

USO DE *Drosophila melanogaster* COMO MODELO PARA O ESTUDO DO RELÓGIO CIRCADIANO EM INSETOS VETORES

PAULO ROBERTO DE AMORETTY^{1,2}; KARINE PEDREIRA PADILHA¹; RAYANE TELES DE FREITAS¹; RAFAELA VIEIRA BRUNO¹

¹Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

²Centro Universitário Volta Redonda – UNIFOA

ABSTRACT

The last decades have established *D. melanogaster* as the main multicellular model organism, and many researchers have been attracted to work with this insect due to its potential of combining a genetic and molecular approach to investigate genetic expression, cellular biology and neurobiology. In this paper we discuss the use of this organism model in the study of the circadian clock in insect vectors.

Keywords: Circadian clock, *drosophila melanogaster*

INTRODUÇÃO

Desde o surgimento da vida no planeta, os organismos vêm sendo submetidos a ciclos diários de luz e temperatura causados pelo movimento de rotação que a Terra realiza em torno no seu próprio eixo. Esses ciclos diários levaram os seres vivos a adaptar sua fisiologia e comportamento às variações ambientais. Os mais diversos grupos de organismos passaram a apresentar oscilações diárias com um período próximo à 24 horas em condições constantes. Tais oscilações foram denominadas por Franz Halberg em 1959 de “ritmos circadianos” (do latim *circa* = cerca e *diem* = dia) (Marques & Menna-Barreto, 1999; Moore-Ede et al., 1982).

Observações sobre a existência dos ritmos biológicos datam desde a antiguidade. Os apontamentos de Hipócrates, Aristóteles, Plínio, Virey, Sanctorius e Galeno já sugeriam

a importância destes ritmos em plantas, animais e no próprio homem. Além destas abordagens empíricas clássicas, em 325 a.C., uma descrição com maior respaldo científico também foi realizada por Thasos, historiador acompanhante de Alexandre, o Grande, que observou em detalhes o movimento periódico diário das folhas de *Tamarindus indicus* (tamarindo). Outro exemplo interessante no contexto histórico são os estudos do naturalista sueco Carolus Linnaeus, que em 1751 propôs um relógio de flores para marcar as horas do dia baseado no horário característico de diversas espécies de plantas abrirem e fecharem as pétalas de suas flores (Marques & Menna-Barreto, 1999; Moore-Ede et al., 1982). No entanto, em grande parte do percurso histórico ao longo da escala de investigações, acreditava-se que os ritmos diários observados nos organismos eram dirigidos de forma majoritária pelos ciclos ambientais. O primeiro indício da

existência de um controle endógeno no relógio circadiano veio com o trabalho do astrônomo francês Jean-Jacques d'Ortous de Mairan, em 1729. Ele realizou experimentos sobre o ritmo da planta *Mimosa pudica* (“dormideira”), que abre suas folhas durante a fase clara do dia e as retrai durante a noite. Após submeter estas plantas à condição de escuro constante, o astrônomo observou que mesmo sem a indicação luminosa as folhas da dormideira se abriam durante nas horas correspondentes ao dia, e se fechavam durante o horário noturno (figura 1).



Figura 1. Esquema do experimento conduzido por d’Mairan. Espécimes de *Mimosa pudica* foram mantidas em escuro constante (caixa azul) e em luz natural. Observou-se que mesmo sem a informação da luz, as plantas abriam suas folhas no momento que correspondia ao dia e fechavam naquele que correspondia à noite.

Em 1835, outro importante estudo também foi realizado nesta espécie. O botânico suíço Augustin de Candolle observou que o ritmo do movimento foliar de *Mimosa pudica* em escuro constante apresentava um atraso diário, evidenciando uma periodicidade endógena de 22 a 23 horas. Este período, livre de indicadores ambientais, próximo à 24 horas viria a ser definido mais tarde como “período de livre-curso”. Neste sentido, os estudos de Colin Pittendrigh a partir da década de 1950 foram fundamentais, demonstrando que o período de livre curso poderia ser “acertado” por fatores ambientais que indicam a passagem de tempo (Foster & Kreitzman, 2005; Pittendrigh, 1993).

Para essa propriedade, dá-se o nome de “sincronização”, ou entrainment, em inglês (John-

son et al., 2003; Marques & Menna-Barreto, 1999). Jürgen Aschoff adotou a denominação de zeitgeber para tais indicadores ambientais. A palavra tem origem germânica e significa “indicador (ou doador) de tempo”, os ciclos claro-escuro e de temperatura quente-frio são os mais compreendidos em sua capacidade de sincronização do relógio de diversas espécies (Marques & Menna-Barreto, 1999; Moore-Ede et al., 1982).

