

CAPÍTULO 10

1

Ritmos Biológicos em Insetos Vetores e seu Controle Molecular.

Rafaela Vieira Bruno^{1,2}, Tamara Nunes de Lima-Camara¹ e Alexandre Afranio Peixoto^{1,2}

¹Laboratório de Biologia Molecular de Insetos – IOC – FIOCRUZ/RJ.

²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular.

Copyright: © 2012 [Rafaela Vieira Bruno, Tamara Nunes de Lima-Camara, Alexandre Afranio Peixoto]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações Iniciais.

Desde que a vida surgiu na Terra, os seres vivos, dos mais simples até os mais complexos, convivem com processos rítmicos no ambiente em que vivem. O relógio circadiano é um marcapasso endógeno responsável por coordenar oscilações rítmicas na fisiologia e comportamento destes organismos dentro de um período de cerca de 24 horas. Em insetos, as bases moleculares do relógio circadiano têm sido bastante estudadas na espécie modelo *Drosophila melanogaster*. No entanto, embora já seja conhecida a importância dos ritmos diários de atividade de insetos hematófagos na dinâmica de transmissão de doenças, pouco se sabe a respeito do funcionamento do marcapasso molecular que controla estes ritmos nestes vetores. Neste capítulo, serão abordados aspectos moleculares e comportamentais dos ritmos biológicos em mosquitos e flebotomíneos, insetos vetores que pertencem à Ordem Diptera.

Glossário

Período – duração de um ciclo.

Fase – Determinado momento de um ciclo. Pode se referir a uma metade de ciclo, como a fase clara e a fase escura em um ciclo de claro/escuro ou a um momento pontual, como por exemplo, o valor máximo de uma variável.

Fotofase – fase clara (ou do dia) de um ciclo de claro/escuro.

Escotofase – fase escura (ou da noite) de um ciclo de claro/escuro.

Termofase – fase quente de um ciclo de quente/frio.

Criofase – fase fria de um ciclo de quente/frio.

LD 12:12 – representação de um ciclo de claro/escuro (do inglês “light” e “dark”), com 12 horas de cada fase.

TC 12:12 - representação de um ciclo de quente/frio (do inglês “thermo” e “cold”), com 12 horas de cada fase.

Zeitgeber – sincronizador ambiental. Os *Zeitgebers* mais citados neste capítulo serão a luz e a temperatura.

Amplitude – valor da diferença entre os pontos máximo e mínimo da curva de um ritmo biológico.

Histórico da Cronobiologia e Conceitos sobre Relógios Biológicos.

Sempre que pensamos em algum evento biológico, fazemos as perguntas “O quê?”, “Para quê?” e “Como?”, mas raramente nos perguntamos **quando** tal evento ocorre. A importância do tempo nos processos biológicos é evidente, uma vez que desde que a vida surgiu na Terra as espécies são submetidas a ciclos diários causados pelos movimentos de rotação e ciclos sazonais causados pelos movimentos de translação. No entanto, o estudo mais aprofundado desses eventos rítmicos é relativamente recente. Em 1969, Franz Halberg definiu a Cronobiologia como o “estudo sistemático das características temporais da matéria viva, em todos os seus níveis de organização” (Halberg, 1969 *apud* Marques et al, 2003). Isso inclui o estudo dos ritmos biológicos.

Ritmos biológicos são processos naturais que variam periodicamente no tempo. De acordo com o tamanho do período, os

ritmos biológicos podem se dividir em: i) ciclos ultradianos, que são aqueles com duração muito menor que 24 horas, como as frequências cardíaca e respiratória; ii) ciclos circadianos, cuja duração é próxima a 24 horas, como a atividade de sono e vigília e iii) ciclos infradianos, que duram bem mais que 24 horas, como, por exemplo, os ciclos de hibernação, menstrual e lunar. Neste capítulo, focaremos principalmente os ritmos circadianos.

Os primeiros relatos da existência de ritmos biológicos circadianos datam do ano de 325 a. C. por Andróstenes de Thasos, acompanhante de Alexandre, o Grande, que descreveu o movimento periódico diário foliar da espécie *Tamarindus indicus*, o tamarindo. A observação do movimento foliar foi novamente relatada por volta do ano de 1729, pelo astrônomo francês Jean Jacques de Mairan que descreve os movimentos foliares em plantas (*Mimosa pudica*) mantidas em lugares isolados de ciclos ambientais de claro e escuro que, mesmo assim, continuavam a movimentar suas folhas. Nesse momento, era demonstrado o caráter endógeno do ritmo. Em 1853, o pesquisador Auguste de Candolle repetiu os ensaios feitos por de Mairan e observou que o movimento das folhas acontecia cerca de 1 hora mais cedo a cada dia quando a planta era mantida em condições constantes (isto é, sem informações do ambiente). Esses ensaios mostravam que, na natureza, o ritmo de claro/escuro aparentemente forçava um período de 24 horas exatas, mas que, em condições ambientais constantes, ou seja, em livre-curso, o período variava em torno de 24 horas, caracterizando o ritmo circadiano (*apud* Moore-Ede *et al*, 1982). Desde então, muitos outros ensaios foram realizados mostrando o caráter endógeno desses ritmos. Contudo, a confirmação de que esse relógio circadiano estava sob controle genético só foi demonstrada em 1953, quando o pesquisador Erwin Bünning realizou cruzamentos de plantas do feijão que apresentavam períodos diferentes para os movimentos foliares e a sua prole apresentou um período intermediário da geração parental (Marques *et al*, 2003).

