíduos ativos após tratamento para diminuição de ruído e representado na Figura 3.9 mostra para *Ae. aegypti* (Figura 3.9A) um gráfico ainda mais semelhante àquele correspondente em valores de média de atividade (Figura 3.7A), e no caso de *Cx. quinquefasciatus* consegue mostrar um padrão cíclico de atividade, ainda que não tão claro como para *Ae. aegypti*. O mesmo gráfico sugere fragmentação dos principais picos de atividade de *Cx. quinquefasciatus*, principalmente no segundo dia em escuro constante. Mais uma vez, esse efeito pode indicar número insuficiente de indivíduos monitorados para a determinação de um perfil geral de atividade da espécie, acarretando em valorização demasiada dos indivíduos com períodos excepcionalmente curtos, longos ou arrítmicos. Ainda assim, repete-se o fenômeno de “espalhamento” tendendo ao dia subjetivo. Para confirmar esse efeito sugerido pelos gráficos, os resultados da atividade das espécies foram convertidos em proporção de horas de atividade durante o dia subjetivo e durante a noite subjetiva, e encontram-se na Figura 3.10. Os resultados demonstram que, em condições de escuro constante, *Ae. aegypti* concentra 67% de suas horas de atividade no período do dia subjetivo, o que não evidencia muita diferença em relação aos 70% registrados em regime de claro/escuro (Figura 3.5). Por outro lado, *Cx. quinquefasciatus*, para o qual havia sido registrado 28% de horas de atividade em fase clara quando em regime de claro/escuro (Figura 3.5), mostra em regime de escuro constante 51% de horas de atividade em fase de dia subjetivo. Apesar da diferença na atividade entre as duas espécies ainda ser significativa, os resultados sugerem que *Cx. quinquefasciatus* esteja aproximando-se do padrão de *Ae. aegypti* (em relação à proporção de atividade) quando em escuro constante. Isto leva a crer que o caráter noturno de *Cx. quinquefasciatus* seja mais fortemente determinado por uma imposição inibitória que a luz exerça na sua atividade, e que provavelmente o comportamento diurno seria um caráter ancestral comum a ambas as espécies em questão.

4.2 – Expressão circadiana dos genes de relógio *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

O padrão de expressão dos genes *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* no cérebro de *Drosophila* e outros organismos é responsável pelo sustento do relógio biológico central que controla os ritmos circadianos de atividade. A expressão desses genes numa alça regulatória de retro-alimentação negativa de ciclo de cerca de 24 horas configura o marcapasso central do relógio circadiano. Muitos aspectos do comportamento, incluindo o ritmo de atividade, já foram comprovados como dependentes de um relógio central funcional, não apenas em insetos como também em mamíferos (Bell-Pedersen et al. 2005; Hardin 2005; Helfrich-Forster 2004; Numano et al. 2006; Stanewsky 2003).

No grupo dos insetos, a maior quantidade de informação disponível sobre estrutura e expressão circadiana de genes de relógio concentra-se em *D. melanogaster* (Hall 2003; Hardin 2005; Peixoto 2002; Rosato et al. 2006; Stanewsky 2002), além de alguns trabalhos em outras moscas (An et al. 2002; Goto e Denlinger 2002; Kostal e Shimada 2001; Lankinen e Forsman 2006; Myers et al. 1997; Nishinokubi et al. 2006; Nishinokubi et al. 2003; Ousley et al. 1998; Warman et al. 2000). Dentro do grupo dos dípteros, além das moscas, recentemente foram publicados alguns trabalhos sobre flebotomíneos (Meireles-Filho et al. 2006a; Meireles-Filho et al. 2006b) e mosquitos (Anexo I; (Mathias et al. 2005)). Há ainda alguns estudos sobre espécies de insetos mais distantes evolutivamente das moscas, como mariposas (Chang et al. 2003; Gvakharia et al. 2000; Iwai et al. 2006; Sauman e Reppert 1996, 1998; Wise et al. 2002), borboleta (Froy et al. 2003), abelhas (Rubin et al. 2006) e barata (Lin et al. 2002).

É estimada uma origem comum para os relógios biológicos em todo o grupo dos animais, e semelhanças são encontradas na seqüência e funcionamento dos genes deste sistema entre espécies evolutivamente muito distantes entre si, assim como muitos eventos como duplicação gênica, deleção e convergências adaptativas (Dunlap 1999; Foster e Kreitzman 2005; Iwai et al. 2006; Rubin et al. 2006; Tauber et al. 2004). Meireles-Filho e colaboradores (Meireles-Filho et al. 2006b) e Rubin e colaboradores (Rubin et al. 2006) mostram que os resultados que obtiveram em flebotomíneo e abelha, respectivamente, em alguns aspectos assemelham-se mais com o relógio biológico de camundongo do que de *Drosophila*. Rubin e colaboradores (Rubin et al. 2006) comentam que a inconsistência entre

as características dos genes de relógio em insetos é essencialmente devida à pouca variedade de espécies investigadas além das drosófilas, que detêm muitas particularidades na estrutura e funcionamento de seu relógio biológico, oriundas de eventos de deleção (total ou parcial) no caso de uns genes e convergências adaptativas no caso de outros. Apesar de todas as vantagens históricas e práticas do estudo molecular em *D. melanogaster*, no campo dos ritmos biológicos é preciso expandir as investigações a outras espécies, visto que *Drosophila*, aparentemente, divergiu evolutivamente de forma muito própria quanto ao relógio biológico, o que a distancia dos outros animais quando os genes deste sistema são comparados. Um estudo comparativo entre uma diversidade maior de insetos traria nova luz ao conhecimento sobre o tema e melhor entendimento das relações evolutivas entre os genes de relógio e suas funções específicas.

A informação disponível para análises comparativas sobre relógio biológico entre os insetos é limitada. Não apenas o número de espécies com informação disponível é restrito, como comenta Rubin e colaboradores (Rubin et al. 2006), mas também, para a maioria delas, só há informações sobre um ou poucos genes. Muitas vezes há apenas informação sobre a seqüência gênica e não sobre a expressão. Em outros casos há informação sobre a expressão gênica, mas sobre a seqüência os dados são incompletos. E, geralmente, espécies próximas sobre as quais há informação acerca dos genes de relógio apresentam padrão de atividade muito similar. Por exemplo, apesar de haver informação sobre várias espécies de moscas, elas são todas diurnas. *Apis mellifera* também é diurna. As duas espécies de mosquitos estudados até então são ambas igualmente diurnas (Anexo I)(Lane 1953; Mathias et al. 2005). O flebotomíneo, por outro lado, é crepuscular-noturno (Meireles-Filho et al. 2006a; Meireles-Filho et al. 2006b). Para comparar o relógio biológico do inseto modelo *Drosophila*, que é essencialmente diurno (ainda que com alguma tendência crepuscular), com outros insetos noturnos, a opção mais próxima disponível são as mariposas (Chang et al. 2003; Gvakharia et al. 2000; Iwai et al. 2006; Sauman e Reppert 1996, 1998; Wise et al. 2002). No entanto, o tempo estimado de divergência entre dípteros e lepidópteros é consideravelmente longo, ~280 milhões de anos atrás (Knipple et al. 2002). No grupo dos lepidópteros, apesar de haver trabalhos sobre insetos noturnos (mariposas) e um diurno (borboleta), este último aborda apenas o gene *period* (Froy et al. 2003), o que restringe as possibilidades de comparações entre os relógios biológicos das espécies.

Um dos objetivos deste trabalho foi comparar o perfil de expressão dos genes *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em cabeça de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, duas

espécies de mosquitos pertencentes à sub-família Culicinae, sendo a primeira de hábitos diurnos e a segunda noturnos (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994; Forattini 2002).

A escolha dessas espécies mostrou-se promissora na produção de informações inovadoras acerca da regulação molecular do relógio biológico. Como já dito anteriormente, elas têm padrão oposto de atividade, e pode-se afirmar que *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* estejam evolutivamente separados há menos de 95 milhões de anos, pois, apesar de não haver na literatura uma datação precisa para a separação entre elas, esse é o tempo estimado para a ramificação mais antiga do grupo dos mosquitos, que separou a subfamília Anophelinae e os demais culicídeos (Krzywinski e Besansky 2003). Este tempo de separação é bem menor do que o observado entre as outras espécies de insetos sobre as quais há informação acerca do relógio biológico e que apresentem padrão diferente de atividade entre si. Não obstante, por serem dípteros, é também bastante válida a comparação com o modelo clássico, *Drosophila*. A distância evolutiva estimada entre o grupo das moscas (braquíceros, segundo algumas nomenclaturas) e o grupo de Diptera ao qual pertencem os mosquitos e flebotomíneos (nematóceros, segundo algumas nomenclaturas) é de cerca de 220 milhões de anos (Yeates e Wiegmann 1999). Mas, nos exemplos de trabalhos citados acima, sobre insetos muito mais distantes de *Drosophila*, como mariposas e abelhas, os autores sempre discutem seus resultados comparando-os aos dessa mosca. Há também a interessante possibilidade de comparação com a informação disponível sobre flebótomo, inseto ainda mais próximo evolutivamente dos mosquitos e que compartilha com eles hábito hematófago, mas com padrão de atividade diferente (crepuscular).

A quantificação relativa dos genes de relógio *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em cabeça de fêmeas *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* permitiu a determinação da curva e amplitude de ciclagem para cada um dos genes nessas espécies, tanto em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro como de escuro constante.

4.2.1 – Expressão de *period* em cabeça de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

O gene registrado com a maior amplitude de ciclagem em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* foi *period*, sendo esta variação da ordem de mais de 50 vezes para as ambas espécies em regime de claro/escuro (Figuras 3.13A e 3.16A) e ainda *Cx. quinquefasciatus* em regime de escuro constante (Figura 3.16B), e 35 vezes para *Ae. aegypti* em escuro constante (Figura 3.13B). Em todos os casos, a variação da abundância entre os pontos

analisados foi altamente significativa (vide legenda das figuras), e o pico de expressão aconteceu entre a 13^a e 19^a hora, com valor máximo na 17^a hora (ZT 17 no regime claro/escuro e CT 17 em escuro constante), e os valores mais baixos entre a 5^a e 7^a horas. As correlações entre as curvas de expressão de *period* em regime de claro/escuro e escuro constante foram altamente significativas tanto para *Ae. aegypti* quanto para *Cx. quinquefasciatus* (Tabela 3.6), ainda que, em ambas as espécies, nota-se ligeiro adiantamento, quando em escuro constante, na queda da abundância relativa deste gene a partir do momento de pico. Também foram altamente significativas as correlações das curvas de *period* quando comparadas entre as duas espécies, tanto em regime de claro/escuro como escuro constante (Tabela 3.6).

Em *D. melanogaster* mantidas em regime de claro/escuro, *period* cicla cerca de 10 vezes entre os pontos de maior expressão, nos ZTs 13 a 16, e os de menor expressão, nas primeiras horas da fase clara (Hardin 1994; Hardin et al. 1990; Taghert e Lin 2005), assim como *period* da mosca carnívora *Sarcophaga crassipalpis*, ainda que neste caso tenha sido verificada a expressão na cabeça de machos (Goto e Denlinger 2002). Resultados obtidos para três tipos de moscas diferentes – o drosofilídeo *Chymomyza costata* (Kostal e Shimada 2001), o califorídeo *Lucilia cuprina* (Warman et al. 2000) e os tefritídeos (as verdadeiras moscas das frutas) *Bactrocera tryoni* e *Bactrocera neohumeralis* (An et al. 2002) –, por sua vez, apontam para uma variação da abundância relativa de *period* ainda menor, de cerca de 5 vezes, sendo conservado o pico de abundância nas primeiras horas após o apagar das luzes.

Então, *period* em moscas e nos mosquitos diurno (*Ae. aegypti*) e noturno (*Cx. quinquefasciatus*) cicla em fase semelhante, mas com amplitude maior nos mosquitos. Isso não significa necessariamente que, no momento de pico, os mosquitos estejam expressando mais *period* do que as moscas. É possível que o ponto de menor expressão em mosquitos represente valores tão baixos que, ao ser comparado com o ponto de maior abundância, gere a grande amplitude descrita, pois esta é relativa entre pontos máximo e mínimo de expressão para cada espécie, não sendo comparável entre espécies. É interessante frisar que a técnica adotada neste trabalho para a quantificação de genes de relógio é diferente daquela utilizada nos experimentos mais antigos realizados com as moscas.

No trabalho realizado sobre genes de relógio em *Apis mellifera*, no entanto, a técnica adotada para a quantificação da expressão gênica foi muito similar à deste trabalho com mosquitos. Quando Rubin e colaboradores (Rubin et al. 2006) afirmam que o relógio biológico de *Apis mellifera* é mais parecido com o de camundongos do que com o de *Drosophila*, baseiam-se na seqüência dos genes e também no padrão temporal de expressão

dos mesmos. Entretanto, quando o fazem para *period*, estão analisando a expressão deste conjuntamente com outro gene (*cryptochrome*). Analisando o resultado daqueles autores isoladamente para *period*, vemos que a curva de expressão deste gene em abelhas é semelhante à encontrada para *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, ainda que a amplitude seja, mais uma vez, muito menor: cerca de três vezes tanto em claro/escuro como em escuro constante. O mesmo pode-se dizer do flebotomíneo *Lu. longipalpis*, com perfil semelhante da curva, mas amplitude de apenas cerca de duas vezes (Meireles-Filho et al. 2006b).

Quatro estudos independentes com diferentes espécies de lepidópteros, sendo três mariposas (noturnas) e uma borboleta (diurna), chegaram a resultados semelhantes para o perfil temporal de expressão de *period* na cabeça dos insetos, sempre com pico nas primeiras horas de escuro. Em *Antheraea pernyi*, ainda que mantida em regime de claro/escuro um pouco diferente (17 horas de claro e sete de escuro), também nota-se expressão de *period* no cérebro com o mesmo perfil de curva encontrado para os culicídeos, mas com amplitude menor, de cerca de cinco vezes (Sauman e Reppert 1996). Em *Bombyx mori* a amplitude é ainda menor, de duas vezes, mas a fase é novamente a mesma, com maior expressão na transição de claro para escuro tanto em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro quanto no de 16 horas de claro e 8 de escuro (Iwai et al. 2006). Este último regime de luz foi o mesmo adotado no estudo sobre *period* em *Cydia pomonella*, onde mais uma vez é registrada amplitude de *period* de cerca de cinco vezes e valor mais alto nas primeiras horas da noite (Gvakharia et al. 2000). Na borboleta monarca (*Danaus plexippus*), diurna, em regime de 14 horas de claro e 10 horas de escuro, repete-se o padrão de *period*: pico nas primeiras horas da noite e amplitude de cerca de quatro vezes (Froy et al. 2003).

Há ainda informação sobre *period* em machos da barata *Blattella germanica* (Lin et al. 2002), e, mais uma vez, os autores afirmam que a ciclagem do gene está de acordo com a encontrada em *Drosophila*. Em regime de claro/escuro, a maior abundância de *period* em barata foi observada após o apagar das luzes, ainda que em momento mais tardio (nos outros insetos geralmente o pico localiza-se bem próximo à transição de luz – vide comentários acima). Em escuro constante o perfil de ciclagem foi mantido, com pico na noite subjetiva e vale no dia subjetivo. Embora a flutuação da abundância relativa deste gene não seja discutida pelos autores, a observação dos gráficos do trabalho parece indicar que *period* cicla com pouca amplitude em regime de claro/escuro (menos de duas vezes) e um pouco mais em escuro constante, atingindo cinco vezes mais produto no pico em relação ao vale do gráfico.

Entre os quatro genes de relógio estudados nesta oportunidade, *period* é aquele com mais informação na literatura e com investigação em maior número de espécies. Após

comparação entre elas, conclui-se que o padrão temporal de expressão de *period* em cabeça de insetos é semelhante nas diversas espécies para as quais há informação disponível, independente do padrão de atividade, apresentando fase com apenas umas poucas horas de diferença entre as espécies. Apesar disso, a amplitude de ciclagem varia entre elas, sendo a dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* as maiores já relatadas.