A partir da década de 1970, os estudos sobre comportamento circadiano tomaram um novo rumo. No Instituto de Tecnologia da Califórnia, Ron Konopka e Seymour Benzer submeteram drosófilas a mutagênicos químicos e isolaram três mutantes que apresentavam padrões anormais nos ritmos de emergência de pupas e atividade locomotora de insetos adultos, essas mutações foram mapeadas em um mesmo locus chamado de period. Os mutantes receberam o nome de pershort (pers) no caso da linhagem período menor do que 24h (19h), perlong (perl) para a linhagem com período maior do que 24h (29h) e per01 para a linhagem essencialmente arritmica (Konopka & Benzer, 1971; Stanewsky, 2002). Posteriormente, foi clonado e sequenciado (Jackson et al., 1986; Citri et al., 1987), e demonstrou-se que tanto seu mRNA quanto sua proteína oscilavam com um período de 24 horas, o que sugeria um mecanismo de auto regulação negativa, havendo no entanto um atraso de algumas horas no pico de expressão da proteína (Hardin et al., 1990). Com a pesquisa pioneira em *D. melanogaster* realizada por Konopka e Benzer, iniciou-se uma nova era no campo da cronobiologia. Multiplicaram-se os grupos que passaram a trabalhar com genes do relógio circadiano. Atualmente, compreende-se que o mecanismo principal do Relógio Circadiano é constituído por um conjunto de genes que interagem através de alças de autoregulação negativa, e ciclam com um período próximo à 24 horas mesmo em condições ambientais constantes.

Drosophila melanogaster COMO ORGANISMO MODELO

As últimas décadas têm afirmado *D. melanogaster* como o principal organismo modelo multicelular, e muitos pesquisadores são atraídos a trabalhar com esse inseto devido ao potencial de combinar uma abordagem genética e molecular para investigar expressão gênica, biologia celular, desenvolvimento e neurobiologia (Greenspan, 1997). Este inseto foi inicialmente estudado por Castle em 1901 e utilizado para experimentos de genética por Morgan em 1909. Ele pertence ao gênero *Drosophila*, que é dividido em subgêneros nomeados por Sturtevant em 1942: *Hirtodrosophila*, *Pholadoris*, *Dorsilopha*, *Phloridosa*, *Sophophora*, e *Drosophila*, com *Siphlodora* e *Sordophila* sendo as mais recentes adições (Roberts, 1998).

D. melanogaster é uma espécie da África Central, mas que agora é cosmopolita, sendo encontrada em todos os países quentes. Em países frios, ela está estabelecida como migrante durante o verão, porém pode permanecer no inverno abrigada em locais quentes como padarias, por exemplo (Roberts, 1998).

As vantagens de se trabalhar com *D. melanogaster* são muitas: o baixo custo de manutenção aliado a um rápido ciclo de vida; o farto material de consulta com muitos livros publicados; sítios na internet como o Flybase (<http://www.flybase.org>); o banco de dados do Berkeley Drosophila Genome Project associado à enciclopédia de *Drosophila* (<http://fruitfly.berkeley.edu>); entre outros, cobrem todos os aspectos da genética e biologia molecular de *D. melanogaster* (Ashburner, 2005; Roberts, 1998).

D. melanogaster é um inseto tipicamente holometábolo, seu ciclo de vida pode ser dividido em quatro estágios – ovo, larva, pupa e adulto (figura 2). No Laboratório, são usualmente mantidas a 25°C, nessa condição o tempo dos estágios do desenvolvimento, ou seja, de ovo até adulto, leva em torno de dez dias (Ashburner, 2005).

Os ovos são depositados pelas fêmeas no meio de cultura e cada fêmea pode colocar até 100 ovos por dia. O desenvolvimento embrionário leva aproximadamente 24 horas. As

larvas de primeiro instar começam a se alimentar imediatamente. Nessa fase passam por duas mudas: do primeiro para o segundo instar e do segundo para o terceiro instar. As de primeiro instar se alimentam na superfície do meio, enquanto as de segundo e terceiro instar escavam o meio para se alimentar. A larva madura de terceiro instar deixa o meio para procurar um local adequado onde formará a pupa, de onde em torno de três dias o adulto emergirá (Ashburner, 2005).

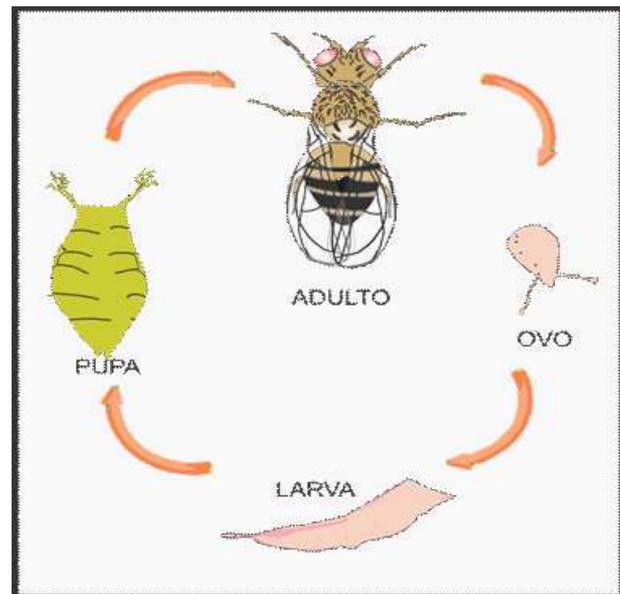


Figura 2. *D. melanogaster* é um inseto tipicamente holometábolo, seu ciclo de vida pode ser dividido em quatro estágios – ovo, larva, pupa e adulto. Caso sejam mantidas a 25°C o ciclo leva em torno de 10 dias.