Propriedades Gerais dos Ritmos Circadianos.

i) A persistência em livre-curso - Os ritmos circadianos continuam a se expressar mesmo quando isolados de indicadores ambientais, apresentando um período em livre curso τ , que é próximo a 24 horas. O valor de τ é espécie-específico, mas pode apresentar variações intraespecíficas e intraindividuais (Daan & Pittendrigh, 1976). Modificações no τ também podem ser notadas ao longo do desenvolvimento de uma espécie. O τ pode ainda sofrer uma modulação em sua amplitude, caracterizando ritmos “fortes” (com grande amplitude) ou ritmos “fracos” (com baixa amplitude) (Marques e Menna-Barreto, 2003).

ii) A sincronização com ritmos ambientais - Embora os ritmos persistam em livre curso, eles podem ser sincronizados ou arrastados por indicadores ambientais. Estes indicadores ambientais foram chamados de *Zeitgebers* (do alemão: “doador de tempo”) por Jurgen Aschoff (Aschoff, 1951 e 1954) e sua principal função é ajustar o ritmo em livre-curso, gerado pelo oscilador interno, a um ou mais fatores ambientais. Os *Zeitgebers* podem ser fatores abióticos (por exemplo, luz e temperatura – os mais estudados até então) ou bióticos (disponibilidade

de alimento e organização social, como principais exemplos) e um ou mais *Zeitgebers* podem arrastar o ritmo de uma espécie, de acordo com uma hierarquia (Marques e Menna-Barreto, 2003).

iii) Compensação térmica - Apesar da maioria dos processos bioquímicos variarem com a temperatura, o período endógeno do relógio circadiano em livre-curso (τ) apresenta variações muito pequenas quando é estudado em diferentes temperaturas, dentro de uma faixa permissiva para cada espécie. Esse mecanismo de compensação térmica do relógio circadiano é muito importante, pois permite que este continue medindo corretamente a passagem do tempo em diferentes temperaturas, como, por exemplo, nas diferentes estações do ano (Marques e Menna-Barreto, 2003).

O relógio circadiano na espécie modelo *Drosophila melanogaster*.

- O controle molecular do relógio

Apesar das evidências da existência de um componente genético no ritmo circadiano terem surgido desde a década de 50, foi somente em 1971 que Ronald Konopka e Seymour Benzer descreveram o primeiro gene envolvido no ritmo circadiano, *period* (*per*). Dessa data até hoje, diversos outros genes envolvidos no relógio circadiano de *Drosophila melanogaster* foram descritos e caracterizados molecularmente, mostrando que o relógio central desse inseto é controlado por diversos genes interligados em alças regulatórias de retroalimentação negativa (revisado em Boothroyd & Young, 2008; Hardin 2011; Zhang & Kay, 2011).

Na primeira alça de regulação, os fatores de transcrição CLOCK (CLK) E CYCLE (CYC) se ligam na região E-box (CACGTG) dos genes *per* e *timeless* (*tim*) e ativam sua transcrição durante a fase diurna. Ao mesmo tempo em que a proteína PERIOD (PER) é produzida no citoplasma, ela é fosforilada por uma quinase chamada DOUBLETIME (DBT), o que induz a sua degradação. Simultaneamente, a proteína TIM é fosforilada por SHAGGY (SGG), outra quinase. Entretanto, quando PER e TIM conseguem acumular em níveis mais altos no citoplasma, o heterodímero PER/TIM é formado, o que provoca a estabilização de PER e evita sua degradação. Durante a fase noturna, PER e TIM são translocados para o núcleo, inibindo a atividade de CLK e CYC, o que consequentemente inibe a transcrição dos genes *per* e *tim*. Ao amanhecer, o heterodímero PER/TIM se desfaz, reiniciando o processo (Stanewsky, 2003; Hardin, 2005, 2011; Doherty & Kay, 2011). Isso acontece por causa da proteína CRYPTOCHROME (CRY). CRY é uma fotoliase que é ativada pela luz, modificando sua conformação. Após sua ativação, ela é capaz de recrutar as proteínas JETLAG (JET) e o complexo SCF, se ligar a TIM e marcá-la para degradação via proteassomo (Stanewsky et al, 1998; Peschel et al, 2009).