4.2.2 – Expressão de *timeless* em cabeça de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

Dentre os quatro genes de relógio estudados neste trabalho, talvez *timeless* concentre o maior número de discussões controversas. Inicialmente identificado em *Drosophila* (Sehgal et al. 1994), cicla robustamente nessa espécie na mesma fase de *period*, ou seja, com pico na transição da fase clara para a escuro, e com amplitude de cerca de 12 vezes em regime de claro/escuro e 8 vezes em escuro constante (Blau e Young 1999). É essencial nessa espécie para a manutenção do relógio central, sendo inclusive seu produto, a proteína TIMELESS, o responsável pelo acerto do relógio ao ser alvo de degradação prematura na presença de luz (Naidoo et al. 1999; Sehgal et al. 1995; Suri et al. 1998).

Em mamíferos, o gene identificado num primeiro momento como *timeless* não parecia ciclar no núcleo supra-quiasmático (onde reside o relógio central em mamíferos) de camundongo (Takumi et al. 1999). Entretanto, um estudo posterior, adotando outra técnica, evidencia *timeless* ciclando no núcleo supra-quiasmático de camundongo numa amplitude de três vezes, com pico na transição de fase clara para escura do dia (semelhante a fase de *timeless* de *Drosophila*), e mantendo esse padrão em regime de escuro constante (Tischkau et al. 1999). Ainda assim, trabalhos posteriores questionaram o papel desse gene no funcionamento do relógio biológico em mamíferos (Gotter et al. 2000). Atualmente, reconhece-se que o gene identificado inicialmente como *timeless* de mamíferos é, na realidade, o homólogo⁷ a outro gene de *Drosophila*, *timeout*, parálogo⁸ de *timeless*, sem relação direta com a regulação do relógio biológico nesta espécie. Estudos sobre a evolução

⁷ Homologia é uma propriedade que descreve história evolutiva comum. Genes homólogos são aqueles cuja similaridade entre suas sequências indica que divergiram de uma forma ancestral comum. Fitch WM (2000) Homology: a personal view on some of the problems. *Trends Genet* 16:227-231, Webber C and Ponting CP (2004) Genes and homology. *Curr Biol* 14:R332-333.

⁸ Há três subcategorias de genes homólogos (vide nota anterior): genes ortólogos, parálogos e xenólogos. Ortólogos são genes com origem ancestral comum e que divergiram por processo de especiação, encontrando-se em genomas de espécies diferentes. Parálogos são genes que surgiram por duplicação dentro de um mesmo genoma. Genes parálogos, por sua vez, são genes com origem comum que encontram-se num mesmo genoma, tendo surgido ali por duplicação gênica dentro de uma mesma linhagem e subsequente divergência de uma das cópias, que pode vir a exercer no organismo função bastante diferente daquela do gene original. Genes xenólogos são genes com origem comum e que encontram-se em genomas de espécies diferentes, mas cuja história envolve transferência interespecífica (transferência horizontal). Fitch WM (2000) Homology: a personal view on some of the problems. *Trends Genet* 16:227-231, Webber C and Ponting CP (2004) Genes and homology. *Curr Biol* 14:R332-333.

da estrutura de *timeless* (*tim1*) e *timeout* (*tim2*) sugerem origem antiga, como pode ser visto em Rubin e colaboradores (Rubin et al. 2006), que comentam terem encontrado um ortólogo de *timeless* em equinodermos.

Em alguns casos *timeout* (*tim2*) é apontado como o gene original, a partir do qual *timeless* teria surgido por duplicação gênica (Benna et al. 2000). Entretanto, o cenário ainda é muito confuso. *timeless* (*tim1*) não é encontrado em *Caenorhabditis elegans*, nem em mamíferos ou abelhas, mas é encontrado em todos os outros insetos para os quais há informação disponível, sendo eles mariposas, mosquitos e moscas (Rubin et al. 2006)(Anexo I). O homólogo de *timeout* (*tim2*) de *Drosophila*, por outro lado, parece estar sempre presente: já foi confirmado em camundongo e abelha, e uma simples pesquisa utilizando a ferramenta *Blast* no banco de dados de genomas imediatamente o identifica nos mosquitos *Ae. aegypti* e *Anopheles gambiae* (dados não mostrados). É possível que a origem da duplicação *timeless/timeout* tenha acontecido até mesmo antes da separação entre nematódeos e artrópodes, e que a ausência de *timeless* nas três espécies citadas deva-se a eventos independentes de deleção (Benna et al. 2000; Rubin et al. 2006). Se for esse o caso, com as informações disponíveis, não seria possível determinar qual forma é a original e qual a derivada.

Apis mellifera é o único inseto, até hoje, para o qual foi comprovada a ausência de *timeless* (*tim1*), como revelam Rubin e colaboradores (Rubin et al. 2006). Esses autores encontraram, porém, *timeout* (*tim2*) e verificaram para este o padrão de expressão temporal no cérebro das abelhas. Em regime de claro/escuro, *tim2* mostrou-se em mesma fase com *period*, ou seja, com pico na transição entre claro/escuro. Entretanto, em regime de escuro constante esse gene não apresentou qualquer padrão de ciclagem. Rubin e colaboradores (Rubin et al. 2006) acreditam que *tim2* não esteja envolvido na regulação do relógio, como *tim1* de *Drosophila*, por lhe faltar os domínios importantes para essa função.

Resultados sobre *timeless* em *Sarcophaga crassipalpis* são muito similares aos de *Drosophila*, com este gene ciclando na mesma fase de *period*, com pico logo após a transição claro/escuro, e amplitude de 10 vezes em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, e a amplitude diminuída em regime de dia mais longo (Goto e Denlinger 2002). *Lu. longipalpis* também contém *timeless* ciclando e com pico na transição de fase clara para escura, juntamente com *period*, ainda que em amplitude menor (Meireles-Filho et al. 2006b). A mariposa *Bombyx mori* é outra espécie para a qual *timeless* cicla em menor amplitude, de cerca de 2,5 vezes, e com pico coincidente com o de *period*, na transição de claro para escuro (Iwai et al. 2006).

Em relação aos mosquitos, é possível encontrar homólogos tanto de *timeless* quanto *timeout* nos genomas completos disponíveis no banco de dados, que são de *Ae. aegypti* e *Anopheles gambiae*. No Anexo I, encontra-se o seqüenciamento completo de *timeless* em *Ae. aegypti*, bem como a anotação do gene em *Anopheles gambiae*, e é demonstrada a alta homologia de *timeless* destas duas espécies de mosquito com *timeless* de *Drosophila*, sendo as regiões de maior similaridade justamente aquelas envolvidas com domínios reconhecidamente importantes em *Drosophila* na regulação do relógio circadiano, como as duas regiões de interação com *period* e a região de sinalização da localização nuclear. Esses domínios não são encontrados em *timeout* (Rubin et al. 2006).

Os fragmentos de *timeless* de *Ae. aegypti* (Figura 2.2) e *Cx. quinquefasciatus* (Figura 2.6) utilizados na PCR em tempo real não apresentam similaridade com seqüência de *timeout* (dados não mostrados), descartando a possibilidade de interferência deste gene na quantificação de *timeless*. No caso de *Cx. quinquefasciatus*, *timeless* cicla na cabeça das fêmeas de forma robusta tanto em regime de claro/escuro como em escuro constante (Figura 3.19). A correlação entre essas duas curvas é altamente significativa (Tabela 3.6), ainda que note-se em escuro constante queda antecipada da abundância após o pico em relação à curva em regime de claro/escuro. A fase de ciclagem é semelhante à de *period* (Figura 3.18), como em *Drosophila* (Figura 1.6). A amplitude de abundância é próxima à de *Drosophila*, tendo ficado em torno de oito vezes em regime de claro/escuro e 10 vezes em escuro constante.

Entretanto, em cabeça de fêmea de *Ae. aegypti*, a variação da abundância de *timeless* entre o ponto de maior e menor expressão é muito pequena: 2,5 vezes regime de claro/escuro e três vezes em escuro constante (Figura 3.14), ainda que o ponto de maior expressão na transição na 13ª hora (ZT 13 e CT 13) seja semelhante ao das demais espécies. Apesar desses comentários, é importante salientar que em regime de claro/escuro a variação da abundância de *timeless* não foi estatisticamente significativa (Figura 3.14A), como também não foi a correlação entre esta curva de *timeless* em *Ae. aegypti* com aquela de *Cx. quinquefasciatus* em mesmo regime de luz (Tabela 3.6).

Em escuro constante, no entanto, a variação da abundância de *timeless* em cabeça de fêmea de *Ae. aegypti* foi altamente significativa (Figura 3.14B), e o valor máximo registrado no CT 15, duas horas depois em relação ao correspondente horário em regime claro/escuro. Apesar da correlação entre as curvas de *Ae. aegypti* nos dois regimes de luz não ter sido significativa, a correlação das as curvas em escuro constante entre *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* foi altamente significativa (Tabela 3.6).

Em machos de *Ae. aegypti*, a variação temporal de *timeless* em regime claro/escuro foi significativa, mas com pouca amplitude (cerca de duas vezes) e pico na transição de claro para escuro deslocado no sentido da fase clara (Anexo I). A obtenção de variação significativa entre os pontos temporais dos resultados para machos é possivelmente devida a um número maior de experimentos independentes geradores da média da expressão do que os realizados para as fêmeas, mas é interessante notar que as barras de erro ainda são acentuadas. A diferença na posição do pico de *timeless* em machos de *Ae. aegypti*, deslocado na direção da fase clara (Figura 3.14A) pode ser resultante do fato de ter sido para os machos analisada a expressão em extrato total do corpo inteiro dos mosquitos. Considerando que *timeless* cicla com pouca amplitude nessa espécie, eventual expressão desse gene em outro tecido que não o cérebro em fase um pouco diferente pode ter sido responsável pelo considerável ruído experimental na expressão em machos e deslocamento do pico de abundância em relação à cabeça de fêmeas (vide item 4.2.5 para expressão de *timeless* em corpo de fêmeas de *Ae. aegypti*).

No trabalho sobre expressão de *timeless* em larvas do mosquito *Wyeomyia smithii*, foi investigada a expressão deste gene em larvas de III e IV instar em regime de 10 horas de claro e 14 horas de escuro. As duas formas apresentaram *timeless* ciclando em baixa amplitude (cerca de duas vezes) e com pico na transição claro/escuro, ainda que deslocado no sentido da fase clara no caso do IV instar, como os resultados para machos de *Ae. aegypti*, e nas primeiras horas de escuro, como em cabeça de fêmeas, no caso do III instar (Mathias et al. 2006).

A pequena amplitude na expressão de *timeless* encontrada em *Ae. aegypti* é semelhante aos resultados descritos acima para *Wyeomyia smithii*, *Sarcophaga crassipalpis*, *Lu. longipalpis* e até mesmo *Apis mellifera*, ainda que no caso desta última trate-se de *timeout* e não de *timeless*.

A conclusão mais imediata que se pode chegar sobre *timeless* é a mesma colocada para *period*, ou seja, que o padrão temporal de ciclagem em cabeça de insetos é semelhante para todas as espécies para as quais há informação disponível, independente do padrão de atividade. A fase é sempre próxima, com apenas umas poucas horas de diferença entre as espécies. A amplitude na variação da abundância em 24 horas varia entre as espécies, como varia para *period*. Na maior parte dos casos é pequena, na ordem de três vezes no máximo, mas em *Drosophila* e *Cx. quinquefasciatus* sobe para cerca de 10 vezes. Ainda, tanto para *Drosophila* quanto para mosquitos, a amplitude na variação da abundância de *timeless* parece

ser maior em regime de escuro constante. Não há informação sobre o padrão de ciclagem de *timeless* em escuro constante para outras espécies.

Em *Drosophila*, sabe-se que *period* e *timeless* ciclam na mesma fase, com pico na transição entre fase clara e fase escura, e estão sob a regulação do mesmo fator de transcrição, o dímero CLOCK-CYCLE. Em todas as espécies para as quais há informação sobre esses genes, *timeless* e *period* também ciclam em fases semelhantes entre si e em relação à *Drosophila*, variando não mais que duas a quatro horas em relação a essa mosca. Esses dados sugerem que a regulação da expressão de *period* e *timeless* seja, de forma geral, conservada ao longo da evolução.

4.2.3 – Expressão de *cycle* em cabeça de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

Assim como *period*, *cycle* mostrou ciclagem robusta e com grande amplitude tanto em regime de claro/escuro quanto de escuro constante (ainda que não tão acentuada quanto em *period*) em cabeça de fêmea de *Ae. aegypti* (Figura 3.15) e *Cx. quinquefasciatus* (Figura 3.20), com resultados altamente significativos para a variação entre os pontos temporais analisados (vide legenda das figuras). Em todos os casos, os valores de maior abundância foram registrados nos primeiros pontos temporais (ZTs 1 e 3 em regime de claro/escuro e CTs 1 e 3 em regime de escuro constante), e o momento de menor expressão em regime de claro/escuro foi na transição de luz (entre os ZTs 11 e 13) e em escuro constante entre os CTs 13 e 15. Esses resultados estão de acordo com os obtidos para machos de *Ae. aegypti* mantidos em regime de claro/escuro, encontrados no Anexo II, onde *cycle* cicla com pico no ZT 3 e vale no ZT 13, e amplitude de abundância de 7 vezes.

A correlação entre as curvas de *cycle* de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* foi altamente significativa nos dois regimes de luz (Tabela 3.6), assim como foram significativas as correlações das curvas de *cycle* entre os regimes de luz, dentro de cada espécie (Tabela 3.6). Entretanto, vale chamar atenção para um detalhe na comparação entre as curvas de *cycle* em regime de claro/escuro com aquela em escuro constante, tanto em *Ae. aegypti* (Figura 3.15) como em *Cx. quinquefasciatus* (Figura 3.20): nota-se um adiantamento no aumento da abundância relativa nos últimos pontos temporais, onde são alcançados valores próximos àqueles registrados no pico de abundância das primeiras horas. Isso faz com que o perfil do gráfico nas curvas em escuro constante assemelhe-se a um cálice, o que não acontece com as curvas em claro/escuro.

Há menos trabalhos na literatura acerca de *cycle* do que de *timeless* e *period*, em parte, provavelmente, por esse gene não ciclar no modelo *Drosophila* nem em relação ao RNA nem quanto à proteína que ele codifica (Figura 1.6)(Bae et al. 2000). Goto e colaboradores (2002) também encontraram em *Sarcophaga crassipalpis* expressão constante para *cycle* ao longo de 24 horas em regime de claro/escuro. Estudo em *Bombyx mori* (mariposa) sobre a estrutura de *cycle* (na realidade denominado *Bmal*, como o homólogo de *cycle* em mamíferos) incluiu uma investigação inicial sobre a variação temporal na abundância deste gene, mas os resultados apontaram para uma expressão constante (Markova et al. 2003). Entretanto, os autores verificaram a expressão em apenas dois pontos temporais no intervalo de 24 horas, e eles mesmos comentam que esse resultado não pode ser considerado conclusivo para o padrão de expressão temporal do gene nessa espécie.

Entretanto, *cycle* cicla robustamente não apenas em mosquitos, como descrito acima, mas também em flebotomíneo e abelha, da mesma forma que em mamíferos (*Bmal*). No primeiro caso, em *Lu. longipalpis* *cycle* cicla em cabeça de fêmeas e machos (inteiros) mantidos a 12 horas de claro e 12 horas de escuro com amplitude de cerca de duas vezes (Meireles-Filho et al. 2006a), menor do que a encontrada em mosquitos, mas com fase similar, ainda que um pouco atrasada em relação aos mosquitos: pico no meio do dia, entre os ZTs 4 e 8, e vale no meio da noite, no ZT 16. Mesmo assim, como em mosquitos, *cycle* cicla no flebotomíneo em fase oposta àquela de *period* e *timeless* (Meireles-Filho et al. 2006a; Meireles-Filho et al. 2006b). No segundo caso, abelha, Rubin e colaboradores (Rubin et al. 2006) demonstram *cycle* ciclando em cabeça de *Apis mellifera* também em fase oposta a *period* e *timeless*, tanto em regime de claro/escuro como em escuro constante, ainda que em amplitude menor do que duas vezes entre pico e vale. Entretanto, apesar das semelhanças, em nenhuma espécie a amplitude de ciclagem de *cycle* sequer se aproxima da encontrada no presente trabalho para cabeça de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*, e ainda em machos dessa última espécie.