Um dos principais fatores que diferenciam o organismo modelo *D. melanogaster* de outros são os cromossomos balanceadores. Muitas mutações recessivas são invisíveis na condição heterozigota, a capacidade de realizar cruzamentos, nos quais genótipos invisíveis possam ser preservados com praticamente 100% de confiança, tem posicionado a genética de moscas um degrau acima de outros diplóides (Greenspan, 1997).

O princípio da construção de balanceadores é simples: uma inversão é formada quando uma seção de um cromossomo é excisada e reinserta na orientação oposta. Tais

inversões podem ser pericêntricas quando incluem o centrômero ou paracêntrica quando o excluem (Roberts, 1998). Esse formato resulta na supressão da recombinação homóloga entre a região normal e a invertida, uma vez que esses cromossomos não fazem a sinapse durante a meiose. Tais inversões são amplamente utilizadas, porque tornam possível manter juntos alelos de genes ligados. Além disso, balanceadores autossômicos geralmente são letais em homozigose, além de serem marcados com mutações dominantes, o que permite segui-los através dos cruzamentos (Roberts, 1998). Para nomeá-los, utiliza-se geralmente uma letra para seu cromossomo (F - do inglês first - para o primeiro, que é o X; S para o segundo; T para o terceiro), com M para múltiplas inversões e com um número e, algumas vezes, uma letra, para identificar seu lugar em uma série. É possível incluir, após o nome, um símbolo genético para o principal marcador carregado pelo balanceador (Greenspan, 1997). Trabalhos recentes, têm mostrado que é possível modificar cromossomos balanceadores através de técnicas que utilizam a integrase phiC31, para facilitar a incorporação de novos transgenes nesses balanceadores. Isso permite, por exemplo, a incorporação de novos marcadores. Até o momento, os balanceadores utilizados em genética de *D. melanogaster* apresentam marcadores visíveis apenas nos insetos adultos, com exceção do TM6^{tub} (Sun et al., 2012), essas novas ferramentas poderiam facilitar a execução dos cruzamentos e tornar essa prática mais rápida.

A descoberta de elementos genéticos móveis e a associação deles com mutações espontâneas na natureza permitiram novas formas de clonagem de genes e de transformação germinativa, o que tem adicionado novos métodos para a criação de certos tipos de mutação. Para manipular *D. melanogaster* existem vários elementos de transposição piggyBac, Minos, Mariner, Hermes, hobo, copia - entretanto o mais utilizado é o elemento "P", embora atualmente alguns pesquisadores optem por utilizar integrase phiC31 (Venken & Bellen, 2007). Trata-se de um elemento transponíveis de 2.9 Kb com

Outra técnica bastante utilizada em *D. melanogaster* é o sistema UAS-GAL4, usado para manipular a expressão gênica in vivo. Essa abordagem consiste basicamente de um ativador transcricional (GAL4) e uma sequência alvo de GAL4 chamada de Upstream Activation Site (UAS). Essas proteínas estão naturalmente presentes em leveduras e foram muito bem adaptados para uso em pesquisa, principalmente aquelas que utilizam *D. melanogaster* como modelo, permitindo principalmente o estudo do funcionamento de genes. Este sistema possui uma versatilidade tão impressionante, que permite o controle temporal, espacial ou ambos do gene inserido.

D. melanogaster é, portanto, um excelente modelo para estudo do relógio circadiano, uma vez que com exceção do gene Clock, todos os principais genes que controlam esse mecanismo endógeno foram inicialmente identificados nesse inseto. Além disso, a identificação em camundongos do gene Clock (Antoch et al., 1997; King et al., 1997b) e Period (Sun et al., 1997; Tei et al., 1997) revelaram que embora tenham sido identificadas algumas diferenças interessantes, o relógio de vertebrados tem uma origem evolucionária comum aos insetos (Reppert & Weaver, 2000; Yu & Hardin, 2006; revisado por Sandrelli, 2008). Desta forma, os conhecimentos gerados por pesquisas em insetos são de grande valia para o desenvolvimento de trabalhos com vertebrados, principalmente os que utilizam *Drosophila* como modelo, pois a cada ano surgem novos métodos que facilitam a manipulação desse inseto.

O CONTROLE GENÉTICO DO RELÓGIO

A maior parte do conhecimento acerca da genética molecular dos ritmos circadianos em insetos é proveniente de estudos a partir do organismo modelo *D. melanogaster* (Hardin, 2011). Nessa espécie o mecanismo molecular capaz de gerar o ritmo circadiano é formado por três alças de autoregulação negativa. Na alça principal, as proteínas CLOCK (CLK) e CYCLE (CYC) formam um heterodímero e

ativam a transcrição dos genes *period* (*per*) e *timeless* (*tim*). Por volta do meio da noite, as quinases CK2 e SGG fosforilam PER e TIM o que promove a entrada do complexo no núcleo. Uma vez no núcleo, esse complexo se liga a CLK-CYC, fazendo com que os ativadores se desprendam do DNA. Desta forma, PER e TIM regulam negativamente suas próprias transcrições (figura 3) (revisado em Hardin, 2011 & Rivas, 2013).