A segunda alça de regulação é formada pelos genes *vriille* (*vri*) e *Par-domain-protein-1ε* (*Pdp1ε*), que atuam como repressor e ativador transcricional de *Clk*, respectivamente. A ativação e repressão em horários diferentes causam a expressão cíclica de *Clk*. As duas alças se completam e controlam a expressão global das centenas de genes regulados pelo relógio circadiano (Keegan et al, 2007; Doherty & Kay, 2011). Vale ressaltar que a expressão de *cyc* é constitutiva ao longo de

todo o período (Rutila et al, 1998). Um aspecto interessante da regulação do relógio são as alterações pós-traducionais na proteína CLK. O gene *Clk* é expresso de forma rítmica, mas sua proteína não apresenta variação cíclica na sua abundância (Houl et al, 2006; Yu et al, 2006). Todavia, a fosforilação de CLK ocorre de maneira circadiana, uma vez que CLK está hiperfosforilado, entre o final da noite e o início da manhã (Yu et al, 2006), justamente nos momentos de máxima repressão da transcrição de *per* e *tim*, o que sugere que CLK seria mais ativo quando hipofosforilado (Kim et al, 2006; Yu et al, 2006).

Uma terceira alça regulatória inclui o gene *clockwork-orange (cwo)*, que parece atuar como repressor transcricional. Esse gene é expresso ritmicamente e é ativado pelo homodímero CLK-CYC pela região E-box de seu promotor e atua como repressor de *per* e *tim*. Essa alça de retroalimentação negativa seria importante para uma alta amplitude da oscilação circadiana (Hardin 2011). Os processos descritos acima podem ser observados de forma esquemática na Figura 1.

Podemos dizer, portanto, que a ritmicidade na expressão gênica e nas proteínas gerada pelo relógio mantém sua própria oscilação e controlam outros genes abaixo em diferentes vias de sinalização (Keegan et al, 2007; Doherty & Kay, 2011).