Rubin e colaboradores (Rubin et al. 2006) realizaram, ainda, estudos sobre a estrutura e filogenia dos genes de relógio que comprovam a divergência do relógio biológico de *Drosophila* em relação aos outros insetos. Meireles-Filho e colaboradores (Meireles-Filho et al. 2006a) também abordaram, no caso específico de *cycle*, a questão da análise da estrutura gênica entre os insetos. Esses estudos mostram, por exemplo, que o domínio de transativação do dímero CYCLE-CLOCK, que em *Drosophila* encontra-se codificada na extremidade 3' de *Clock*, localiza-se na porção 3' de *cycle* (ou *BMAL*, o homólogo de *cycle* em mamíferos e mariposas) em mosquitos, mariposa, abelha, flebotomíneo e camundongo.

4.2.4 – Expressão de *Clock* em cabeça de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

Não foram encontradas variações significativas entre a expressão relativa de *Clock* nos 12 pontos temporais, num intervalo de 24 horas, analisados para *Ae. aegypti* (Figura 3.16) e *Cx. quinquefasciatus* (Figura 3.21), tanto em regime de claro/escuro quanto de escuro constante. Entretanto, cálculos de correlação comprovam a variação temporal na abundância deste gene. Primeiramente, o perfil dos quatro gráficos (os dois na Figura 3.16 e os dois da Figura 3.21) é bastante similar, aproximando-se da forma de cálice. Ao comparar dentro de cada espécie os gráficos entre os dois diferentes regimes de luz, cálculos estatísticos apontam para correlações positivas significativas nas duas espécies (Tabela 3.6). Comparações entre as espécies quanto à expressão de *Clock* em cada um dos regimes de luz também mostram correlações positivas significativas (Tabela 3.6). Mais importante ainda, a variação da concentração de *Clock* nos diferentes pontos temporais apresenta correlação positiva e significativa com *cycle*, comprovando que a abundância do primeiro flutua em mesma fase deste último (Tabelas 3.1, 3.2, 3.4 e 3.5). Nota-se também curiosas similaridades entre os pontos de menor e maior abundância destes gráficos. Em regime de claro/escuro, pico e vale recaem sobre ZTs próximos: o pico no ZT 3 em *Ae. aegypti* e ZT 1 em *Cx. quinquefasciatus*, e o vale nos ZTs 9 e 11 respectivamente. Em escuro constante, o perfil de abundância de *Clock* das duas espécies mantém o ponto de menor expressão no momento correspondente àquele registrado em claro/escuro, ou seja, CT 9 em *Ae. aegypti* e 11 em *Cx. quinquefasciatus*. Entretanto, o valor de maior abundância foi registrado no CT 21 nas duas espécies, sugerindo um adiantamento no aumento da abundância relativa após o ponto de menor expressão. Desta forma, o pico correspondente às primeiras horas do ciclo seguinte estaria sendo antecipado para as últimas horas do ciclo em questão. Esse efeito foi também observado nas espécies estudadas para *period*, *timeless* (apenas em *Cx. quinquefasciatus*) e *cycle* (vide itens 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3, respectivamente). É pouco provável que todos esses fatos sejam frutos de mero acaso, e sugerem que *Clock* esteja realmente ciclando na cabeça das duas espécies e mantendo o padrão em escuro constante, inclusive com o adiantamento de fase no final da curva observado para os outros genes. As correlações significativas na variação da abundância de *Clock* observadas entre as duas espécies (Tabela 3.6) suportam esta interpretação. É possível que o resultado não significativo da análise de variância, como sugerido para *timeless* de *Ae. aegypti* em regime de claro/escuro, seja devido à baixa amplitude de ciclagem de *Clock*, que ficou na faixa de 2 a 3 vezes entre pico e vale nos quatro

gráficos. É possível que, no caso de *Clock*, para obter valores significativos na análise de variância seja preciso considerar número maior de réplicas para os experimentos.

Clock cicla em *D. melanogaster* com amplitude de cinco vezes tanto em regime de claro/escuro como de escuro constante (Bae et al. 1998; Cyran et al. 2003), e em anti-fase em relação à *period* e *timeless*. No entanto, em *Lu. longipalpis* a ciclagem de *Clock* acontece em fase oposta, ou seja, com fase semelhante à de *period* e *timeless*, com pico de abundância na transição da fase clara para escura (Meireles-Filho et al. 2006b). Naquela oportunidade, os autores sugeriram que o pico de expressão de *Clock* mais tardio em relação ao de *Drosophila* poderia estar relacionado à atividade também mais tardia do flebotomíneo em relação à mosca. Entretanto, essa relação entre fase de ciclagem de *Clock* e padrão de atividade não se confirma em mosquitos. Os resultados do presente trabalho mostram o mesmo padrão de expressão temporal de *Clock* em duas espécies de mosquito com padrão de comportamento oposto: a espécie diurna *Ae. aegypti* e a noturna *Cx. quinquefasciatus* (vide item 4.1.1). O grupo que estudou relógio biológico de *Apis mellifera* (Rubin et al. 2006) comenta que *Clock* não cicla nesta espécie. Entretanto, considerando o que foi encontrado no presente estudo, seria prudente não descartar a hipótese de *Clock* ciclar em abelha da mesma forma que aqui é sugerido para mosquitos, ou seja, com pouca amplitude e muito ruído, dificultando a confirmação por cálculos estatísticos.

A inconsistência no padrão de expressão de *Clock* entre as espécies de insetos não implica necessariamente em diferenças importantes no papel que este gene e seu produto, a proteína CLOCK, desempenham no funcionamento do relógio biológico. Estudos de manipulação da expressão de *Clock* em *Drosophila* mostraram que as alterações no perfil de RNA deste gene não influem nos ritmos moleculares de *period*, *timeless* e *cycle*, e apontam para um importante processo de regulação pós-traducional de *Clock* (Kim et al. 2002), idéia suportada por estudo mais recente realizado por Yu e colaboradores (Yu et al. 2006). Desta forma, tais etapas de regulação pós-traducional de *Clock* podem aproximar a dinâmica geral do papel deste gene no mecanismo regulatório do relógio biológico de espécies que inicialmente aparentam grandes diferenças em relação a este gene quando focado apenas o padrão temporal de abundância de RNA.

4.2.5 – Expressão circadiana dos genes de relógio em corpo de fêmeas decapitadas de *Aedes aegypti* e considerações sobre a expressão em corpo inteiro de machos

Estudos em *Drosophila* mostraram que *period* e *timeless* ciclam na mesma fase em diferentes partes do corpo de machos, mas em fêmeas são constitutivamente expressos nos ovários (Beaver et al. 2003; Hardin 1994). Por esse motivo, ao analisar a expressão de genes de relógio em fêmeas, separa-se as cabeças dos corpos. Nos machos, por sua vez, trabalha-se com o extrato total do corpo. Ainda que não haja na literatura trabalhos sobre a expressão de genes de relógio em ovário de outras espécies de insetos, Meireles e colaboradores (Meireles-Filho et al. 2006a; Meireles-Filho et al. 2006b) confirmam que, em flebotomíneo, *period*, *timeless*, *Clock* e *cycle* são expressos em mesma fase em cabeça de fêmea e extrato total do corpo inteiro de machos. Esses autores aproveitaram a oportunidade para verificar a expressão desses genes nos corpos decapitados das fêmeas, ainda que sem dissecar tecidos específicos. Ao comparar os resultados da expressão no corpo de fêmea com aquela encontrada na cabeça das fêmeas e nos machos, os autores encontram o mesmo padrão de ciclagem e amplitude para *Clock*, mas em fase oposta no caso de *timeless*, e para *period* o resultado foi uma expressão constitutiva no corpo das fêmeas (Meireles-Filho et al. 2006b), assim como foi para *cycle* (Meireles-Filho et al. 2006a).

Os Anexos I e II contém, respectivamente, resultados sobre a expressão temporal de *timeless* e *cycle* em corpo inteiro de machos de *Ae. aegypti*. Comparando esses resultados com os obtidos para esses genes em cabeça de fêmeas (Figuras 3.14A e 3.15A), notamos que o perfil e amplitude de ciclagem são similares, assim como foram em *Lu. longipalpis* (Meireles-Filho et al. 2006a; Meireles-Filho et al. 2006b) e *Drosophila* (Beaver et al. 2002; Beaver et al. 2003; Hardin 1994).

Já nos corpos decapitados das fêmeas de *Ae. aegypti* mantidas em regime de claro/escuro, *timeless*, *cycle* e *Clock* não ciclam (Figura 3.17B, 3.17C e 3.17D), enquanto *period* cicla (Figura 3.17A) em fase semelhante ao encontrado nas cabeças das fêmeas (Figura 3.13A e Tabela 3.6), mas em amplitude muito menor. Desta forma, os resultados sobre a comparação da expressão dos genes de relógio *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em corpo de fêmeas não poderiam ser mais diferentes em *Ae. aegypti* do que os obtidos em *Lu. longipalpis*, já que *period* é o único deles que não cicla no corpo de fêmeas do flebotomíneo (Meireles-Filho et al. 2006a; Meireles-Filho et al. 2006b).

Quanto à diferença na amplitude de ciclagem encontrada para *period* entre cabeça e corpo de fêmeas de *Ae. aegypti*, é possível que em corpo este gene esteja ciclando em algum (ou alguns) tecido(s) (relógios periféricos) da mesma forma que na cabeça (na mesma fase e amplitude), mas que em outro(s) tecido(s) esteja sendo expresso de forma constante, como acontece no caso de *period* e *timeless* no ovário de *Drosophila* (Beaver et al. 2003). Desta forma, o tecido com expressão constitutiva estaria mascarando o efeito da ciclagem de *period* nos tecidos com relógio funcional, resultando numa curva de expressão de pequena amplitude. Ainda assim, seria possível ver um padrão de ciclagem justamente devido à grande amplitude na expressão de *period* no relógio biológico de mosquito. Se for este o caso, não é descartada a hipótese de algum ou todos os outros três genes estarem ciclando em possíveis relógios periféricos, pois, como suas amplitudes são muito menores, qualquer ruído gerado acarretaria na perda de resolução da curva. Para esclarecer essa questão, seria necessária a análise da expressão gênica em tecidos específicos, começando, por exemplo, por separar ovário do restante do corpo da fêmea. Entretanto, isto ficou fora do escopo do presente trabalho.

4.2.6 – Comparação do padrão de expressão entre os genes de relógio e entre *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

Os genes *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* regulam o marcapasso central do relógio biológico em *Drosophila* ao promoverem, juntamente com as proteínas traduzidas de suas seqüências, uma alça de retro-alimentação negativa de cerca de 24 horas de duração (Hardin 2005). Nessa alça, o produto de *cycle* e *Clock*, as proteínas CYCLE e CLOCK, formam um heterodímero que atua como fator de transcrição de *period* e *timeless* (Figura 1.5). Por agir conjuntamente, precisam estar disponíveis num mesmo intervalo de tempo na célula. Nesta mosca, encontra-se *cycle* em abundância constante tanto para o RNA quanto para sua proteína (Figura 1.6), e o ritmo molecular é observado em *Clock* tanto na ciclagem de seu RNA mensageiro (Figura 1.6) quanto no padrão de fosforilação de sua proteína (Yu et al. 2006). Os genes *period* e *timeless* atuam conjuntamente e suas proteínas também formam um heterodímero. As curvas de ciclagem temporal de seus RNAs tem a mesma fase, e as de suas proteínas, poucas horas depois das curvas de RNA, apresentam sutil diferença temporal entre si (Figura 1.6).

O presente estudo não se propôs a verificar a curva de abundância das proteínas dos genes de relógio em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* e, por isso, poucas considerações podem ser feitas acerca dos mecanismos regulatórios da alça central do relógio biológico dessas espécies. Entretanto, a observação do padrão encontrado para a expressão circadiana de *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* nesses mosquitos, embasada pelos resultados das correlações entre as curvas de expressão destes genes nos diferentes tipos de amostra, induz a algumas considerações a esse respeito. Vale ressaltar de forma conjunta o que já foi afirmado nos tópicos de discussão de cada gene sobre a semelhança entre o padrão de ciclagem circadiana dos genes de relógio entre *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, em regime de claro/escuro e de escuro constante, assim como a manutenção do padrão quando em escuro constante.

As correlações mostram que, para ambas as espécies, o padrão de ciclagem dos genes é semelhante em regime de claro/escuro e escuro constante (Tabela 3.6). Quando realizada comparação interespecífica do padrão de abundância circadiana de cada gene, os cálculos de correlação também evidenciaram curvas similares para quase todos os genes, com exceção de *timeless* (Tabela 3.6), provavelmente devido a questões discutidas no item 4.2.2. Com base nos padrões de expressão observados e nessas correlações positivas e significativas, é proposta na Figura 4.1 uma representação estilizada do padrão geral de variação temporal da abundância de *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em mosquitos, ou, ao menos, na subfamília Culicinae.

A semelhança no padrão de expressão de genes de relógio entre *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* talvez explique o resultado encontrado para a proporção de atividade em dia subjetivo, representado na Figura 3.10 e discutido no item 4.1.2, onde *Cx. quinquefasciatus* parece aproximar-se do padrão de *Ae. aegypti* que, por sua vez, não muda muito daquele encontrado em regime de claro/escuro (Figura 3.5). Talvez a regulação do relógio central em ambas as espécies seja de fato muito semelhante e conservada, e representativa de um padrão ancestral de atividade diurna. Neste caso, *Cx. quinquefasciatus* teria evoluído de modo a adquirir algum mecanismo adicional que provocaria forte inibição de sua atividade na presença de luz, ou seja, o comportamento noturno seria uma característica derivada. Se for o caso, esta seria a explicação para o fenômeno observado no comportamento de *Cx. quinquefasciatus* quando mantido em escuro constante, onde tende a mudar seu padrão de atividade no sentido de tornar-se mais semelhante ao de *Ae. aegypti*.

As próximas correlações a serem discutidas são aquelas das comparações entre genes dentro de um mesmo tipo de amostra. Quer seja em regime de claro/escuro como escuro

constante, e tanto para *Ae. aegypti* (Tabela 3.1 e 3.2) quanto para *Cx. quinquefasciatus* (Tabela 3.4 e 3.5), é sugerido que *period* e *timeless* ciclem na mesma fase, bem como *cycle* e *Clock*, e que estes dois pares de genes ciclem em anti-fase um em relação ao outro. A Figura 4.1 pode ser usada como auxílio visual para o entendimento da interação entre as curvas de expressão desses quatro genes. Olhando também a Figura 1.6, é possível perceber semelhanças interessantes, com exceção de *cycle* (que não cicla em *Drosophila*), entre o padrão encontrado para mosquitos e aquele de *D. melanogaster*, discutido no início deste tópico.

A sugestão mais imediata a ser feita sobre a variação circadiana da abundância dos genes de relógio em mosquitos talvez seja a de que *period* e *timeless* estejam sendo regulados pelos mesmos fatores de transcrição, como em *Drosophila*, já que o aumento de suas expressões sempre acontece no mesmo momento. Seria possível, então, que esse fator de transcrição seja o mesmo de *Drosophila*, o heterodímero CYCLE-CLOCK, devido a *Clock* parecer ciclar em mosquito na mesma fase que em *Drosophila*. O fato de *Clock*, um componente do heterodímero que age como fator de transcrição de *period* e *timeless*, estar em sua mais baixa expressão em *Drosophila* quando esses genes começam a aumentar suas expressões, sugere mecanismos de controle pós-transcricional e/ou pós-traducional que faça com que a curva de abundância da proteína não seja coincidente com aquela do RNA, como na realidade acontece para *Drosophila* (Yu et al. 2006) e poderia estar acontecendo também em mosquitos.