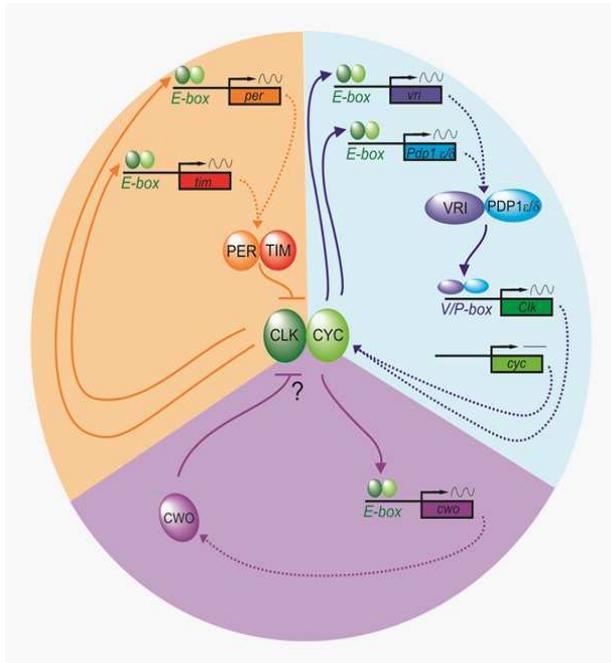


Figura 3. O relógio circadiano é formado por um conjunto de genes que interagem através de três alças de autoregulação negativa. Na alça principal (fundo laranja), CLOCK (CLK) e CYCLE (CYC) formam um heterodímero e ativam a transcrição dos genes *period* (*per*) e *timeless* (*tim*), cujas proteínas, após formarem dímeros, reprimem suas próprias transcrições. O heterodímero CLK-CYC também ativa a transcrição dos genes *vri* e *PAR domain protein 1* (*pdp1ε*) (fundo verde). As proteínas VRI e PDP1ε regulam a expressão de Clk através da competição pelo sítio V/P. Na terceira alça descoberta recentemente (fundo lilás), protagonizada por *clockwork orange* (*cwo*), CLK-CYC ativam a transcrição de CWO, que, por sua vez, competiria pela ligação a sítios que inibiriam a atividade de CLK-CYC. A regulação positiva é representada por linhas sólidas com seta no final e a regulação negativa por linha sólida com barra. Linhas pontilhadas com setas indicam a tradução e terminam nas respectivas proteínas, em cada caso.

O heterodímero CLK-CYC também ativa a transcrição dos genes *vri* e *PAR domain protein 1* (*pdp1ε*) (figura 3) (Blau & Young, 1999; Cyran et al., 2003). As proteínas VRI e PDP1ε por sua vez controlam a expressão de Clk. VRI reprime a transcrição deste gene, enquanto PDP1ε ativa (Cyran et al., 2003; Glossop et al., 2003). Esses fatores de transcrição acumulam-se com uma diferença de 4 horas entre si, VRI alcança níveis mais elevados no início da noite e Pdp1ε atinge seu pico no meio da noite. Essa diferença de fase propicia uma modulação cíclica diária no mRNA de Clk (Cyran et al., 2003). No entanto a proteína CLK não oscila. O controle rítmico exercido se justifica por alterações pós-traducionais. Observa-se que a hiperfosforilação de CLK coincide com a máxima repressão de PER-TIM, sugerindo que CLK seja mais ativo quando hipofosforilado (Kim & Edery, 2006; Yu et al., 2006).

Há ainda uma terceira alça, recém-descoberta, protagonizada por *clockwork orange* (*cwo*). Esse gene também possui uma região E-box, a qual CLK-CYC se ligam para ativar a transcrição (figura 3). A proteína CWO competiria pela ligação a sítios E-boxes, o que inibiria a atividade de CLK-CYC (Kadener et al., 2007; Lim et al., 2007; Matsumoto et al., 2007). No entanto, a atuação de CWO no relógio circadiano ainda não foi claramente elucidada visto que alguns trabalhos sugerem resultados distintos (Kadener et al., 2007; Lim et al., 2007; Matsumoto et al., 2007; Richier et al., 2008).

Em última análise, o relógio circadiano gera padrões rítmicos finamente ajustados, exercendo um controle não apenas no cerne do oscilador, como também em milhares de outros genes envolvidos na fisiologia, metabolismo e comportamento de *D. melanogaster* e outros organismos (revisado em Doherty et al., 2010). Esses processos biológicos, embora sejam autossustentados e persistam sob condições constantes, também são sincronizados com o ambiente (*zeitgebers*) (Dunlap et al., 2004).

Os *zeitgebers* podem ser fatores abióticos, como por exemplo, luz e temperatura, ou bióticos como disponibilidade de alimento e in-

teração social. Observando-se ainda que a associação de um ou mais zeitgebers são capazes de sincronizar o ritmo de um organismo, de acordo com uma hierarquia (Marques & Menna-Barreto, 2003).