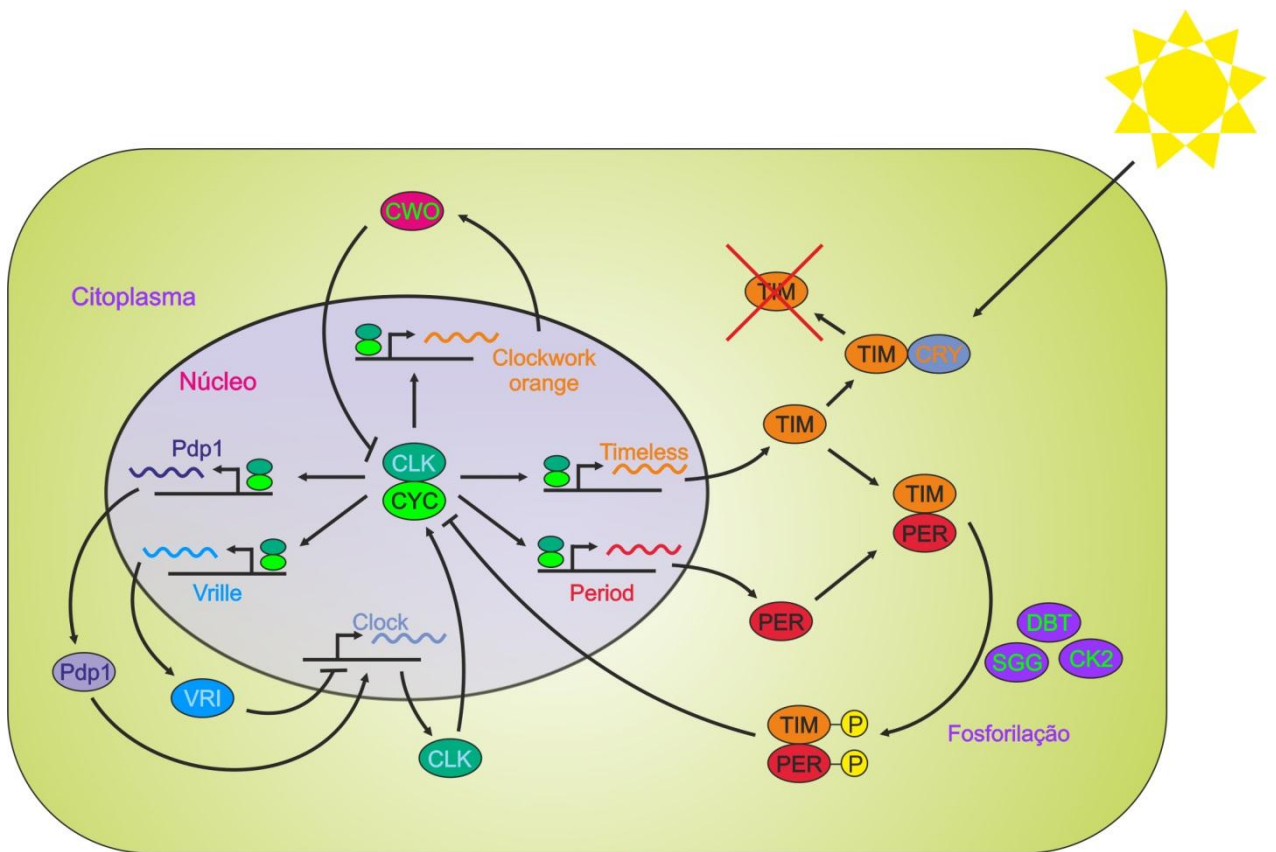


Figura 1: Modelo do relógio circadiano em *Drosophila*. Representação esquemática das três alças de retroalimentação negativa regulatórias, que interligadas, controlam o relógio circadiano de *Drosophila melanogaster*. A primeira alça regulatória envolve a repressão da transcrição dos genes *per* e *tim* pelo heterodímero CLK-CYC. A segunda alça está relacionada à regulação da transcrição de *Clk* pelas proteínas PDP1 (épsilon-ativador) e VRI (repressor) e a terceira alça é composta por CWO, que reprime a transcrição de genes do relógio através da ligação aos domínios E-box dos promotores destes genes. Autoria da Figura: Rafaela Vieira Bruno, baseado em Hardin, 2011.

- A organização celular do relógio em *Drosophila*.

A organização celular do relógio tem sido bastante estudada não só em *D. melanogaster* como em outros dípteros e insetos de outras ordens, através de anticorpos homólogos e heterólogos, sondas de RNA mensageiro anti-senso e genes repórteres dirigidos por promotores de genes do relógio (Helfrich-Förster, 2004). Em *Drosophila*, a informação fótica é percebida através de fotorreceptores presentes nos olhos compostos e nos ocelos, passam pela medula acessória e chega até as células osciladoras ou de marcapasso. Além disso, a luz atravessa a cutícula da *Drosophila* e atua também diretamente em CRY nas células que expressam este fotorreceptor.

Uma vez que os neurônios osciladores interpretam os sinais fóticos são geradas respostas, geralmente através de ritmos de atividade locomotora, reprodução, alimentação, dentre outros. Os ritmos de atividade locomotora de moscas selvagens, em condições de claro/escuro, apresentam um padrão bimodal de atividade, com um pico de atividade na transição claro-escuro (pico da manhã) e outro pico de atividade na transição escuro-claro (pico da noite). Existe uma diferença no padrão de atividade entre machos e fêmeas, relacionada ao pico de atividade da manhã, que ocorre mais cedo nos machos. Em condições constantes, moscas selvagens passam a apresentar um único pico de atividade, caracterizando uma atividade unimodal (Helfrich-Förster, 2000).

Existem cerca de 150 células osciladoras no cérebro, que são aquelas que expressam genes de relógio (Figura 2). Elas se dividem em sete grupos: três se localizam entre o lobo óptico e o protocérebro, sendo chamadas de neurônios laterais (LNs). Os neurônios laterais ventrais se subdividem de acordo com o tamanho de seu corpo celular, sendo, portanto, chamados de neurônios laterais grandes (l-LNVs) e pequenos (s-LNVs). O terceiro grupo de neurônios se localiza mais próximo à região dorsal do cérebro, sendo chamados de neurônios laterais dorsais (LNd). Há ainda três grupos de neurônios na região mais dorsal do cérebro, sendo chamados de neurônios dorsais 1, 2 e 3 (DN1, DN2 e DN3). O sétimo grupo localiza-se no lado posterior lateral do cérebro e, por isso, são chamados de neurônios posteriores laterais (LPNs) (Shafer et al, 2006). Acredita-se que os neurônios laterais ventrais pequenos sejam responsáveis pelo pico diurno de atividade locomotora e uma parte da atividade noturna, enquanto os neurônios laterais dorsais regulam o pico noturno de atividade locomotora (Grima et al, 2004; Stoleru et al, 2004; Rieger et al, 2006). Em 2008, Shang e colaboradores descreveram que os neurônios laterais ventrais grandes estão envolvidos no despertar induzido por luz e na mudança de fase durante a noite (Shang et al, 2008). Por sua vez, os neurônios dorsais estão relacionados à atividade locomotora e ao arrastamento em ciclos de temperatura (Murad et al, 2007; Picot et al, 2009). Esses neurônios se comunicam através de neurotransmissores específicos, que possuem liberação rítmica no botão sináptico de seus neurônios produtores. Alguns dos neurotransmissores mais conhecidos atuando no relógio circadiano são o PIGMENT DISPERSING FACTOR (PDF), neuropeptídeo que conecta as células osciladoras às áreas de controle motor no cérebro (Reischig & Stengel, 2003), o glutamato, que modula sinais dos três grupos de neurônios dorsais (Hamasaoka et al, 2007) e a

dopamina, que atua através de CRY controlando a resposta na transição entre claro e escuro (Kumar et al, 2012).