Outra suposição cabível seria a de que a expressão de *cycle* e *Clock* de mosquitos estaria sob efeito de um mesmo sistema regulatório, já que suas curvas de expressão também são coincidentes. *Clock* de mosquito (Figuras 4.1) cicla em fase semelhante àquela de *Drosophila* (Figura 1.6), para a qual já são conhecidos dois genes envolvidos na sua regulação, *vriille* e *Pdp1ε*, o primeiro imputado como repressor da transcrição de *Clock* e o segundo como ativador desta (Blau e Young 1999; Cyran et al. 2003). A Figura 4.1 sugere que *Clock* e *cycle* em mosquitos estejam sob efeito de um mesmo repressor após o início do dia (ou durante o dia “subjetivo”). Estudos sobre a expressão dos genes homólogos a *vriille* e *Pdp1ε* em mosquitos trariam informações valiosas acerca desta suposição. Da mesma forma, seria de grande valia estudo em mosquitos sobre a estrutura da região promotora de *cycle* em comparação à de *Clock*, na tentativa de identificar domínios semelhantes que reforcem a possibilidade de regulação desses genes pelo mesmo sistema em mosquitos. Se for esse o caso, e indo mais longe na especulação, um subsequente estudo sobre as regiões promotoras de *Clock* e *cycle* comparando-as entre mosquitos e *Drosophila*, poderia levantar a uma

explicação sobre *cycle* não ciclar na mosca, mas sim nos mosquitos (por exemplo, perda de domínio de ligação de agentes regulatórios).

Entretanto, em flebotomíneo, a expressão de *cycle* apresenta pico no meio da fase clara (Meireles-Filho et al. 2006a) e é anterior à de *Clock*, que acontece na transição da fase clara para a fase escura (Meireles-Filho et al. 2006b). Desta forma, caso os genes *cycle* e *Clock* em mosquitos compartilhem do mesmo mecanismo regulatório, em flebotomíneo provavelmente isso não se aplica.

Considerando que os genes de relógio relacionam-se aos pares em mosquito, como o fazem em *Drosophila* (*period-timeless*; *cycle-Clock*), é interessante chamar a atenção para o fato de, em mosquitos, um componente de cada par ciclar em grande amplitude (*period* e *cycle*) enquanto o outro em pequena amplitude (*timeless* e *Clock*). É possível que os genes que ciclam em grande amplitude sejam os decisivos no conseqüente padrão de abundância do heterodímero formado por suas proteínas (se for também esse o caso em mosquitos), enquanto os de baixa amplitude representem apenas uma ciclagem acessória. Vale lembrar que no Anexo I encontram-se resultados sobre a análise da estrutura do gene *timeless* de *Ae. aegypti*, onde são identificadas várias regiões de alta similaridade com domínios conhecidos neste gene em *Drosophila*, sendo os mais conservados aqueles que codificam as regiões de interação com a proteína PERIOD. Esse fato sugere fortemente que, em mosquito, TIMELESS também forme heterodímero com PERIOD. Estudos em mosquitos sobre a seqüência de *period* auxiliariam no fortalecimento dessa hipótese. O mesmo tipo de estudo sobre a seqüência de *cycle* e *Clock* de mosquitos poderia ajudar no esclarecimento sobre a possibilidade das proteínas codificadas por esses genes também formarem heterodímero.

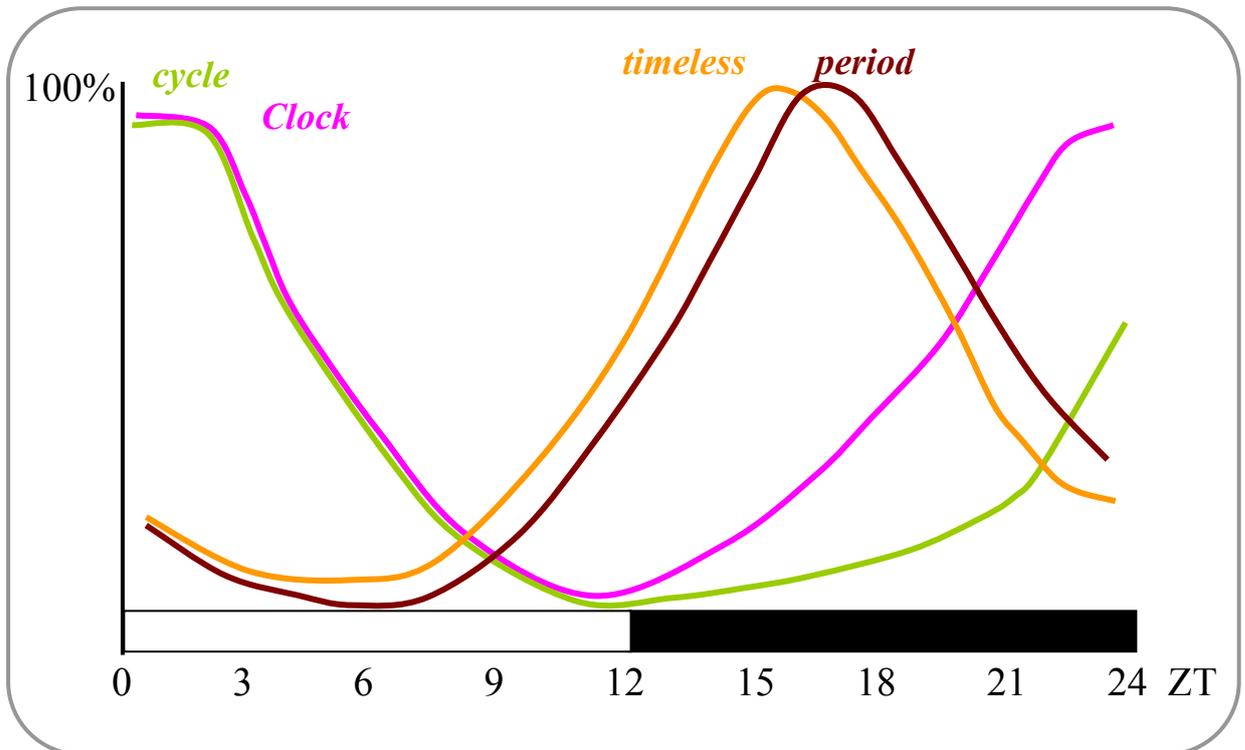


Figura 4.1: Gráfico estilizado representativo do modelo geral proposto para o padrão de variação temporal da abundância de *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em mosquitos (cabeça de fêmeas e machos), ou ao menos na subfamília Culicinae, em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. O gráfico foi confeccionado com base em aproximações a partir das curvas reais encontradas para estes genes em *Ae. aegypti*, expostas nas Figuras 3.13 a 3.16, e *Cx. quinquefasciatus*, expostas nas Figuras 3.18 a 3.21. O eixo das abscissas indica o *Zeitgeber Time* (ZT). O ZT zero é o momento em que a luz acende e o ZT 12 quando ela apaga, tendo sido a transição da luz abrupta. O eixo das ordenadas representa a abundância relativa, mas a amplitude de cada curva não está em escala real. Um gráfico dessa natureza para os resultados em escuro constante seria muito similar, salvo pela tendência de adiantamento de fase de cerca de duas horas, notado nos últimos três ou quatro pontos analisados dentro do intervalo de 24 horas (vide Figuras 3.13 a 3.16 e 3.18 a 3.21).

4.3 – Efeito da inseminação e da alimentação sangüínea na expressão dos genes de relógio *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em fêmeas de *Aedes aegypti*

O estudo do comportamento de insetos hematófagos atrai a atenção seja pela importância que o hábito de sugar sangue tem em algumas espécies na transmissão de patógenos a humanos e/ou animais quer seja pelo simples fato desse comportamento nos ser tão incômodo e difícil de ser ignorado. Por esse motivo, encontra-se na literatura vasta informação sobre o padrão de atividade de insetos hematófagos, em especial sobre culicídeos (Clements 1999). A inseminação é um dos fatores capazes de causar alteração no padrão de atividade das fêmeas de mosquitos (Chiba et al. 1992; Jones e Gubbins 1979), assim como a ingestão de sangue também exerce influência nesse comportamento (Clements 1999; Jones 1981; Jones e Gubbins 1978; Rowland 1989).

Trabalhando com *Anopheles gambiae*, Jones e Gubbins (Jones e Gubbins 1978) mostram forte efeito da inseminação na alteração do padrão de comportamento de fêmeas não alimentadas com sangue. Quando analisam o efeito conjunto da inseminação e ingestão de sangue, os autores registram forte depressão na atividade do inseto. No entanto, o efeito isolado da alimentação sangüínea não foi avaliado naquela oportunidade.

Rowland (Rowland 1989), por sua vez, encontra para *Anopheles stephensi* o mesmo forte efeito da inseminação alterando o padrão de atividade da espécie, sendo essa alteração ainda mais severa quando as fêmeas inseminadas são alimentadas com sangue. Entretanto, este autor mostra que fêmeas virgens alimentadas com sangue não modificam muito sua atividade em relação às fêmeas virgens não alimentadas.

Jones (Jones 1981) chega a resultados semelhantes em *Ae. aegypti*. Ele demonstra o forte efeito inibitório que a inseminação causa na atividade da espécie, que é potencializado quando as fêmeas estão, além de inseminadas, alimentadas com sangue. Porém, ao comparar a atividade de fêmeas virgens alimentadas com sangue com aquela de fêmeas virgens não alimentadas, ele mostra que a ingestão de sangue por si só não causa alteração expressiva no padrão de atividade. Isso faz sentido com a necessidade biológica da espécie. Afinal, não basta estar alimentada com sangue para poder desenvolver seus ovos, pois essa fêmea precisa também ser inseminada por um macho para poder completar seu ciclo reprodutivo.

Meireles-Filho e colaboradores (Meireles-Filho et al. 2006b) demonstram o efeito da ingestão de sangue no comportamento de *Lu. longipalpis*. Apesar destes autores não terem controlado a inseminação, a metodologia por eles adotada sugere que a maioria das fêmeas

estivesse inseminada (Peixoto, comunicação pessoal). Partindo deste princípio, vê-se no flebotomíneo efeito semelhante ao encontrado em *Ae. aegypti*: uma diminuição na atividade das fêmeas inseminadas e alimentadas com sangue em relação às aquelas apenas inseminadas e não alimentadas com sangue (Jones 1981; Meireles-Filho et al. 2006b).

Poucos são os estudos sobre o impacto da alimentação sanguínea no padrão de expressão gênica de insetos vetores. Entretanto, um interessante trabalho em *An. gambiae* mostra os resultados obtidos pela comparação dos transcriptomas de fêmeas não alimentadas e alimentadas com sangue (Ribeiro 2003). Neste estudo, 435 transcritos encontravam-se aumentados ou diminuídos nas fêmeas alimentadas com sangue, mas nenhum dos genes estudados no presente trabalho constam deste grupo.

Os trabalhos de Meireles-Filho e colaboradores com *Lu. longipalpis* (Meireles-Filho et al. 2006a; Meireles-Filho et al. 2006b) foram pioneiros pelo enfoque no efeito que o repasto sanguíneo causa na expressão de genes de relógio. Um dos objetivos do presente trabalho foi realizar, em mosquitos, um estudo semelhante ao daqueles autores, mas analisando não apenas o efeito do repasto sanguíneo como também o da inseminação sobre a expressão dos genes de relógio *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock*. Para tal, *Ae. aegypti* foi adotado como modelo, sendo considerados paralelamente quatro grupos de fêmeas em diferentes estados fisiológicos: fêmeas virgens (não alimentadas com sangue), inseminadas (não alimentadas com sangue), virgens alimentadas com sangue e, por último, inseminadas alimentadas com sangue. A análise da expressão gênica foi realizada em um único ponto temporal, meia hora antes do apagar das luzes e cerca de 30 horas após o repasto sanguíneo dos grupos submetidos a essa variável. Apesar de ter sido analisado apenas um único ponto, esta metodologia está de acordo com a adotada por Meireles-Filho e colaboradores (Meireles-Filho et al. 2006b).

Os resultados obtidos na verificação da expressão dos genes de relógio *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em cabeça de fêmeas de *Ae. aegypti* mostram que há inibição significativa da expressão de três deles, *period*, *timeless* e *cycle*, no ponto temporal analisado, e que ela está relacionada exclusivamente com o efeito da hematofagia (Figura 3.22). Os mesmos testes realizados nos corpos decapitados das fêmeas apontam para inibição significativa da expressão em todos os quatro genes, e, mais uma vez, relacionada exclusivamente à hematofagia (Figura 3.23). É descartada a hipótese de mudança de fase do padrão de expressão desses genes, já que eles ciclam em fases diferentes uns em relação aos outros. Se fosse caso de mudança de fase, não se esperaria encontrar efeito na mesma direção (inibição) para todos eles. A falta de relação entre inseminação e a variação da expressão dos genes de relógio em *Ae. aegypti* surpreende, uma vez que o padrão de atividade deste inseto sofre

importante alteração nas fêmeas inseminadas em relação às virgens (Clements 1999; Jones 1981).

Ao comparar os resultados do efeito da hematofagia na expressão dos genes de relógio entre *Ae. aegypti* e *Lu. longipalpis*, vê-se que *period* e *timeless* sofrem diminuição de suas expressões tanto na cabeça com nos corpos decapitados das duas espécies (Figuras 3.22 e 3.23) (Meiros-Filho et al. 2006b). *Clock* não sofre alteração nas cabeças das fêmeas de ambas as espécies, mas no corpo é inibido em *Ae. aegypti*, enquanto em *Lu. longipalpis* continua sem sofrer alteração (Figuras 3.22 e 3.23) (Meiros-Filho et al. 2006b). No caso de *cycle*, *Ae. aegypti* mostra efeito inibitório da hematofagia na expressão tanto do corpo como da cabeça (Figuras 3.22 e 3.23), enquanto em flebotomíneo não há qualquer alteração significativa na expressão de *cycle* após o repasto sangüíneo (Meiros-Filho et al. 2006a).

Para explicar o efeito da inibição específica de *period* e *timeless* em função da ingestão de sangue que Meiros-Filho e colaboradores (Meiros-Filho et al. 2006a; Meiros-Filho et al. 2006b) encontraram em *Lu. longipalpis*, esses autores propõem que o estresse oxidativo causado nos insetos pela digestão do sangue (Dansa-Petretski et al. 1995) poderia estar causando alterações no produto do gene *Clock*, a proteína CLOCK, sem afetar o perfil de transcrição deste gene. Tais alterações acarretariam no comprometimento da ligação desta proteína ao DNA, como já observado para o homólogo deste gene em mamíferos em situação de estresse oxidativo (Rutter et al. 2001). Aqueles autores partem da premissa que CLOCK atua em flebotomíneo como ativador da transcrição de *period* e *timeless*, provavelmente em conjunto com CYCLE, assim como acontece em tecidos com relógio funcional em *Drosophila*. Eles acreditam que a inibição da função de CYCLE e CLOCK como fatores de transcrição de *period* e *timeless* seria a explicação para a diminuição observada na expressão destes dois genes. Entretanto, essa hipótese, de imediato, parece adequar-se apenas ao resultado de redução de *period* e *timeless* na cabeça das fêmeas, onde os autores encontraram esses genes ciclando como em *Drosophila*. No corpo de flebotomíneo, *period* não cicla, o que sugere que sua expressão possa não estar sendo regulada da mesma forma que em tecidos com relógio funcional. Em ovário de *Drosophila*, *period* também não cicla, e foi comprovada que sua expressão constante não está sujeita à regulação pelos fatores transcricionais CYCLE e CLOCK (Beaver et al. 2003). Assumindo que o mesmo ocorra em flebotomíneo, a redução da expressão de *period* e *timeless* no corpo deste inseto após ingestão de sangue não seria causada pela perda de função de CLOCK e CYCLE. Contudo, vale lembrar que *timeless* cicla em corpo de fêmeas de flebotomíneo (Meiros-Filho et al. 2006a; Meiros-Filho et al. 2006b), sugerindo que CYCLE e CLOCK estão participando da sua regulação e que talvez

period não cicle no corpo por outros motivos, como uma possível maior estabilidade de seu RNA.

Os resultados encontrados em *Ae. aegypti* sugerem que o efeito da ingestão de sangue na inibição da expressão dos genes do relógio seja mais abrangente que em *Lu. longipalpis*, visto que o repasto sangüíneo afetou negativamente a expressão dos quatro genes no corpo e três deles na cabeça das fêmeas (Figuras 3.22 e 3.23). Através do estudo de transcriptoma em *An. gambiae*, Ribeiro (Ribeiro 2003) já havia demonstrado que o repasto sangüíneo causa alteração no padrão de expressão de muitos genes, sendo alguns aumentados e outros diminuídos após a ingestão de sangue.