A luz e a temperatura são os zeitgebers mais importantes para o relógio de *D. melanogaster* (Boothroyd & Young, 2008). O sistema circadiano deste organismo recebe informação luminosa por meio de três vias, onde se enquadram os fotoreceptores externos (olhos compostos e ocelos), o orifício de Hofbauer-Buchner's (H-B eyelet) e o fotopigmento CRYPTOCHROME (CRY) (Helfrich-Foster et al., 2001; Rieger et al., 2003; Veleri et al., 2003, Stanewsky et al., 1998).

Essas vias atuam em sinergia, no entanto, acredita-se que CRYPTOCHROME seja o principal fator capaz de sincronizar o relógio circadiano. Com o amanhecer, a luz provoca uma mudança conformacional em CRY, propiciando a ligação dessa flavoproteína à TIM, levando-o à degradação via proteossoma (Busza et al., 2004; Ceriani et al., 1999; Dissel et al., 2004; Naidoo et al., 1999). A proteína PER, separada de TIM, é fosforilada por DOUBLETIME (DBT), e também encaminhada para degradação (Kloss et al., 1998, 2001; Price et al., 1998).

Em *D. melanogaster*, a eliminação de CRY nos mutantes para o gene *cry* (*cryb*) causa severos defeitos na sincronização dessas moscas em ciclos de claro/escuro (Emery et al., 2000; Stanewsky et al., 1998). No entanto, os ritmos comportamentais podem ser arrastados por diferentes vias receptoras do sinal luminoso, assim, para que haja uma arritmicidade na atividade de drosófilas quando submetidas a ciclos de claro/escuro é necessário a completa eliminação dos fotoreceptores externos, de H-B eyelet, não apenas de CRY (Helfrich-Foster et al., 2001).

Recentemente foi realizado um screen a fim de encontrar mutantes que apresentassem dificuldades na ciclagem de *per-luc* (gene repórter) induzida por ciclos de temperatura. Assim, isolou-se a variante do gene *nocte* (no

circadian temperature entrainment). Mutantes para esse gene apresentam defeitos no arrastamento por ciclos de temperatura, mas não por ciclos de claro/escuro; o oposto de *cryb*. (Glaser & Stanewsky, 2005). Este mesmo estudo também revelou a importância de outro gene na sincronização por temperatura, *norpA* (no receptor potential A) (Glaser & Stanewsky, 2005). Contudo, *norpA* era conhecido apenas pela sua participação na sincronização pela luz nos olhos compostos (Stanewsky et al., 1998; Emery et al., 2000; Helfrich-Foster et al., 2001).

A pouco tempo, foi demonstrado em uma série de estudos que as interações sociais em *D. melanogaster* alteravam significativamente a fase dos relógios circadianos dos indivíduos (Levine et al., 2002, Krupp et al., 2008). Foi demonstrado que a sincronia de fase total de grupos de moscas selvagens (rítmicas) diminuiu após eles terem interagido com mutantes arrítmicos com perda de período (*per0*) (Levine et al., 2002). Isto sugere que o ritmo de atividade locomotora em *D. melanogaster* pode ser modificado por relógios de outros indivíduos, provavelmente pelas interações sociais.

Sendo assim, fatores bióticos e abióticos são de grande importância, pois são capazes de promover a sincronização do relógio circadiano.

O CONTROLE CELULAR DO RELÓGIO CIRCADIANO

Existem cerca de 150 células osciladoras no cérebro de *D. melanogaster*, que são requeridas para o controle dos ritmos circadianos, e para isso expressam os genes do relógio (Shafer et al., 2006; Helfrich-Forster, 1998). Esses neurônios se dividem em sete grupos: neurônios laterais grandes (l-LNVs) e pequenos (s-LNVs), neurônios laterais dorsais (LNd), neurônios dorsais 1, 2 e 3 (DN1, DN2 e DN3) e neurônios posteriores laterais (LPNs). Os neurônios laterais se localizam entre o lobo óptico e o protocérebro.

Os neurônios laterais ventrais são subdivididos de acordo com o tamanho de seu corpo celular, sendo, portanto, chamados de

neurônios laterais grandes (l-LNVs) e pequenos (s-LNVs). Outro grupo de neurônios que se localizam mais próximo à região dorsal do cérebro são chamados de neurônios laterais dorsais (LNd). Há ainda três grupos de neurônios na região mais dorsal do cérebro que são chamados de neurônios dorsais 1, 2 e 3 (DN1, DN2 e DN3). O sétimo grupo está localizado no lado posterior do cérebro e, por isso, são chamados de neurônios posteriores laterais (LPNs) (figura 4) (Shaferet et al., 2006).

Os neurônios s-LNVs expressam o neuropeptídeo PDF (pigment dispersing factor), que conectam os neurônios laterais localizados mais dorsalmente e transferem sinais circadianos para outros neurônios (Peschel & Helfrich-Foster, 2011).