- A temperatura como Zeitgeber.

Embora muito já se saiba como a luz influencia a sincronização dos ritmos circadianos, pouco se sabe sobre o papel da temperatura nesse processo. Ao contrário da sincronização pela luz, em que fotorreceptores presentes nos olhos são responsáveis pela sincronização dos ritmos, na sincronização por temperatura são os termorreceptores presentes nos diferentes tecidos do organismo que percebem os estímulos térmicos. Além disso, a sincronização de órgãos periféricos é um processo

tecido-autônomo, ou seja, os diferentes tecidos são sincronizados independentemente (Glaser & Stanewsky, 2005; Sehadova et al, 2009).

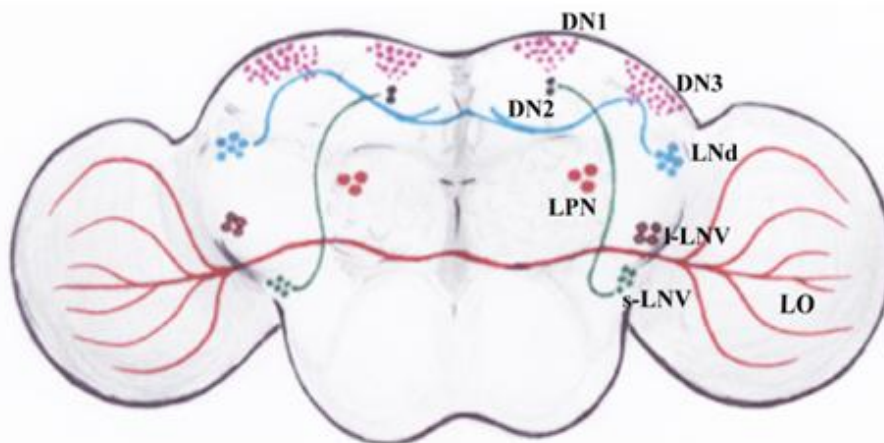


Figura 2: Organização Celular do Relógio Circadiano em *Drosophila melanogaster*. Diagrama representando os principais grupos neuronais que formam o marcapasso circadiano. Três grupos (DN1, DN2, e DN3) estão localizados na região dorsal e os quatro restantes (LNd, I-LNV, s-LNV e LPN) são localizados lateralmente. Os grupos s-LNV e I-LNV expressam o neuropeptídeo PDF. Além disso, o grupo dos I-LNVs tem sua projeção no lobo óptico (LO), que se comunicam através do trato óptico posterior. Ao contrário, o grupo dos s-LNVs tem suas projeções axonais para a região do protocérebro dorsomedial. Autoria da Figura: Pablo Rodrigo Gonçalves de Lemos, baseado em Tomioka & Matsumoto, 2010 e Allada & Chang, 2011.

O padrão de atividade locomotora de moscas selvagens pode ser arrastado por ciclos de temperatura com variação de apenas 3°C entre a termofase e a criofase (Wheeler et al, 1993). Além disso, moscas selvagens podem ser arrastadas por ciclos de temperatura na presença de luz constante (LL), uma situação que normalmente resultaria em arritmicidade (Glaser & Stanewsky, 2005). Os ciclos de temperatura também são capazes de sincronizar o ritmo em mutantes arrítmicos para os genes de relógio, tais como *per⁰¹*, *Clk^{irk}*, *tim⁰¹* e *cyc⁰*. No entanto, esses mutantes, tal como em ciclos de luz, não apresentam antecipação ao acender e apagar das luzes, tampouco manutenção da ritmicidade em condições constantes (Yoshii et al, 2002).

Em nível molecular, sabe-se que os níveis de PER e TIM oscilam em ciclos de quente/frio e essas oscilações se mantêm em condições constantes (Glaser & Stanewsky, 2005). Além disso, a oscilação dos níveis dessas proteínas se mantêm mesmo em claro constante, o que indica que o ciclo de temperatura, de alguma forma, deve substituir a degradação induzida pela luz da TIM por CRY.