Não é possível afirmar que a inibição na expressão dos genes do relógio de *Ae. aegypti* esteja diretamente associada à redução na atividade de vôo. Fêmeas virgens alimentadas com sangue apresentam redução na expressão dos genes de relógio, mas não alteram muito seu comportamento (Jones 1981). Contudo, fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas e inseminadas apresentam redução da atividade quando comparadas com fêmeas inseminadas e não alimentadas (Jones 1981). É possível que seja necessário o sinergismo entre inseminação e alimentação para que a redução na expressão dos genes do relógio, associada à ingestão de sangue, cause efeito inibitório na atividade de vôo.

4.4 – Injeção de RNA dupla-fita de *timeless* em fêmeas adultas de *Aedes aegypti*

O processo de entendimento sobre a função de um gene envolve muitos caminhos. No campo da biologia molecular, os estudos pioneiros nesse sentido foram realizados com o modelo *Drosophila*, e envolviam a indução de mutagênese e posterior isolamento de possíveis mutantes com alterações nas características desejadas. Estes mutantes eram então mapeados geneticamente e seus genes identificados. Esse processo de mapeamento da função de um gene a partir do fenótipo é conhecido como genética direta, e não só foi como ainda é muito utilizado em *Drosophila* e outros organismos, tendo sido dessa maneira que os principais genes de relógio foram identificados (Stanewsky 2003). O avanço das técnicas moleculares tornou possível a manipulação específica de genes nos organismos, dando origem às técnicas de genética reversa. Em princípio, elas compreendem a investigação da associação entre gene e fenótipo a partir da manipulação do gene e posterior avaliação do fenótipo, ou seja, o caminho reverso ao da genética direta.

O RNA de interferência é provavelmente a técnica de genética reversa mais ampla e intensamente aplicada na ciência nos últimos anos (Boudreau e Davidson 2006; Fuchs e Borkhardt 2007; Kuhn et al. 2007; Lamitina 2006; Liu et al. 2007; Meister e Tuschl 2004; Novina e Sharp 2004; Rohl e Kurreck 2006; Scaria et al. 2006; Sontheimer 2005). Ela consiste, em linhas gerais, em promover no meio celular a existência de RNA do gene de interesse em estrutura de fita dupla, o que desencadeia um processo em cascata que inicia-se pela destruição de tal RNA em fita dupla e leva à conseguinte degradação das cópias de RNA em fita simples disponíveis no meio celular complementares àquela inicial em fita-dupla, gerando um efeito de silenciamento da expressão do gene em questão (Sontheimer 2005). O método adotado para que o RNA dupla-fita torne-se disponível na célula e o tamanho do mesmo são variações da técnica.

O último objetivo deste trabalho foi tentar estabelecer a relação entre genes de relógio e comportamento em mosquitos por técnica de genética reversa, através da injeção de RNA dupla-fita em insetos adultos e posterior monitoramento da atividade locomotora. *Ae. aegypti* foi adotado como modelo e *timeless* eleito o gene a ser testado. O motivo da escolha de *timeless* reside em sua importância em *Drosophila* com o acerto do relógio (Busza et al. 2004; Emery et al. 2000; Lin et al. 2001; Naidoo et al. 1999; Rieger et al. 2003; Stanewsky et al. 1998; Suri et al. 1998), na conservação de seu padrão de expressão no grupo dos insetos (vide item 4.2.2) (o que sugere conservação de sua função) e por ter sido o primeiro cuja seqüência completa foi obtida nesse mosquito (Anexo I).

Apesar das vantagens da técnica de RNA de interferência, esta não é sempre eficaz, muitas vezes não resultando no silenciamento gênico esperado. Em alguns casos, mesmo que haja silenciamento, não detecta-se fenótipo (comunicação pessoal de alguns integrantes do grupo do Prof. Kafatos), o que pode ser causado por sistemas compensatórios que visem manter normal mecanismos que venham a ser muito importante na fisiologia do organismo. Por isso, a escolha da técnica de injeção de RNA dupla-fita em tórax de fêmeas adultas de *Ae. aegypti* na tentativa de silenciar *timeless* no cérebro do mosquito levantou algumas questões básicas. Primeiramente, pelo o que é de nosso conhecimento, nunca havia sido tentado o silenciamento de genes expressos no cérebro através de injeção de RNA dupla-fita (sintetizado *in vitro*) no tórax de mosquitos. Não era possível prever se este RNA chegaria ao cérebro. Caso lá chegasse, era preciso que o mecanismo de RNA de interferência funcionasse no cérebro de *Ae. aegypti* para este gene em questão, visto que esta não é uma regra em todos os tecidos nem para todos os genes. Entretanto, em *Antheraea pernyi*, foi encontrado nos mesmos neurônios que expressam *period*, a expressão de seqüência antisense deste gene,

ciclando em anti-fase àquela de *period* (Sauman e Reppert 1996). Os autores sugerem que o sistema de RNA de interferência esteja sendo naturalmente utilizado pela célula como parte do mecanismo de regulação do padrão de ciclagem circadiana da abundância de *period* nos neurônios com relógio funcional. Ainda, um estudo em *Drosophila* mostra resultado encorajador, onde uma linhagem transgênica expressando RNA dupla-fita de *period* resultou em redução da expressão endógena deste gene (Martinek e Young 2000). Porém, tratava-se de um transgênico estável, expressando o RNA dupla-fita nas células alvo do silenciamento, o que é muito diferente de depender de que a molécula injetada no tórax surta o mesmo efeito. Mas a principal pergunta, referente à essência da proposta em aplicar a técnica, poderia responder todas as outras: O silenciamento de *timeless* no cérebro de *Ae. aegypti* por técnica de RNA de interferência resulta em mudança do padrão de comportamento da espécie? Afinal, em última análise, a busca da técnica de genética reversa é por um padrão alterado do fenótipo.

4.4.1 – Efeito da injeção de RNA dupla-fita na expressão de *timeless*

O primeiro resultado que chama a atenção é a diferença altamente significativa na expressão de *timeless* entre o grupo injetado com RNA dupla-fita de *timeless* e o grupo controle (Tabela 3.7A). Recorrendo à Figura 3.24, nota-se que tal efeito é no sentido da diminuição da expressão do gene, o que está de acordo com o efeito esperado de silenciamento causado por RNA de interferência resultante da injeção de RNA dupla-fita de *timeless*.

Análise estatística dos resultados sugere que o efeito do RNAi no silenciamento da expressão de *timeless* acontece no quarto dia após a injeção do RNA dupla-fita (Tabela 3.7B). A detecção de silenciamento no quarto dia após a injeção do RNA dupla-fita está de acordo com o que é mais frequentemente encontrado por outros autores trabalhando com essa técnica em mosquitos. Em certas oportunidades, os grupos simplificam seus resultados relatando apenas a análise do fenótipo no quarto dia após a injeção, por ser sabidamente este o dia mais propenso à detecção de resultados esperados (Abraham et al. 2005; Blandin et al. 2004; Michel et al. 2005). De acordo com a Figura 3.24, a queda da expressão de *timeless* do terceiro para o quarto dia após a injeção é de cerca de 50-60% no corpo das fêmeas e de cerca de 70-80% na cabeça. No entanto, embora diferenças significativas no nível da expressão de

timeless sejam observadas entre cabeça e corpo (Tabela 3.7A)⁹, a interação entre o material injetado e parte do corpo não foi significativa (Tabela 3.7B). Isto implica em dizer que a relação da expressão de *timeless* entre cabeça e corpo é mantida entre grupo injetado com RNA dupla-fita de *timeless* e grupo controle. Em outras palavras, quando há um silenciamento, ele acontece igualmente tanto na cabeça quanto no corpo. Essa informação é muito importante, pois indica não apenas que o mecanismo de RNA de interferência está sendo eficaz, mas, principalmente, que o RNA dupla-fita injetado no tórax do inseto consegue chegar ao cérebro e desencadear o silenciamento, detectado no quarto dia após a injeção, assim como o faz no corpo. Trata-se de um aspecto fundamental para o estudo em questão, uma vez que a regulação do relógio central acontece no cérebro e espera-se ser necessário um silenciamento nesse tecido para a detecção de fenótipo alterado de comportamento.

Concluindo, a injeção de RNA dupla-fita de *timeless* em tórax de *Ae. aegypti* repercute em redução da abundância deste gene no quarto dia após a injeção, tanto no corpo quanto na cabeça, da ordem de 50%. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Martinek e Young (2000), que conseguiram uma redução na expressão de *period* de cerca de 50% na cabeça de *Drosophila* mutante expressando RNA dupla-fita deste gene. Esses autores relatam, contudo, um aumento da abundância relativa no momento de menor expressão do gene silenciado, mas não é possível dizer se o mesmo acontece no silenciamento de *timeless* em *Ae. aegypti* por injeção no tórax de adultos porque, na presente oportunidade, a expressão foi analisada apenas no final da fotofase, onde ela já está em ascensão (Figura 3.14A). Vale ainda comentar que esses autores encontraram discreta redução na expressão de *timeless* e sugerem tratar-se de consequência secundária ao silenciamento de *period*. Seria interessante aprofundar os experimentos sobre o silenciamento de *timeless* em *Ae. aegypti* verificando se o mesmo também não repercutiria na expressão de outros genes de relógio.

Nenhum efeito significativo foi observado entre as duas diferentes injeções (Tabela 3.7A), nem na interação destas com os outros fatores (Tabelas 3.7B,C e D). A importância desse resultado é mostrar não apenas a reprodutibilidade em dois experimentos independentes do silenciamento de *timeless* no quarto dia após a injeção, mas que ele é estatisticamente o mesmo (e na mesma direção – vide Figura 3.24) independentemente dos mosquitos serem mantidos em regime de claro/escuro (1ª injeção) ou escuro constante (2ª injeção).

Um resultado inesperado foi o valor significativo para a análise de variância da expressão de *timeless* entre o terceiro e quarto dia após injeção, independente de qualquer

⁹ Essa informação significa apenas que a quantidade relativa de *timeless* em relação ao *rp49* (controle interno) é diferente na cabeça e no corpo. Ela é maior na cabeça do que no corpo, apesar dessa informação não ser fornecida nos resultados.

outro fator (Tabela 3.7A). Apesar da Figura 3.24 não mostrar esse resultado, a direção da diferença do terceiro para o quarto dia foi de diminuição da expressão do gene. Análise de variância considerando a interação de dois fatores (Tabela 3.7B) mostra que esse efeito de queda de expressão de *timeless* do terceiro para o quarto dia é o mesmo em ambas as injeções, mas é diferente entre cabeça e corpo (Tabela 3.7B), sendo mais expressivo na cabeça do que no corpo (outra informação não representada na Figura 3.24). Isso é interessante porque é justamente na cabeça que fica a regulação do relógio biológico que controla os ritmos circadianos de atividade. A diferença não significativa na expressão de *timeless* ao considerar a interação entre dia após a injeção, parte do corpo e material injetado mostra que o efeito comentado anteriormente é igual nos dois grupos (Tabela 3.7C). De qualquer forma, como mencionado acima, o efeito de diminuição da expressão de *timeless* do terceiro para o quarto dia é mais intenso no grupo injetado com RNA dupla-fita de *timeless*, como comprova a análise de variância entre esses dois fatores (Tabela 3.7B) interpretada conjuntamente com a Figura 3.24. Isso comprova a eficácia da injeção de RNA dupla-fita de *timeless* no silenciamento do gene.

Entretanto, é difícil explicar o efeito geral, incluindo no grupo controle, de queda da expressão de *timeless* do terceiro para o quarto dia, mais expressiva na cabeça. Uma justificativa para esse fato teria que envolver um efeito inespecífico da injeção, causado pelo ferimento que ela impinge no mosquito, ou causado pela introdução de um RNA dupla-fita de qualquer natureza no corpo do inseto. Seja num ou noutro caso, poderia estar havendo dois tipos de efeito: a simples diminuição da expressão de *timeless* de um dia para o outro ou uma mudança de fase na expressão deste gene. Não se pode descartar, ainda, a possibilidade de o efeito inespecífico estar causando uma menor expressão no terceiro dia do *rp49*, gene usado como normalizador interno. O esclarecimento sobre essas possibilidades não pode ser fornecido com os resultados do presente estudo, e carece de investigação detalhada nesse sentido, além do escopo deste trabalho.

4.4.2 – Efeito da injeção de RNA dupla-fita na atividade locomotora

A Figura 3.25 mostra o resultado do monitoramento da atividade dos dois experimentos de RNA de interferência. Ao comparar o resultado da atividade do grupo controle (injetado com RNA dupla-fita de *LacZ*) com aqueles de fêmeas não injetadas, nas Figuras 3.1A e 3.6A, percebe-se perfil de atividade semelhante, sugerindo que os mosquitos estariam recuperando-se bem do processo de injeção a ponto de retomarem o padrão de atividade normal da espécie, e que a injeção de RNA dupla-fita não desencadearia processo de resposta inespecífica que resultasse em efeito no comportamento. Na realidade, comparando o perfil da atividade do grupo controle com o grupo injetado com RNA dupla-fita de *timeless*, não se percebe muita diferença entre eles, o que é reforçado pela análise de variância considerando o tempo total de monitoramento (Tabela 3.8). Nota-se, contudo, diferença significativa na atividade entre os dois experimentos independentes, mostrando que o regime de luz influi na quantidade de atividade de *Ae. aegypti* (Tabela 3.8).

Ao analisar individualmente cada dia após a injeção, entretanto, para o quarto dia após a injeção foi encontrada diferença significativa na quantidade de atividade não apenas em relação ao regime de luz, mas também na interação entre material injetado e regime de luz (Tabela 3.9A). Este resultado mostra ser estatisticamente significativa a diferença visual observada nos gráficos para este dia (Figuras 3.25 e 3.26), onde o grupo injetado com RNA dupla-fita de *timeless* apresenta aumento da quantidade de atividade em relação ao grupo controle quando em regime de claro/escuro, mas diminuição quando em regime de escuro constante. Apesar da sugestão visual nos gráficos (Figuras 3.25 e 3.26) para um efeito similar ao do quarto dia no caso do quinto dia após a segunda injeção, os cálculos estatísticos não mostram qualquer diferença significativa na atividade quanto à natureza do material injetado (Tabela 3.9B).

O resultado do monitoramento da atividade dos mosquitos da segunda injeção (mantidos em escuro constante) foi aproveitado na avaliação do efeito da injeção de RNA dupla-fita no período de atividade em livre-curso (τ) de *Ae. aegypti*. Os dados utilizados nesta análise foram os mesmos usados na confecção da Figura 3.26B, ou seja, valores percentuais de indivíduos ativos (e tratados com média móvel de três pontos). Com base na atividade dos cinco dias em escuro constante, os cálculos de autocorrelação indicam não haver diferença no período de atividade em livre-curso (τ) de *Ae. aegypti* injetado com RNA dupla-fita de *LacZ* (Figura 3.27) em relação a indivíduos não injetados (vide item 4.1.2 e Figura 3.11), uma vez

que manteve-se com duração de 22 horas e 30 minutos. O grupo injetado com RNA dupla-fita de *timeless*, por sua vez, mostra um atraso de uma hora nesse período, com τ igual a pelo menos 23 horas e 30 minutos (Figura 3.28).

A comparação entre as autocorrelações dos dois grupos de mosquitos injetados é realizada com maior detalhe na Figura 3.29, onde o primeiro “sino” de valores positivos dos gráficos de autocorrelação de cada grupo é sobreposto. Nota-se de forma mais evidente a diferença de dois a três *lags* entre os picos das duas curvas. Uma vez que a leitura de atividade era realizada a cada 30 minutos, essa diferença de *lags* corresponde a uma diferença de uma hora à uma hora e meia entre os τ . Ainda que seja adotada a interpretação mais conservadora, há uma diferença de uma hora entre eles. Mais que isso, a Figura 3.29 ilustra um alargamento do “sino” referente ao grupo injetado com RNA dupla-fita de *timeless*, e um alargamento unidirecional, pois acontece apenas para o lado direito do gráfico, no sentido que torna τ ainda maior. Isso sugere que a injeção com RNA dupla-fita de *timeless* estaria aumentando a variabilidade do τ entre os indivíduos, mas sempre no sentido de torna-lo mais longo do que aquele dos indivíduos do grupo controle.