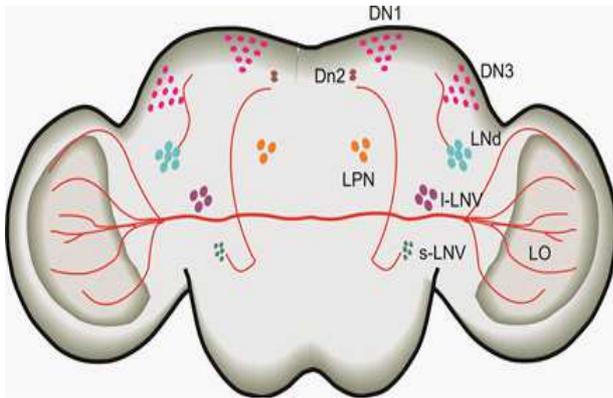


Figura 4. Esquema representando os grupos neuronais requeridos para a ritmicidade circadiana. Esses neurônios se dividem em sete grupos: neurônios laterais grandes (l-LNVs) e pequenos (s-LNVs), neurônios laterais dorsais (LNd), neurônios dorsais 1, 2 e 3 (DN1, DN2 e DN3) e neurônios posteriores laterais (LPNs).

Drosophila melanogaster VERSUS INSETOS VETORES

Embora o mecanismo do relógio circadiano seja amplamente estudado em *D. melanogaster*, em insetos vetores como *Lutzomyia longipalpis* e *Aedes aegypti* eles ainda estão no início. Esses insetos apresentam ritmos circadianos em diversos aspectos do seu comportamento como, atividade locomotora, atividade de vôo, cômte e na hematofagia, que é a principal forma de transmissão de patógenos.

Frequentemente, o mosquito *Ae. aegypti* apre-

senta comportamento endofílico e antropofílico, e desta forma, uma fêmea infectada pode transmitir o vírus da dengue através da picada (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994; Thavara et al., 2001; Lima-Câmara et al., 2006; Scott et al., 1993; Hoeck et al., 2003). Devido a sua importância epidemiológica, é o inseto vetor com maior número de trabalhos realizados. Lima-Câmara e colaboradores, por exemplo, estudaram a atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas com vírus Dengue em condições controladas de laboratório. Foi visto que a infecção alterava o comportamento dos insetos causando um aumento na atividade locomotora, sugerindo que essa interação poderia ter um impacto na dinâmica de transmissão e epidemiologia da doença. Os autores especularam que a mudança de comportamento causado pelo vírus poderia ter ocorrido pelo aumento da expressão dos genes que controlam o relógio, possivelmente Clock (Lima-Câmara et al., 2011).

Outro importante vetor no Brasil é o flebotomíneo *Lu. longipalpis*. Esse inseto é o principal vetor da *Leishmania chagasi* que causa a Leishmaniose Visceral Americana (AVL) na América Latina, no Brasil, contribui com 90% dos casos. As fêmeas adultas necessitam da alimentação sanguínea para maturação de ovos, enquanto os machos alimentam-se de seiva de plantas (Soares & Turco, 2003). Inicialmente, foram identificados e caracterizados os genes da principal alça do Relógio Circadiano em flebotomíneos (Meireles-Filho et al., 2006). Nesses trabalhos foram identificadas diferenças marcantes no gene *cycle* dos dois insetos. Em *Lu. longipalpis*, foi evidenciado o sítio de ativação na proteína CYCLE (CYC), que é do mesmo tipo evidenciado em mamíferos e alguns insetos não drosofilídeos - BCTR (BMAL1 C-terminal region), enquanto seu ortólogo em *D. melanogaster* não apresenta esse domínio funcional (Rutila et al., 1998; Meireles-Filho et al., 2006b). Além disso, diferenças nos níveis de expressão dessas proteínas também foram evidenciados entre esses dois organismos.

As comparações entre *D. melanogaster*

como modelo, permite responder a questões mais abrangentes, como por exemplo, se as diferenças observadas a nível molecular se refletem no comportamento desses insetos. Isso é potencialmente importante, para que no futuro possam ser desenvolvidas novas estratégias de controle desses insetos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Henrique José Henrique Gomes dos Santos pela figura 2. E agradecem e dedicam este trabalho a Alexandre Afranio Peixoto (*In memoriam*) pelas discussões e dicas de organização desse manuscrito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLADA R, WHITE NE, SO WV, HALL JC, ROSBASH M. 1998. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell*. 93: 791-804.

ANTOCH MP, SONG EJ, CHANG AM, VITATERNA MH, ZHAO Y, WILSBACHER LD, SANGORAM AM, KING DP, PINTO LH AND TAKAHASHI JS. 1997. Functional identification of mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell*. 89: 655-67.

ASHBURNER M, GOLIC KG AND HAWLEY RS. 2005. *Drosophila – a laboratory handbook*. 2a ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

ASCHOFF J. 1960. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 25: 11-18.

BLAU J AND YOUNG MW. 1999. Cycling vrille expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell* 99:661-671.

BOOTHROYD CE, YOUNG MW. 2008. The in(put)s and out(put)s of the *Drosophila* circadian clock. *Anais da New York Academy of Sci-*

ences. 1129 : 350-7.