Dois novos genes foram descritos como participantes do relógio circadiano sincronizado por temperatura. O gene *no-receptor-protein-A* (*norpA*) codifica a enzima fosfolipase C, que atua na cascata de reconhecimento de estímulos fóticos e promove o processamento do RNA de *per* dependente de temperatura (Majercak et al, 1999, 2004; Collins et al, 2004). O gene *no-circadian-temperature-entrainment* (*nocte*) codifica uma

proteína rica em glutamina com função desconhecida e mutações nesse gene geram defeitos severos em estruturas receptoras chamadas órgãos cordotonais (Sehadova et al, 2009). Além disso, mutantes para os genes *nocte* e *norpA* são incapazes de sincronizar seus relógios por temperatura, embora a sincronização por ciclos de luz ocorra normalmente. Um modelo proposto por Sehadova e colaboradores sugere que neurônios dos órgãos cordotonais enviem informações sobre a temperatura para neurônios do relógio periférico na região torácica ou ainda para células sensíveis à temperatura presentes no próprio cérebro. No entanto, mais estudos são ainda necessários para a elucidação do funcionamento do relógio sincronizado por temperatura (Sehadova et al, 2009).

Ritmos Biológicos em Insetos Vetores.

Ritmos diários podem ser observados em uma ampla variedade de insetos que, geralmente, restringem suas atividades a determinados momentos do dia. Dessa forma, sob condições naturais ou artificiais de luz e temperatura, os insetos podem apresentar atividades diurnas, noturnas ou crepusculares. As atividades diárias particulares de locomoção, alimentação, cópula, oviposição, eclosão, entre outras, têm importância fundamental na caracterização da biologia das espécies de insetos e na dinâmica de transmissão de doenças, no caso de insetos vetores (Saunders, 2002). Uma vez que os ritmos circadianos podem

determinar fatores cruciais para a dinâmica das doenças relacionadas a esses vetores, o entendimento das bases moleculares que controlam o relógio biológico dessas espécies é de fundamental importância. No entanto, poucos estudos foram realizados até o momento e esforços ainda são necessários para a elucidação desses mecanismos. Abaixo são descritos alguns dos estudos realizados com mosquitos e flebotomíneos, insetos vetores que pertencem a Ordem Diptera.

– Mosquitos

Os mosquitos pertencem à família Culicidae e as fêmeas da grande maioria das espécies alimentam-se de sangue, ou seja, são hematófagas. Algumas espécies são vetores de importantes doenças humanas, como Dengue e Malária, fazendo com que esses insetos tenham grande importância epidemiológica. Os ritmos de atividade de muitas espécies de mosquitos vetores já foram estudados, tanto no campo e no laboratório (revisão em Clements 1999), mas poucos estudos moleculares do relógio circadiano foram realizados até o momento, principalmente em *Aedes aegypti*, principal vetor do vírus Dengue, *Culex quinquefasciatus*, vetor do parasita causador da filariose bancroftiana, e *Anopheles gambiae*, principal vetor africano dos parasitas causadores da malária.

Aedes aegypti é considerada uma espécie de atividade diurna, sendo essa atividade geralmente maior nos períodos de crepúsculos, tanto matutino quanto vespertino, e um padrão semelhante é observado em condições controladas no laboratório (e.g. Gentile et al, 2009) (Figura 3). Em condições de escuro constante este mosquito apresenta período endógeno de aproximadamente 22,5 horas (Gentile et al, 2009).