Esse resultado está de acordo com o esperado, tendo como base os estudos em *Drosophila* onde a expressão de *timeless* é diminuída de alguma forma. Um exemplo é o estudo sobre de manipulação gênica da região promotora de *timeless*, onde os autores mostraram que a falta de segmentos específicos da mesma acarretam em diminuição da amplitude de ciclagem de *timeless* e conseqüente aumento do τ (McDonald et al. 2001). Outro caso é o estudo e silenciamento de *period* em *Drosophila* (Martinek e Young 2000), onde a diminuição da expressão de *period* causa diminuição na expressão de *timeless* e aumento do τ .

4.4.3 – Considerações finais sobre os resultados da técnica de RNA de interferência em *Aedes aegypti*

Os resultados obtidos quanto à atividade e expressão gênica respondem questões importantes sobre a técnica utilizada de RNA de interferência para silenciamento de gene de relógio biológico. Ao que tudo indica, o RNA dupla-fita injetado no tórax de mosquitos adultos foi capaz de circular pelo corpo do inseto (chegando inclusive na cabeça) e desencadear processo de silenciamento de *timeless* tanto no corpo como na cabeça de *Ae. aegypti*. Esse silenciamento é significativo no quarto dia após a injeção e acontece em

resposta específica à injeção de RNA dupla-fita de *timeless* (Figuras 3.29 e Tabela 3.9). Contudo, o resultado mais interessante é o silenciamento parecer estar de fato repercutindo no comportamento do inseto (Figuras 3.24 e 3.25, e Tabela 3.8A), pois o quarto dia após a injeção é justamente aquele no qual foi registrada diferença significativa da atividade entre o grupo injetado com RNA dupla-fita de *timeless* e o grupo controle. A injeção do RNA dupla-fita de *timeless* surtiu efeito significativo na expressão deste gene no quarto dia após a injeção nos dois experimentos independentes realizados e ele foi na mesma direção, ou seja, diminuição da expressão. Apesar disso, não é o que aconteceu com a atividade conseqüente deste silenciamento. Em regime de claro/escuro o silenciamento de *timeless* promoveu um aumento da atividade do inseto, enquanto em regime de escuro constante promoveu redução da mesma. Esta observação pode ter conseqüências muito importantes no entendimento sobre o funcionamento do relógio biológico em mosquitos, e sugere uma relação direta ou indireta entre luz, comportamento e expressão de *timeless*.

Apesar de não ter sido testado o efeito da injeção sobre a expressão de *timeless* após o quarto dia, é provável que o efeito de silenciamento seja transiente. Isso porque, no terceiro dia, ele ainda não existe (Figura 3.24 e Tabela 3.7). No quarto dia, quando é significativo (Figura 3.24 e Tabela 3.7), repercute na atividade (Figuras 3.25A e 3.26A e Tabela 3.9A). No quinto dia, já não se vê diferença na atividade entre grupo injetado com RNA dupla-fita de *timeless* e grupo controle (Tabela 3.9B). Este resultado sugere que a alteração do padrão de expressão gênica causado pela injeção (silenciamento) já tenha diminuído a partir do quinto dia. Entretanto, o relógio circadiano é um mecanismo de autoregulação com redundâncias para manter sua robustez. Conseqüentemente, não é impossível que a queda na expressão de *timeless* observada no quarto dia (e correspondente alteração da atividade) seja prontamente compensada nos ciclos seguintes pela alteração da expressão dos outros genes do marcapasso, de modo a restituir o padrão de atividade normal sem necessariamente recuperar imediatamente o padrão de expressão normal de *timeless*.

Os resultados obtidos apontam para a possibilidade e necessidade da continuação dos estudos de expressão de genes de relógio em mosquitos com uso de técnica de RNA de interferência. Além disso, o presente trabalho mostra a eficácia da técnica de injeção de RNA dupla-fita em mosquitos adulto para silenciamento da expressão gênica tanto no corpo como no cérebro do inseto. Desta forma, abrem-se portas para muitos estudos sobre regulação de expressão gênica sem a necessidade da geração de linhagens transgênicas estáveis, o que vem a ser particularmente interessante em casos de genes envolvidos em etapas de

desenvolvimento, ou para grupos de pesquisa que não disponham de insetários apropriados para criação de linhagens geneticamente modificadas.

5. Conclusões

Com base nos resultados dos experimentos conduzidos com as linhagens de mosquito *Ae. aegypti* Rockefeller e *Cx. quinquefasciatus* IBEx no decurso dos quatro anos deste projeto de Doutorado e conseguinte discussão com a literatura disponível, foi possível chegar às seguintes conclusões:

- Em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, *Ae. aegypti* apresentou perfil de atividade diurna bimodal, mas em escuro constante passou a unimodal, com pico apenas no final do dia subjetivo.
- *Cx. quinquefasciatus* mantido em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro apresenta ritmo de atividade noturno unimodal, com pico logo após a transição da fase clara para fase escura, e este padrão é mantido quando as condições mudam para escuro constante.
- O período em livre-curso (τ) de *Ae. aegypti* é de 22,5 horas e o de *Cx. quinquefasciatus* é provavelmente próximo ou um pouco superior a este valor.
- Em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, a proporção de horas de atividade diurna de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* é diametralmente oposta.
- Em escuro constante, a diferença na proporção de horas de atividade durante o dia subjetivo entre *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* diminui devido a uma mudança no padrão de atividade desta última espécie, mas ainda mantém-se estatisticamente significativa.
- O perfil de expressão temporal de *period* em cabeça de insetos em regime de claro/escuro é semelhante em todas as espécies para as quais há informação disponível (mosquitos, várias moscas, mariposas, borboleta, abelha, barata e flebótomo), independentemente do padrão de atividade/repouso que apresentem. Em todas as espécies, *period* cicla e apresenta pico na transição de claro para escuro ou poucas

horas após a mesma. A amplitude da abundância relativa, entretanto, varia, sendo a dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* as maiores já reportadas.

- O perfil de expressão temporal de *timeless* em cabeça de fêmeas (ou machos inteiros) em regime de claro/escuro é semelhante em todas as espécies para as quais há informação disponível (mosquitos, moscas, mariposa e flebótomo), independentemente do padrão de atividade/repouso que apresentem. Em todas as espécies, *timeless* cicla e apresenta pico na transição ou poucas horas após a transição de claro para escuro.
- Dentre os insetos até hoje analisados quanto ao padrão temporal da expressão do gene *cycle*, apenas em moscas ele não cicla. Resultados em abelha, flebotomíneo e, agora, em mosquitos mostram este gene ciclando em cabeça de fêmeas (e machos inteiros, no caso de *Ae. aegypti* e flebotomíneo), em fase oposta à *timeless* e *period*. Resultados da expressão de *cycle* em cabeça de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, e ainda em machos inteiros para a primeira espécie, mostram a maior amplitude de ciclagem circadiana já registrada para *cycle*.
- Apesar da análise estatística não comprovar variação temporal na expressão de *Clock* em cabeça de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, a comparação dos gráficos sugere, para ambas as espécies, ciclagem em fase oposta à *period* e *timeless*, como em *Drosophila*, e semelhante àquela de *cycle* dos próprios mosquitos.
- *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* apresentam padrão semelhante de expressão rítmica para os genes de relógio *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* em regime de 12 horas de claro e 12 horas, que são mantidos quando em escuro constante.
- Nos corpos decapitados das fêmeas de *Ae. aegypti*, apenas *period* apresenta variação temporal significativa de sua expressão. Esta tem correlação positiva com a curva encontrada nas cabeças, ainda que em amplitude cerca de dez vezes menor.
- Os genes *timeless* e *cycle* ciclam na mesma fase em regime de claro/escuro em cabeça de fêmeas de *Ae. aegypti* e machos dessa espécie.

- A ingestão de sangue em *Ae. aegypti* acarreta na inibição da expressão dos genes *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* tanto na cabeça como no corpo. A inseminação não acarretou em mudanças significativas na expressão destes genes.
- Foi demonstrada a eficácia da técnica de RNA de interferência no silenciamento da expressão de *timeless* por injeção de RNA dupla-fita deste gene no tórax de fêmeas adultas de *Ae. aegypti*. O silenciamento foi efetivo no quarto dia após a injeção, tanto em mosquitos mantidos em regime de claro/escuro como nos mantidos em escuro constante, e de forma equivalente no corpo e na cabeça do inseto.
- Silenciamento da expressão de *timeless* através de RNA de interferência causa aumento do período em livre-curso e altera também a quantidade da atividade, que é ligeiramente aumentada em regime de claro/escuro e diminuída em regime de escuro constante.

Referências Bibliográficas

- Abraham EG, Pinto SB, Ghosh A, Vanlandingham DL, Budd A, Higgs S, Kafatos FC, Jacobs-Lorena M and Michel K (2005) An immune-responsive serpin, SRPN6, mediates mosquito defense against malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16327-16332.
- Allada R, White NE, So WV, Hall JC and Rosbash M (1998) A mutant *Drosophila* homolog of mammalian *Clock* disrupts circadian rhythms and transcription of *period* and *timeless*. *Cell* 93:791-804.
- An X, Wilkes K, Bastian Y, Morrow JL, Frommer M and Raphael KA (2002) The *period* gene in two species of tephritid fruit fly differentiated by mating behaviour. *Insect Mol Biol* 11:419-430.
- Anderson JF and Main AJ (2006) Importance of vertical and horizontal transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* in the Northeastern United States. *J Infect Dis* 194:1577-1579.
- Applied-Biosystems (1997) User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression.
- Applied-Biosystems (2004) Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR.
- Aschoff J (1963) Comparative physiology: diurnal rhythms. *Annual review of physiology* 25:581-600.
- Ashmore LJ, Sathyanarayanan S, Silvestre DW, Emerson MM, Schotland P and Sehgal A (2003) Novel insights into the regulation of the *timeless* protein. *J Neurosci* 23:7810-7819.
- Bae K, Lee C, Hardin PE and Edery I (2000) dCLOCK is present in limiting amounts and likely mediates daily interactions between the dCLOCK-CYC transcription factor and the PER-TIM complex. *J Neurosci* 20:1746-1753.
- Bae K, Lee C, Sidote D, Chuang KY and Edery I (1998) Circadian regulation of a *Drosophila* homolog of the mammalian *Clock* gene: PER and TIM function as positive regulators. *Mol Cell Biol* 18:6142-6151.
- Bargiello TA, Saez L, Baylies MK, Gasic G, Young MW and Spray DC (1987) The *Drosophila* clock gene *per* affects intercellular junctional communication. *Nature* 328:686-691.
- Bargiello TA and Young MW (1984) Molecular genetics of a biological clock in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:2142-2146.
- Bates M (1941) Laboratory observations on the sexual behaviour of anopheline mosquitoes. *J exp Zool* 86:153-173.
- Beaver LM, Gvakharia BO, Vollintine TS, Hege DM, Stanewsky R and Giebultowicz JM (2002) Loss of circadian clock function decreases reproductive fitness in males of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2134-2139.
- Beaver LM, Rush BL, Gvakharia BO and Giebultowicz JM (2003) Noncircadian regulation and function of clock genes *period* and *timeless* in oogenesis of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms* 18:463-472.
- Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL and Zoran MJ (2005) Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet* 6:544-556.
- Ben-Shlomo R and Kyriacou CP (2002) Circadian rhythm entrainment in flies and mammals. *Cell Biochem Biophys* 37:141-156.

- Benna C, Scannapieco P, Piccin A, Sandrelli F, Zordan M, Rosato E, Kyriacou CP, Valle G and Costa R (2000) A second *timeless* gene in *Drosophila* shares greater sequence similarity with mammalian *tim*. *Curr Biol* 10:R512-513.
- Bennet-Clark HC (1984) A particle velocity microphone for the song of small insects and other acoustic measurements. *J Exp Biol* 108:459-463.
- Berry WJ, Rowley WA and Christensen BM (1986) Influence of developing *Brugia pahangi* on spontaneous flight activity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 23:441-445.
- Berry WJ, Rowley WA and Christensen BM (1987a) Influence of developing *Dirofilaria immitis* on the spontaneous flight activity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 24:699-701.
- Berry WJ, Rowley WA and Christensen BM (1988) Spontaneous flight activity of *Aedes trivittatus* infected with *Dirofilaria immitis*. *J Parasitol* 74:970-974.
- Berry WJ, Rowley WA, Clarke JL, 3rd, Swack NS and Hausler WJ, Jr. (1987b) Spontaneous flight activity of *Aedes trivittatus* (Diptera: Culicidae) infected with trivittatus virus (Bunyaviridae: California serogroup). *J Med Entomol* 24:286-289.
- Blandin S, Moita LF, Kocher T, Wilm M, Kafatos FC and Levashina EA (2002) Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the *Defensin* gene. *EMBO Rep* 3:852-856.
- Blandin S, Shiao SH, Moita LF, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC and Levashina EA (2004) Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell* 116:661-670.
- Blau J and Young MW (1999) Cycling *vriille* expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell* 99:661-671.
- Borror, Triplehorn CA and Johnson NF (1989) *An introduction to the study of Insects*, Harcourt Brace College, Philadelphia.
- Boudreau RL and Davidson BL (2006) RNAi therapy for neurodegenerative diseases. *Curr Top Dev Biol* 75:73-92.
- Brown AE, Bugeon L, Crisanti A and Catteruccia F (2003a) Stable and heritable gene silencing in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Nucleic Acids Res* 31:e85.
- Brown AE, Crisanti A and Catteruccia F (2003b) Comparative analysis of DNA vectors at mediating RNAi in *Anopheles* mosquito cells and larvae. *J Exp Biol* 206:1817-1823.
- Brown FA (1960) Response to pervasive geophysical factors and the biological clock problem. *Cold Spring Harbor Symp quant Biol* 25:57-71.
- 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.
- Chang DC, McWatters HG, Williams JA, Gotter AL, Levine JD and Reppert SM (2003) Constructing a feedback loop with circadian clock molecules from the silkworm, *Antheraea pernyi*. *J Biol Chem* 278:38149-38158.
- Chiba Y (1964) The diurnal activity of the mosquito, *Culex pipiens pallens*, in relation to light condition. 1. Activity under the continuous light condition. *Sci Rep Tôhoku Univ Ser 4 Biology* 30:67-75.
- Chiba Y, Kubota M and Nakamura Y (1982) Differential effects of temperature upon evening and morning peaks in the circadian activity of mosquitoes, *Culex pipiens pallens* and *Culex pipiens molestus*. *J Interdisc Cycle Res* 13:55-60.
- Chiba Y, Shinkawa Y, Yoshii M, Matsumoto A, Tomioka K and Takahashi SY (1992) A comparative study on insemination dependency of circadian activity pattern in mosquitoes. *Physiol Entomol* 17:213-218.