BUSZAA, EMERY-LE M, ROSBASH M, AND EMERY P. 2004. Roles of the two *Drosophila* CRYPTOCHROME structural domains in circadian photoreception. *Science* 304: 1503–1506.

CERIANI M. F., DARLINGTON T. K., STAKNIS D., MAS P., PETTI A. A., WEITZ C. J., AND KAY S. A. 1999. Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science* 285:553–556.

CONSOLI RAGB AND LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.

CYRAN SA, BUCHSBAUM AM, REDDY KL, LIN MC, GLOSSOP NR, HARDIN PE, YOUNG MW, STORTI RV AND BLAU J. 2003. vrille, Pdp1, and dClock form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 112:329-341.

DISSEL S, CODD V, FEDIC R, GARNER KJ, COSTA, R, KYRIACOU CP AND ROSATO E. 2004. A constitutively active cryptochrome in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Neurosci.* 7: 834–840.

DOHERTY CJ AND KAY SA. 2010. Circadian Control of Global Gene Expression Patterns. *Annu. Rev. Genet.* 44:419–44.

DUBRUILLE R AND EMERY P. 2008. A plastic clock: how circadian rhythms respond to environmental cues in *Drosophila*. *Molecular Neurobiology.* 38: 129–145.

EMERY P, STANEWSKY R, HELFRICH-FÖRSTER C, EMERY-LE M, HALL JC AND ROSBASH M. 2000. *Drosophila* CRY is a deep brain circadian photoreceptor. *Neuron* 26: 493–504.

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.
- GREENSPAN R. 2004. Fly pushing – The theory and practice of *Drosophila* genetics. Cold Spring Harbor, New York 2e, p155.
- GLASER FT AND STANEWSKY R. 2005. Temperature synchronization of the *Drosophila* circadian clock. *Curr Biol*. 15, 1352-63.
- 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.
- HARDIN PE. 2011. Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. *Adv Genet*. 74, 141-73.
- HELFRICH-FÖRSTER C, STENGL M AND HOMBERG U. 1998. Organization of the circadian system in insects. *Chronobiol International* 15 (6) : 567-94.
- HELFRICH-FÖRSTER 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-FÖRSTER C, WINTER C, HOFBAUER A, HALL JC AND STANEWSKY R. 2001. The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron*; 30: 249-261.
- HELFRICH-FÖRSTER 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, 601-13.
- HOECK PAE, RAMBERG FB, MERRILL SA, MOLL C AND HAGEDORN HH. 2003. Population and parity levels of *Aedes aegypti* collected in Tucson. *J Vector Ecology* 28:65-73.
- JOHNSON CH, ELLIOTT JA AND FOSTER R. 2003. Entrainment of circadian programs. *Chronobiol Int* 20:741-774.
- KADENER S, STOLERU D, MCDONALD M, NAWATHEAN P AND ROSBASH M. 2007. Clockwork Orange is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. *Genes Dev*. 21, 1675–1686.
- KIM EY AND EDERY I. 2006. Balance between DBT/CK Iepsilon kinase and protein phosphatase activities regulate phosphorylation and stability of *Drosophila* CLOCK protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 6178–6183.
- KING DP, VITATERNA MH, CHANG AM, DOVE WF, PINTO LH, TUREK FW AND TAKAHASHI JS. 1997. The mouse clock mutation behaves as an antimorph and maps within the W19H deletion, distal of kit. *Genetics* 146, 1049–1060.
- 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.
- 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.
- KONOPKA RJ AND BENZER S. 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl. Acad Sci USA* 68:2112-2116.
- KRUPP JJ, KENT C, BILLETER JC, AZANCHI R, SO AK, SCHONFELD JA, SMITH BP, LUCAS C AND LEVINE JD. 2008. Social Experience Modifies Pheromone Expression and Mating Behavior in Male *Drosophila melano-*