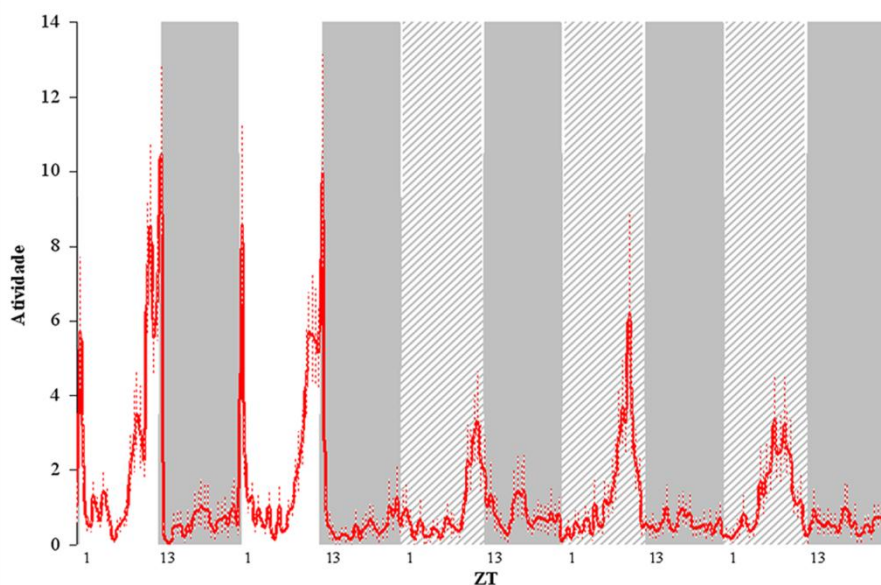


Figura 3: Ritmo de Atividade de Fêmeas de *Aedes aegypti* em Regimes de Claro Escuro e Escuro Constante. Padrão de atividade locomotora de fêmeas virgens de *Ae. aegypti* expostas a dois dias de LD 12:12 e três dias de DD, a 25°C. Nota-se a presença de um pico matutino e outro noturno no regime de claro/escuro e a atividade ocorre majoritariamente na fase de luz. Na transição para o escuro constante, o pico matutino é ausente e o pico noturno ocorre, a cada dia, mais cedo. Desta forma, pode-se dizer que o período endógeno de fêmeas virgens desta espécie é menor que 24 horas (aproximadamente 22 horas). Linhas tracejadas representam o erro padrão de *Ae. aegypti*. Autoria da Figura: Paulo Roberto de Amoretty e Tamara Nunes de Lima-Camara.

Muitos trabalhos abordaram os ritmos diários de *Ae. aegypti* em laboratório, comparando diferentes condições ambientais ou fisiológicas. Por exemplo, Taylor e Jones (1969), observando o padrão de atividade de voo de fêmeas de *Ae. aegypti* submetidas a diferentes fotoperíodos, verificaram padrão diurno e bimodal, com baixa quantidade de indivíduos ativos durante a fase escura. Em todos os fotoperíodos testados, houve um pequeno pico no acender das luzes e um pico maior, crescente, ocorrendo no final da fase clara. Essa variação na duração da fotofase/escotofase sobre a atividade diária de *Ae. aegypti* também teve seu efeito estudado no ritmo de oviposição das fêmeas dessa espécie em condições de laboratório (Haddow & Gillett 1957; Gillett et al. 1959; Gomes et al. 2006). Sob regime de LD 12:12 (Haddow & Gillett, 1957; Gillett et al, 1959; Gomes et al, 2006), LD 08:16 e LD 16:08 (Gillett et al, 1959), as fêmeas de *Ae. aegypti* apresentaram sempre o mesmo padrão de atividade de oviposição, diurna e unimodal, com pico ocorrendo principalmente nas horas do crepúsculo vespertino.

Taylor & Jones (1969) verificaram a atividade de voo de machos e de fêmeas de *Ae. aegypti* possivelmente inseminadas e não alimentadas com sangue no laboratório. Foi observado em ambos os sexos um pequeno pico logo após o acender das luzes e um aumento gradual da atividade de voo a partir do meio da fase clara. O pico principal

ocorreu 1-2 horas antes do apagar das luzes. A atividade descrita durante a escotofase foi baixa. Além disso, o mesmo padrão bimodal e diurno na atividade de voo de fêmeas virgens de *Ae. aegypti* foi observado por Jones (1981), sob 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

Em *Anopheles gambiae*, estudos sobre o padrão de atividade de voo em diferentes condições fisiológicas também foram realizados. A atividade de voo de fêmeas virgens de *Anopheles gambiae* em laboratório segue um padrão bimodal em LD12:12. Nesse regime de luz, o primeiro pico ocorre pouco depois do apagar das luzes e há uma fase secundária de atividade que atinge o seu máximo nas últimas horas da fase escura (Jones et al, 1966). No entanto, esse padrão se modifica quando as fêmeas estão inseminadas. A inseminação em *An. gambiae* ocorre geralmente apenas uma vez e as fêmeas apresentam uma grande redução no primeiro pico e um aumento no segundo pico de atividade. Essa mudança poderia estar associada à busca pelo hospedeiro (Jones & Gubbins, 1977; Clements, 1999).

Ensaio semelhante também foram realizados com mosquitos do complexo *Culex pipiens*, que mostraram que os padrões de voo e locomoção são noturnos e podem ser modificados pela inseminação das fêmeas ou por diferentes odores do hospedeiro (Clements, 1999; Savage et al, 2008; Lacey & Cardé, 2011).

Outra alteração fisiológica que pode modificar o padrão de atividade de insetos vetores é a presença de parasitas nesses organismos. Por exemplo, ensaios realizados com infecção artificial (intratorácica) com o vírus Dengue, sorotipo 2, mostraram que tanto as fêmeas não infectadas quanto as infectadas de *Ae. aegypti* apresentaram atividade locomotora diurna e bimodal, com picos no acender e no apagar das luzes. Contudo, quando comparamos o padrão da atividade locomotora das fêmeas nas duas condições, notamos que a infecção pelo vírus Dengue causou um aumento na atividade durante o ciclo de 24 horas. Apesar do efeito da infecção ter sido mais notável

durante a transição entre o final da fase clara e o começo da fase escura, podemos perceber também um aumento na atividade locomotora durante as horas da fotofase e da escotofase nas fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas, especialmente durante o pico observado durante o entardecer, ocorrendo mais especificamente no ZT 9 (Lima-Camara et al, 2011). Vale ressaltar que não é possível afirmar que esse fenômeno se repetiria com a infecção com outros sorotipos, uma vez que ensaios de infecção com sorotipos diferentes em testes com outros aspectos da fisiologia das fêmeas apresentaram resultados distintos de acordo com o sorotipo infectado (Putnam & Scott, 1995; Platt et al, 1997).