- Chiba Y and Tomioka K (1992) Entrainability of diphasic circadian activity of the mosquito, *Culex pipiens molestus*, to 24-hour light-dark cycles: A physiological significance of critical light-dark ratio. *Zool Sci (Tokyo)* 9:185-192.
- Chiba Y, Uki M, Kawasaki Y, Matsumoto A and Tomioka K (1993) Entrainability of circadian activity of the mosquito *Culex pipiens pallens* to 24-hr temperature cycles, with special reference to involvement of multiple oscillators. *J Biol Rhythms* 8:211-220.
- Chiba Y, Yamakado C and Kubota M (1981) Circadian activity of the mosquito *Culex pipiens molestus* in comparison with its subspecies *Culex pipiens pallens*. *Int J Chronobiol* 7:153-164.
- Chiba Y, Yamamoto Y, Shimizu C, Zaitzu M, Uki M, Yoshii M and Tomioka K (1990) Insemination-dependent modification of circadian activity of the mosquito *Culex pipiens pallens*. *Zool Sci (Tokyo)* 7:895-906.
- Christensen ND and Lewis RD (1982) The circadian locomotor rhythm of *Hemideina thoracica* (Orthoptera; Stenopelmatidae): the circadian clock as a population of interacting oscillators. *Physiol Ent* 7:1-13.
- Christophers RS (1960) *Aedes aegypti: the yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure.*, Cambridge University Press.
- Clements AN (1999) *The biology of mosquitoes. Vol. 2. Sensory reception and behaviour.*, CABI Publishing, New York.
- Clopton JR (1984) Mosquito circadian flight rhythms: differential effects of constant light. *Am J Physiol* 247:R960-967.
- Cockell CS and Rothschild LJ (1999) The effects of UV radiation A and B on diurnal variation in photosynthesis in three taxonomically and ecologically diverse microbial mats. *Photochem Photobiol* 69:203-210.
- Consoli RAGB and Lourenço-de-Oliveira R (1994) *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.*, Fiocruz., Rio de Janeiro.
- Cooper GM (2000) *The Cell - A Molecular Approach*, Sinauer Associates, Massachusetts.
- Costas EGGS, Lopez-Rodas V and Aguilera A (1996) The influence of the slowing of the earth's rotation: A hypothesis to explain cell division synchrony under different day duration in earlier and later evolved unicellular algae. *Helgol Meeresunters* 50:117-130.
- Crosskey RW (1988) Old Tools and new taxonomic problems in bloodsucking insects. In *Biosystematics of Haematophagous Insects*, pp 1-18., Clarendon Press., Oxford.
- Cyran SA, Buchsbaum AM, Reddy KL, Lin MC, Glossop NR, Hardin PE, Young MW, Storti RV and Blau J (2003) *vriille*, *Pdp1*, and *dClock* form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 112:329-341.
- Daan S and Berde C (1978) Two coupled oscillators: simulations of the circadian pacemaker in mammalian activity rhythms. *J Theor Biol* 70:297-313.
- Dansa-Petretski M, Ribeiro JM, Atella GC, Masuda H and Oliveira PL (1995) Antioxidant role of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein. Protection against heme-induced lipid peroxidation. *J Biol Chem* 270:10893-10896.
- Darlington TK, Wager-Smith K, Ceriani MF, Staknis D, Gekakis N, Steeves TD, Weitz CJ, Takahashi JS and Kay SA (1998) Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* 280:1599-1603.
- Dunlap JC (1999) Molecular Bases for Circadian Clocks. *Cell* 96:271-290.
- Dvornyk V, Vinogradova O and Nevo E (2003) Origin and evolution of circadian clock genes in prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2495-2500.
- Edery I, Zwiebel LJ, Dembinska ME and Rosbash M (1994) Temporal phosphorylation of the *Drosophila* period protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2260-2264.
- Edmunds LN and Laval-Martin DL (1984) Cell division cycles and circadian oscillators in *Euglena*. *Chronobiol Int* 1:1-9.

- Elizondo-Quiroga D, Davis CT, Fernandez-Salas I, Escobar-Lopez R, Velasco Olmos D, Soto Gastalum LC, Aviles Acosta M, Elizondo-Quiroga A, Gonzalez-Rojas JI, Contreras Cordero JF, Guzman H, Travassos da Rosa A, Blitvich BJ, Barrett AD, Beaty BJ and Tesh RB (2005) West Nile Virus isolation in human and mosquitoes, Mexico. *Emerg Infect Dis* 11:1449-1452.
- Elliott R (1972) The influence of vector behavior on malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg* 21:755-763.
- Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC and Rosbash M (1998) CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95:669-679.
- Emery P, Stanewsky R, Helfrich-Forster C, Emery-Le M, Hall JC and Rosbash M (2000) *Drosophila* CRY is a deep brain circadian photoreceptor. *Neuron* 26:493-504.
- Fitch WM (2000) Homology a personal view on some of the problems. *Trends Genet* 16:227-231.
- Forattini OP (2002) *Culicidologia Médica. Vol 2: Identificação, Biologia, Epidemiologia*, Edusp - Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Forattini OP, Kakitani I, Massad E and Mauricci D (1996) Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 12- Host-seeking behaviour of *Anopheles albiparvus* s. l. in South-Eastern Brazil. *Rev Saúde Pública* 30:299-303.
- Foster R and Kreitzman L (2005) *Rhythms of life: The biological clocks that control the daily lives of every living thing.*, Profile books Ltd, London.
- Froy O, Gotter AL, Casselman AL and Reppert SM (2003) Illuminating the circadian clock in monarch butterfly migration. *Science* 300:1303-1305.
- Fuchs U and Borkhardt A (2007) The application of siRNA technology to cancer biology discovery. *Adv Cancer Res* 96:75-102.
- Gehring W and Rosbash M (2003) The coevolution of blue-light photoreception and circadian rhythms. *J Mol Evol* 57 Suppl 1:S286-289.
- Gekakis N, Saez L, Delahaye-Brown AM, Myers MP, Sehgal A, Young MW and Weitz CJ (1995) Isolation of *timeless* by PER protein interaction: defective interaction between *timeless* protein and long-period mutant PERL. *Science* 270:811-815.
- Gentile C, Meireles-Filho AC, Britto C, Lima JB, Valle D and Peixoto AA (2006) Cloning and daily expression of the *timeless* gene in *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *Insect Biochem Mol Biol* 36:878-884.
- George H and Terracol R (1997) The *vriille* gene of *Drosophila* is a maternal enhancer of decapentaplegic and encodes a new member of the bZIP family of transcription factors. *Genetics* 146:1345-1363.
- Gesto JSM (2006) Genética molecular do gene *Clock* em insetos vetores. In *Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular*, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- Gillet JD (1971) *Mosquitos*, Weidenfeld and Nicolson, London.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R and Mathieu C (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25:386-401.
- Glaser FT and Stanewsky R (2005) Temperature synchronization of the *Drosophila* circadian clock. *Curr Biol* 15:1352-1363.
- Glossop NR, Houl JH, Zheng H, Ng FS, Dudek SM and Hardin PE (2003) VRILLE feeds back to control circadian transcription of Clock in the *Drosophila* circadian oscillator. *Neuron* 37:249-261.
- Glossop NR, Lyons LC and Hardin PE (1999) Interlocked feedback loops within the *Drosophila* circadian oscillator. *Science* 286:766-768.

- Goto SG and Denlinger DL (2002) Short-day and long-day expression patterns of genes involved in the flesh fly clock mechanism: *period*, *timeless*, *cycle* and *cryptochrome*. *J Insect Physiol* 48:803-816.
- Gotter AL, Manganaro T, Weaver DR, Kolakowski LF, Jr., Possidente B, Sriram S, MacLaughlin DT and Reppert SM (2000) A time-less function for mouse *timeless*. *Nat Neurosci* 3:755-756.
- Guimaraes AE, de Mello RP, Lopes CM, Alencar J and Gentile C (1997) Prevalence of Anophelines (Diptera: Culicidae) during sunset in areas of the Itaipu Hydroelectric plant in Guaira county, state of Parana, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92:745-754.
- Guimaraes AE, Gentile C, Alencar J, Lopes CM and de Mello RP (2004) Ecology of Anopheline (Diptera, Culicidae), malaria vectors around the Serra da Mesa Reservoir, State of Goias, Brazil. I--Frequency and climatic factors. *Cad Saude Publica* 20:291-302.
- Guimaraes AE, Gentile C, Lopes CM and Mello RP (2000a) Ecology of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in areas of Serra do Mar State Park, State of Sao Paulo, Brazil. II - habitat distribution. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95:17-28.
- Guimaraes AE, Gentile C, Lopes CM and Mello RP (2000) Ecology of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in areas of Serra do Mar State Park, State of São Paulo, Brazil. III - Daily biting rhythms and lunar cycle influence. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95:753-760.
- Guimaraes AE, Gentile C, Lopes CM and Sant'Anna A (2001) [Ecology of mosquitoes in areas of the National Park of "Serra da Bocaina", Brazil: II - Monthly frequency and climatic factors]. *Rev Saude Publica* 35:392-399.
- Guimaraes AE, Mello RP, Lopes CM and Gentile C (2000b) Ecology of mosquitoes (Diptera: culicidae) in areas of Serra do Mar State Park, State of Sao Paulo, Brazil. I - monthly frequency and climatic factors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95:1-16.
- Gvakharia BO, Kilgore JA, Bebas P and Giebultowicz JM (2000) Temporal and spatial expression of the *period* gene in the reproductive system of the codling moth. *J Biol Rhythms* 15:4-12.
- Haddow AJ (1954) Studies of the biting-habits of african mosquitos. An appraisal of methods employed, with special reference to the twenty-four-hour catch. *Bull Ent Res* 45:199-242.
- Haddow AJ (1960) Studies on the biting habits and medical importance of east African mosquitos in the genus *Aedes*. I- Subgenera *Aedimorphus*, *Banksinella* and *Dunnisus*. *Bull Ent Res* 50:759-779.
- Hall JC (2003) Genetics and molecular biology of rhythms in *Drosophila* and other insects. *Adv Genet* 48:1-280.
- Hamner KC, Finn JC, Sirohi GS, Hoshizaki T and Carpenter BH (1962) The biological clock at the south pole. *Nature* 195:476-480.
- Hardin PE (1994) Analysis of *period* mRNA cycling in *Drosophila* head and body tissues indicates that body oscillators behave differently from head oscillators. *Mol Cell Biol* 14:7211-7218.
- Hardin PE (2005) The Circadian Timekeeping System of *Drosophila*. *Curr Biol* 15:R714-R722.
- Hardin PE, Hall JC and Rosbash M (1990) Feedback of the *Drosophila period* gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* 343:536-540.
- Helfrich-Forster C (2000) Differential control of morning and evening components in the activity rhythm of *Drosophila melanogaster*--sex-specific differences suggest a different quality of activity. *J Biol Rhythms* 15:135-154.
- Helfrich-Forster C (2004) The circadian clock in the brain: a structural and functional comparison between mammals and insects. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 190:601-613.

- Huang ZJ, Edery I and Rosbash M (1993) PAS is a dimerization domain common to *Drosophila period* and several transcription factors. *Nature* 364:259-262.
- Iwai S, Fukui Y, Fujiwara Y and Takeda M (2006) Structure and expressions of two circadian clock genes, *period* and *timeless* in the commercial silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol* 52:625-637.
- James AA (2002) Engineering mosquito resistance to malaria parasites: the avian malaria model. *Insect Biochem Mol Biol* 32:1317-1323.
- James AA, Beerntsen BT, Capurro Mde L, Coates CJ, Coleman J, Jasinskiene N and Krettli AU (1999) Controlling malaria transmission with genetically-engineered, *Plasmodium*-resistant mosquitoes: milestones in a model system. *Parassitologia* 41:461-471.
- Johnson CH, Elliott JA and Foster R (2003) Entrainment of circadian programs. *Chronobiol Int* 20:741-774.
- Jones MD (1963) The automatic recording of mosquito activity. *J Insect Physiol* 10:343-351.
- Jones MDR (1964) The automatic recording of mosquito activity. *J Insect Physiol* 10:343-351.
- Jones MDR (1974) Inversion polymorphism and circadian flight activity in the mosquito *Anopheles stephensis* List. (Diptera: Culicidae) *Bull Ent Res* 64:305-311.
- Jones MDR (1976) Persistence in continuous light of a circadian rhythm in the mosquito *Culex pipiens fatigans* Wied. *Nature* 261:491-492.
- Jones MDR (1981) The programming of circadian flight-activity in relation to mating and the gonotrophic cycle in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Physiological Entomology* 6:307-313.
- Jones MDR (1982) Coupled oscillators controlling circadian flight activity in the mosquito, *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Physiol Entomol* 7:281-289.
- Jones MDR, Cubbin CM and Marsh D (1972) Light-on effects and the question of bimodality in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles gambiae*. *J Exp Biol* 57:347-357.
- Jones MDR, Ford MG and Gillett JD (1966) Light-on and light-off effects on the circadian flight activity in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Nature* 211:871-872.
- Jones MDR and Gubbins S (1978) Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles gambiae* in relation to insemination, feeding and oviposition. *Physiol Entomol* 3:213-220.
- Jones MDR and Gubbins S (1979) Modification of female circadian flight-activity by a male accessory gland pheromone in the mosquito, *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Physiol Entomol* 4:345-351.
- Jones MDR and Gubbins SJ (1977) Modification of circadian flight activity in the mosquito *Anopheles gambiae* after insemination. *Nature* 268:731-732.
- Jones MDR, Hill M and Hope AM (1967) The circadian flight activity of the mosquito *Anopheles gambiae*: phase setting by the light regime. *J Exp Biol* 47:503-511.
- Jones MDR and Reiter P (1975) Entrainment of the pupation and adult activity rhythms during development in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Nature* 254:242-244.
- Kasai M and Chiba Y (1987) Effects of optic lobe ablation on circadian activity in the mosquito, *Culex pipiens pallens*. *Physiol Entomol* 12:59-65.
- Kawada H and Takagi M (2004) Photoelectric sensing device for recording mosquito host-seeking behavior in the laboratory. *J Med Entomol* 41:873-881.
- Kawada H, Takemura SY, Arikawa K and Takagi M (2005) Comparative study on nocturnal behavior of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *J Med Entomol* 42:312-318.
- Kawato M and Suzuki R (1980) Two coupled oscillators as a model of the circadian pacemaker. *J Theor Biol* 86.

- Kim EY, Bae K, Ng FS, Glossop NR, Hardin PE and Edery I (2002) *Drosophila* CLOCK protein is under posttranscriptional control and influences light-induced activity. *Neuron* 34:69-81.
- King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW and Takahashi JS (1997) Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 89:641-653.
- Klevecz RR, Bolen J, Forrest G and Murray DB (2004) A genomewide oscillation in transcription gates DNA replication and cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1200-1205.
- Kloss B, Price JL, Saez L, Blau J, Rothenfluh A, Wesley CS and Young MW (1998) The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase Iepsilon. *Cell* 94:97-107.
- Kloss B, Rothenfluh A, Young MW and Saez L (2001) Phosphorylation of period is influenced by cycling physical associations of double-time, period, and timeless in the *Drosophila* clock. *Neuron* 30:699-706.
- Klowden MJ (1996) Endogenous factors regulating mosquito host-seeking behaviour. *Ciba Found Symp* 200:212-223; discussion 223-232.
- Knipple DC, Rosenfield CL, Nielsen R, You KM and Jeong SE (2002) Evolution of the integral membrane desaturase gene family in moths and flies. *Genetics* 162:1737-1752.
- Konopka RJ and Benzer S (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:2112-2116.
- Kostal V and Shimada K (2001) Malfunction of circadian clock in the non-photoperiodic-diapause mutants of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *J Insect Physiol* 47:1269-1274.
- Krzywinski J and Besansky NJ (2003) Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations. *Annu Rev Entomol* 48:111-139.
- Kuhn R, Streif S and Wurst W (2007) RNA interference in mice. *Handb Exp Pharmacol* 178:149-176.
- Lamitina T (2006) Functional genomic approaches in *C. elegans*. *Methods Mol Biol* 351:127-138.
- Lane J (1953) *Neotropical Culicidae*, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
- Lankinen P and Forsman P (2006) Independence of genetic geographical variation between photoperiodic diapause, circadian eclosion rhythm, and Thr-Gly repeat region of the period gene in *Drosophila littoralis*. *J Biol Rhythms* 21:3-12.
- Lee C, Bae K and Edery I (1998) The *Drosophila* CLOCK protein undergoes daily rhythms in abundance, phosphorylation, and interactions with the PER-TIM complex. *Neuron* 21:857-867.
- Lee C, Bae K and Edery I (1999) PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a *Drosophila* CLOCK-CYC/dBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. *Mol Cell Biol* 19:5316-5325.
- Lee JH, Rowley WA and Platt KB (2000) Longevity and spontaneous flight activity of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) infected with western equine encephalomyelitis virus. *J Med Entomol* 37:187-193.
- Levashina EA, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagueux M and Kafatos FC (2001) Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* 104:709-718.
- Lin FJ, Song W, Meyer-Bernstein E, Naidoo N and Sehgal A (2001) Photic signaling by cryptochrome in the *Drosophila* circadian system. *Mol Cell Biol* 21:7287-7294.
- Lin GG, Liou RF and Lee HJ (2002) The *period* gene of the German cockroach and its novel linking power between vertebrate and invertebrate. *Chronobiol Int* 19:1023-1040.