- gaster. *Cell Press*. 23;18(18):1373-83.
- LEVINE JD, FUNES P, DOWSE HB AND HALL JC. 2002. Resetting the circadian clock by social experience in *Drosophila melanogaster*. *Science*. 6; 298 (5600) : 2010-2.
- LIMA-CAMARA TN, HONORIO NA, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R. 2006. Frequência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Públ* 22: 2079–2084.
- LIM, C, CHUNG BY, PITMAN JL, MCGILL JJ, PRADHAN S, LEE J, KEEGAN KP, CHOE J AND ALLADA, R. 2007. Clockwork orange encodes a transcriptional repressor important for circadian clock amplitude in *Drosophila*. *Curr. Biol*. 17: 1082–1089.
- MARQUES N AND MENNA-BARRETO L. 2003. *Cronobiologia: princípios e aplicações*. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MATSUMOTO A, UKAI-TADENUMA M, YAMADA RG, HOUL J, UNO KD, KASUKAWA, T, MOORE-EDE MC, SULZMAN FM AND FULLER CA. 1982. The clocks that time us- Physiology of the circadian timing system. London: Harvard University Press.
- MATSUMOTO A, UKAI-TADENUMA M, YAMADA RG, HOUL J, UNO KD, KASUKAWA T, DAUWALDER B, ITOH TQ, TAKAHASHI K, UEDA R, HARDIN PE, TANIMURA T AND UEDA HR. 2007. A functional genomics strategy reveals clockwork orange as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. *Genes Dev*. 21: 1687–1700.
- MEIRELLES-FILHO AC, AMORETTY PR, SOUZA NA, KYRIACOU CP, PEIXOTO AA. 2006a. Rhythmic expression of the cycle gene in a hematophagous insect. *BMC Molecular Biology* 7: 7-38.
- MEIRELES-FILHO AC, RIVAS GBS, GESTO JS, MACHADO RC, BRITTO C, SOUZA NA, PEIXOTO AA. 2006b. The biological clock of an hematophagous insect: locomotor activity rhythms, circadian expression and downregulation after a blood meal. *FEBS Letters*. 580:2-8.
- 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.
- 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.
- NITABACH MN, WU Y, SHEEBA V, LEMON WC, STRUMBOS J, ZELENSKY PK, WHITE BH AND HOLMES TC. 2006. Electrical hyperexcitation of lateral ventral pacemaker neurons desynchronizes downstream circadian oscillators in the fly circadian circuit and induces multiple behavioral periods. *J Neuroscience*. 11; 26 (2) : 479-89.
- PESCHEL N AND HELFRICH-FÖRSTER C. 2011. Setting the clock by nature: circadian rhythm in the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters*. 585(10) 1435-1442.
- PITTENDRIGH CS. 1993. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annual review of physiology* 55:16-54.
- 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.
- REPPERT, SM AND WEAVER DR. 2000. Comparing clockworks: mouse vs. fly. *J Biol Rhythms* 15: 357–364.
- RICHIER B, MICHARD-VANHEE C, LAMOUREUX A, PAPIN C AND ROUYER F. 2008. The clockwork orange Dro-

- sophila protein functions as both an activator and a repressor of clock gene expression. *J. Biol. Rhythms* 23: 103–116.
- 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 (5): 377-391.
- RIVAS GBS. 2012. Genética molecular dos ritmos circadianos em insetos vetores. *Revista da Biologia* 9(3): 19–25.
- 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*. May 29; 93: 805–814.
- ROBERTS DB. 1998. *Drosophila*, A Practical Approach. 2a Ed. New York, NY: Oxford University Press.
- SCOTT TW, CHOW E, STRICKMAN D, KIT-TAYAPONG P, WIRTZ RA, LORENZ LH AND EDMAN JD. 1993. Blood-feeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) collected in a rural Thai village. *J Med Entomol* 30:922-927.
- SANDRELLI F, COSTA R, KYRIACOU CP AND ROSATO E. 2008. Comparative analysis of circadian clock genes in insects. *Insect Mol Biol* 17:447-463.
- SHAFER OT, HELFRICH-FÖRSTER C, RENN SC AND TAGHERT PH. Reevaluation of *Drosophila melanogaster*'s neuronal circadian pacemakers reveals new neuronal classes. 2006. *J Comp Neurol*. 498,180-93.
- SHEEBA V. The *Drosophila melanogaster* circadian pacemaker circuit. 2008. *Journal of Genetics*. 87 (5): 485-93.
- SOARES RPP AND TURCO SJ. 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 75(3): 301-330
- 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.
- STANEWSKY R. 2002. Clock mechanisms in *Drosophila*. *Cell Tissue Res* 309:11-26. Saunders DS. *Insect Clocks* 3rd edition. Amsterdam: Elsevier Science.
- SUN ZS, ALBRECHT U, ZHUCHENKO O, BAILEY J, EICHELE G AND LEE CC. 1997. RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* 90, 1003–1011.
- SUN FF, JOHNSON JE, ZEIDLER MP, BATEMAN JR. 2012. Simplified Insertion of Transgenes Onto Balancer Chromosomes via Recombinase-Mediated Cassette Exchange. *G3* (Bethesda) May;2(5):551-3.
- TEI H, OKAMURA H, SHIGEYOSHIY, FUKUHARA C, OZAWA R, HIROSE M AND SAKAKI Y. 1997. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* 389, 512–516.
- THAVARA U, TAWATSIN A, CHANSANG C, KONG-NGAMSUK W, PAOSRIWONG S, BOON-LONG J, RONGSRIYAM Y AND KOMALAMISRA N. 2001. Larval occurrence, oviposition behavior and biting activity of potential mosquito vectors of dengue on Samui Island, Thailand. *J Vector Ecology* 26:172-180.
- VENKEN KJT AND BELLEN HJ. 2007. Transgenesis upgrades for *Drosophila melanogaster*. *Development* 134, 3571-3584.

YOSHII T, HESHIKI Y, IBUKI-ISHIBASHI T, MATSUMOTO A, TANIMURA T AND TOMIOKA K. 2005. Temperature cycles drive *Drosophila* circadian oscillation in constant light that otherwise induces behavioural arrhythmicity. *Eur J Neurosci.* 22: 1176–84.

YU W AND HARDIN PE. 2006. Circadian oscillators of *Drosophila* and mammals. *J. Cell Sci.* 119: 4793–4795.