- Liu G, Wong-Staal F and Li QX (2007) Development of new RNAi therapeutics. *Histol Histopathol* 22:211-217.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Markova EP, Ueda H, Sakamoto K, Oishi K, Shimada T and Takeda M (2003) Cloning of *Cyc* (*Bmall*) homolog in *Bombyx mori*: structural analysis and tissue specific distributions. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 134:535-542.
- Marques N and Menna-Barreto L (1999) *Cronobiologia: princípios e aplicações*, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Martinek S, Inonog S, Manoukian AS and Young MW (2001) A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 105:769-779.
- Martinek S and Young MW (2000) Specific genetic interference with behavioral rhythms in *Drosophila* by expression of inverted repeats. *Genetics* 156:1717-1725.
- Mathias D, Jacky L, Bradshaw WE and Holzapfel CM (2005) Geographic and developmental variation in expression of the circadian rhythm gene, *timeless*, in the pitcher-plant mosquito, *Wyeomyia smithii*. *J Insect Physiol* 51:661-667.
- Mathias D, Reed LK, Bradshaw WE and Holzapfel CM (2006) Evolutionary divergence of circadian and photoperiodic phenotypes in the pitcher-plant mosquito, *Wyeomyia smithii*. *J Biol Rhythms* 21:132-139.
- McDonald MJ, Rosbash M and Emery P (2001) Wild-type circadian rhythmicity is dependent on closely spaced E boxes in the *Drosophila timeless* promoter. *Mol Cell Biol* 21:1207-1217.
- Meireles-Filho AC, Amoretty PR, Souza NA, Kyriacou CP and Peixoto AA (2006a) Rhythmic expression of the *cycle* gene in a hematophagous insect vector. *BMC Mol Biol* 7:38.
- Meireles-Filho AC, da SRGB, Gesto JS, Machado RC, Britto C, de Souza NA and 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.
- Meister G and Tuschl T (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431:343-349.
- Meyer P, Saez L and Young MW (2006) PER-TIM interactions in living *Drosophila* cells: an interval timer for the circadian clock. *Science* 311:226-229.
- Michel K, Budd A, Pinto S, Gibson TJ and Kafatos FC (2005) *Anopheles gambiae* SRPN2 facilitates midgut invasion by the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *EMBO Rep* 6:891-897.
- Ministério-da-Saúde (2005) A malária no Brasil. Brasil.
- Minzava AEP and Curtis CF (1989) Test for variation in flight activity between chromosome inversion types within *Anopheles gambiae* (sensu stricto). *Insect sci Applic* 10:513-520.
- Moore-Ede MC, Sulzman FM and Fuller CA (1982) *The clocks that time us: physiology of the circadian timing system*, Harvard University Press, Cambridge, England.
- Myers MP, Rothenfluh A, Chang M and Young MW (1997) Comparison of chromosomal DNA composing timeless in *Drosophila melanogaster* and *D. virilis* suggests a new conserved structure for the TIMELESS protein. *Nucleic Acids Res* 25:4710-4714.
- Myers MP, Wager-Smith K, Wesley CS, Young MW and Sehgal A (1995) Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, *timeless*. *Science* 270:805-808.
- Naidoo N, Song W, Hunter-Ensor M and Sehgal A (1999) A role for the proteasome in the light response of the *timeless* clock protein. *Science* 285:1737-1741.
- Nayar JK and Sauerman DM, Jr. (1971) The effect of light regimes on the circadian rhythm of flight activity in the mosquito *Aedes taeniorhynchus*. *J Exp Biol* 54:745-756.

- Nikaido SS and Johnson CH (2000) Daily and circadian variation in survival from ultraviolet radiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photochem Photobiol* 71:758-765.
- Nishinokubi I, Shimoda M and Ishida N (2006) Mating rhythms of *Drosophila*: rescue of *tim01* mutants by *D. ananassae timeless*. *J Circadian Rhythms* 4:4.
- Nishinokubi I, Shimoda M, Kako K, Sakai T, Fukamizu A and Ishida N (2003) Highly conserved *Drosophila ananassae timeless* gene functions as a clock component in *Drosophila melanogaster*. *Gene* 307:183-190.
- Novina CD and Sharp PA (2004) The RNAi revolution. *Nature* 430:161-164.
- Numano R, Yamazaki S, Umeda N, Samura T, Sujino M, Takahashi R, Ueda M, Mori A, Yamada K, Sakaki Y, Inouye ST, Menaker M and Tei H (2006) Constitutive expression of the *Period1* gene impairs behavioral and molecular circadian rhythms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3716-3721.
- Ousley A, Zafarullah K, Chen Y, Emerson M, Hickman L and Sehgal A (1998) Conserved regions of the *timeless (tim)* clock gene in *Drosophila* analyzed through phylogenetic and functional studies. *Genetics* 148:815-825.
- Peixoto AA (2002) Evolutionary behavioral genetics in *Drosophila*. *Adv Genet* 47:117-150.
- Peterson EL (1979) The temporal pattern of mosquito flight activity. *Behaviour* 72:1-25.
- Peterson EL (1980a) A limit cycle interpretation of a mosquito circadian oscillator. *J Theor Biol* 84:281-310.
- Peterson EL (1980b) Phase-resetting a mosquito circadian oscillator. I. Phase-resetting surface. *J comp Physiol A* 138:201-211.
- Peterson EL (1980c) The temporal pattern of mosquito flight activity. *Behaviour* 72:1-25.
- Peterson EL and Jones MDR (1979) Do circadian oscillators ever stop in constant light? *Nature* 280:677-679.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Pittendrigh CS (1950) The ecoclimatic divergence of *Anopheles bellator* and *A. homunculus*. *Evolution* 4:43-63.
- Pittendrigh CS (1960) Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, CSH Press, ed, pp 159-184, New York.
- Pittendrigh CS (1993) Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annual review of physiology* 55:16-54.
- Pittendrigh CS and Daan S (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: a clock for all seasons. *J Comparative Physiol* 106:333-355.
- Price JL, Blau J, Rothenfluh A, Abodeely M, Kloss B and Young MW (1998) *double-time* is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* 94:83-95.
- Reddy P, Zehring WA, Wheeler DA, Pirrotta V, Hadfield C, Hall JC and Rosbash M (1984) Molecular analysis of the *period* locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell* 38:701-710.
- Reinert JF (2000) New classification for the composite genus *Aedes* (Diptera: Culicidae: Aedini), elevation of subgenus *Ochlerotatus* to generic rank, reclassification of the other subgenera, and notes on certain subgenera and species. *J Am Mosq Control Assoc* 16:175-188.
- Reinert JF, Harbach RE and Kitching IJ (2004) Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zool J Linnean Soc* 142:289-368.

- Rensing L and Ruoff P (2002) Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases. *Chronobiol Int* 19:807-864.
- Rey L (1991) *Wuchereria bancrofti* e Filariase Linfática. In *Parasitologia*, pp 627-653, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Ribeiro JM (2003) A catalogue of *Anopheles gambiae* transcripts significantly more or less expressed following a blood meal. *Insect Biochem Mol Biol* 33:865-882.
- Rieger D, Stanewsky R and Helfrich-Forster C (2003) *Cryptochrome*, compound eyes, Hofbauer-Buchner eyelets, and ocelli play different roles in the entrainment and masking pathway of the locomotor activity rhythm in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms* 18:377-391.
- Rohl T and Kurreck J (2006) RNA interference in pain research. *J Neurochem* 99:371-380.
- Rosato E, Tauber E and Kyriacou CP (2006) Molecular genetics of the fruit-fly circadian clock. *Eur J Hum Genet* 14:729-738.
- Rothenfluh A, Abodeely M, Price JL and Young MW (2000) Isolation and analysis of six *timeless* alleles that cause short- or long-period circadian rhythms in *Drosophila*. *Genetics* 156:665-675.
- Rothschild LJ and Cockell CS (1999) Radiation: microbial evolution, ecology, and relevance to mars missions. *Mutat Res* 430:281-291.
- Roubaud E (1918) Rhythmes physiologiques et vol spontané chez l'*Anopheles maculipennis*. *c r aCAD sCI* 167:967-969.
- Rowland M (1989) Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles stephensi* associated with insemination, blood-feeding, oviposition and nocturnal light intensity. *Physiol Ent* 14:77-84.
- Rowland M (1990) Flight activity of insecticide resistant and susceptible *Anopheles stephensi* mosquitoes in actograph chambers lined with malathion, gamma HCH or dieldrin. *Med Vet Entomol* 4:397-404.
- Rowland M (1991) Activity and mating competitiveness of gamma-HCH-dieldrin resistant and susceptible male and virgin female *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi* mosquitoes, with assessment of an insecticide-rotation strategy. *Med vet Ent* 5:207-222.
- Rowland M and Boersma E (1988) Changes in the spontaneous flight activity of the mosquito *Anopheles stephensi* by parasitization with the rodent malaria *Plasmodium yoelii*. *Parasitology* 97 (Pt 2):221-227.
- Rowland M and Lindsay SW (1986) The circadian flight activity of *Aedes aegypti* parasitized with the filarial nematode *Brugia pahangi*. *Physiological Entomology* 11:325-334.
- Rowley WA and Graham CL (1968a) The effect of age on the flight performance of female *Aedes aegypti* mosquitos. *J Insect Physiol* 14:719-728.
- Rowley WA and Graham CL (1968b) The effect of temperature and relative humidity on the flight performance of female *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol* 14:1251-1257.
- Rowley WA, Jones MD, Jacobson DW and Clarke III JL (1987) A microcomputer-monitored mosquito flight activity system. *Ann Entomol Soc Am* 80:534-538.
- Rubin EB, Shemesh Y, Cohen M, Elgavish S, Robertson HM and Bloch G (2006) 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* 16:1352-1365. Epub 2006 Oct 1325.
- Rutila JE, Suri V, Le M, So WV, Rosbash M and Hall JC (1998) CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila period* and *timeless*. *Cell* 93:805-814.
- Rutter J, Reick M, Wu LC and McKnight SL (2001) Regulation of *clock* and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors. *Science* 293:510-514.

- Saez L and Young MW (1996) Regulation of nuclear entry of the *Drosophila* clock proteins period and *timeless*. *Neuron* 17:911-920.
- Sauman I and Reppert SM (1996) Circadian clock neurons in the silkworm *Antheraea pernyi*: novel mechanisms of Period protein regulation. *Neuron* 17:889-900.
- Sauman I and Reppert SM (1998) Brain control of embryonic circadian rhythms in the silkworm *Antheraea pernyi*. *Neuron* 20:741-748.
- Savage HM, Anderson M, Gordon E, McMillen L, Colton L, Charnetzky D, Delorey M, Aspen S, Burkhalter K, Biggerstaff BJ and Godsey M (2006) Oviposition activity patterns and West Nile virus infection rates for members of the *Culex pipiens* complex at different habitat types within the hybrid zone, Shelby County, TN, 2002 (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 43:1227-1238.
- Scaria V, Hariharan M, Maiti S, Pillai B and Brahmachari SK (2006) Host-virus interaction: a new role for microRNAs. *Retrovirology* 3:68.
- Sehgal A (1995) Molecular genetic analysis of circadian rhythms in vertebrates and invertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 5:824-831.
- Sehgal A, Price JL, Man B and Young MW (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 MP and Young MW (1995) Rhythmic expression of *timeless*: a basis for promoting circadian cycles in period gene autoregulation. *Science* 270:808-810.
- Shafer OT, Rosbash M and Truman JW (2002) Sequential nuclear accumulation of the clock proteins *period* and *timeless* in the pacemaker neurons of *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 22:5946-5954.
- Shinkawa Y, Takeda S, Tomioka K, Matsumoto A, Oda T and Chiba Y (1994) Variability in circadian activity patterns within the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 31:49-56.
- Sirigireddy KR, Kennedy GA, Broce A, Zurek L and Ganta RR (2006) High prevalence of west nile virus: a continuing risk in acquiring infection from a mosquito bite. *Vector Borne Zoonotic Dis* 6:351-360.
- Snow RW, Craig M, Deichmann U and Marsh K (1999) Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population. *Bull World Health Organ* 77:624-640.
- Sokal RR and Rohlf FJ (1995) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research.*, W. H. Freeman and Co., New York.
- Sontheimer EJ (2005) Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:127-138.
- Stanewsky R (2002) Clock mechanisms in *Drosophila*. *Cell Tissue Res* 309:11-26.
- Stanewsky R (2003) Genetic analysis of the circadian system in *Drosophila melanogaster* and mammals. *J Neurobiol* 54:111-147.
- Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, Kay SA, Rosbash M and Hall JC (1998) The *cryb* mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95:681-692.
- Suri V, Qian Z, Hall JC and Rosbash M (1998) Evidence that the TIM light response is relevant to light-induced phase shifts in *Drosophila melanogaster*. *Neuron* 21:225-234.
- Taghert PH and Lin Y (2005) Tick-Talk, the cellular and molecular biology of *Drosophila* circadian rhythms. In *Comprehensive Molecular Insect Science*, Elsevier, ed, pp 357-394, Saint Louis, MO, USA.
- Takumi T, Nagamine Y, Miyake S, Matsubara C, Taguchi K, Takekida S, Sakakida Y, Nishikawa K, Kishimoto T, Niwa S, Okumura K and Okamura H (1999) A mammalian

- ortholog of *Drosophila timeless*, highly expressed in SCN and retina, forms a complex with mPER1. *Genes Cells* 4:67-75.
- Tauber E, Last KS, Olive PJ and Kyriacou CP (2004) Clock gene evolution and functional divergence. *J Biol Rhythms* 19:445-458.
- Taylor B (1969) Geographical range and circadian rhythm. *Nature* 222:269-267.
- Taylor B (1977) Control of flight activity in mosquitoes. *Nature* 265:762.
- Taylor B (1998) Biological Clocks in Mosquitoes
<http://antbaseorg/ants/africa/crhtml/covercrhtm>.
- Taylor B and Jones MDR (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.
- Tischkau SA, Barnes JA, Lin FJ, Myers EM, Barnes JW, Meyer-Bernstein EL, Hurst WJ, Burgoon PW, Chen D, Sehgal A and Gillette MU (1999) Oscillation and light induction of *timeless* mRNA in the mammalian circadian clock. *J Neurosci* 19:RC15.
- Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW and Takahashi JS (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* 264:719-725.
- Voorham J (2002) Intra-population plasticity of *Anopheles darlingi*'s (Diptera, Culicidae) biting activity patterns in the state of Amapa, Brazil. *Rev Saude Publica* 36:75-80.
- Vosshall LB, Price JL, Sehgal A, Saez L and Young MW (1994) Block in nuclear localization of period protein by a second clock mutation, *timeless*. *Science* 263:1606-1609.
- Warman GR, Newcomb RD, Lewis RD and Evans CW (2000) Analysis of the circadian clock gene *period* in the sheep blow fly *Lucilia cuprina*. *Genet Res* 75:257-267.
- Webber C and Ponting CP (2004) Genes and homology. *Curr Biol* 14:R332-333.
- Williams CB (1937) The use of logarithms in the interpretation of certain entomological problems. *Ann App Biol* 24:404-444.
- Wise S, Davis NT, Tyndale E, Noveral J, Folwell MG, Bedian V, Emery IF and Siwicki KK (2002) Neuroanatomical studies of *period* gene expression in the hawkmoth, *Manduca sexta*. *J Comp Neurol* 447:366-380.
- Yeates DK and Wiegmann BM (1999) Congruence and controversy: toward a higher-level phylogeny of Diptera. *Annu Rev Entomol* 44:397-428.
- Yu Q, Jacquier AC, Citri Y, Hamblen M, Hall JC and Rosbash M (1987) Molecular mapping of point mutations in the *period* gene that stop or speed up biological clocks in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:784-788.
- Yu W, Zheng H, Houl JH, Dauwalder B and Hardin PE (2006) PER-dependent rhythms in CLK phosphorylation and E-box binding regulate circadian transcription. *Genes Dev* 20:723-733.
- Zeng H, Qian Z, Myers MP and Rosbash M (1996) A light-entrainment mechanism for the *Drosophila* circadian clock. *Nature* 380:129-135.