Apesar da importância epidemiológica dos mosquitos vetores e do conhecimento acerca dos ritmos circadianos que controlam diferentes atividades destes insetos, muito pouco se sabe sobre o controle molecular do relógio. Ensaios de transcriptoma de *Ae. aegypti* infectados com o vírus Dengue 2 (DENV-2) mostram que há um aumento significativo na expressão do gene *Clk* em fêmeas infectadas, sugerindo que esta variação no nível de expressão pode ter influência na alteração da atividade locomotora observada em fêmeas infectadas (Xi et al, 2008; Lima-Camara et al, 2011).

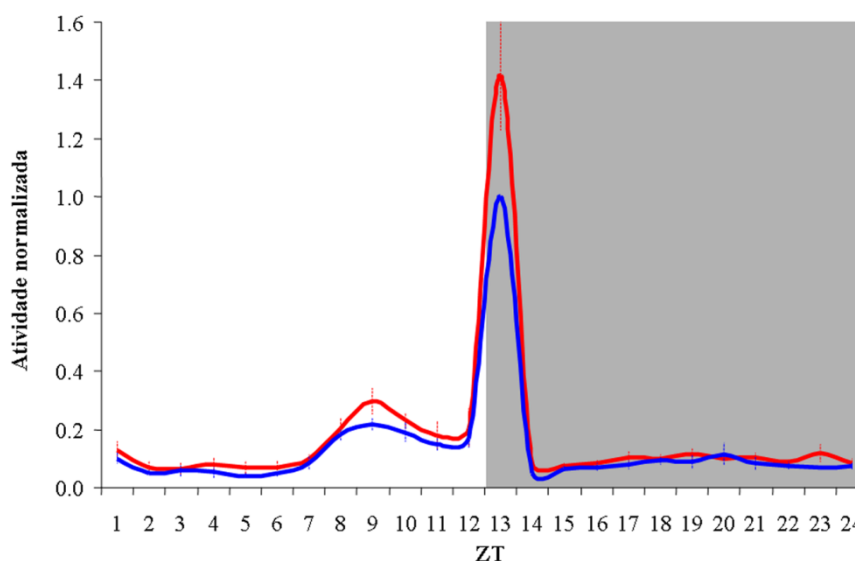


Figura 4: Atividade Locomotora de Fêmeas de *Aedes aegypti* Infectadas com DENV-2. Atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas com DENV-2 (linha vermelha) e não infectadas (linha azul) sob LD 12:12, a 25°C. Pode-se notar o aumento da atividade das fêmeas infectadas, tanto na fotofase quanto na escotofase. Linhas tracejadas da mesma cor da linha contínua representam as barras de erros. Autoria da Figura: Tamara Nunes de Lima-Camara.

Enquanto *Ae. aegypti* mostra-se mais ativo durante a fase clara do dia, com pouca ou nenhuma atividade noturna, outros mosquitos são mais ativos durante a noite, como é o caso de alguns vetores do gênero *Culex* (Clements 1999), como mencionado acima. *Culex quinquefasciatus* é vetor do parasita *Wuchereria bancrofti* (Ahid et al. 2000). Em condições de laboratório, fêmeas dessa espécie tiveram a atividade marcadamente restrita às horas da fase escura, quando submetidas a ciclos de claro/escuro e o período dessa espécie, calculada durante cinco dias de escuro constante, foi de aproximadamente 24h (Gentile et al, 2009). Gentile e colaboradores (2009) descreveram o padrão de expressão do RNA mensageiro dos principais genes do relógio em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, tanto da primeira quanto da segunda alça regulatória. Apesar de *Ae. aegypti* ser um mosquito diurno e *Cx. quinquefasciatus* ser um mosquito noturno, pode-se observar, de maneira geral, um perfil de expressão semelhante entre as duas espécies e ainda, alguns aspectos bastante semelhantes ao que é visto em *Drosophila*: os genes *per* e *tim* têm seu pico de expressão na escotofase e em antifase com os picos dos genes *Clk* e *cyc*, sendo que este último, ao contrário de *Drosophila*, apresenta padrão de expressão cíclico. Os genes *vri* e *Pdp1* apresentam seus picos de expressão em fases distintas, o que sugere uma competição entre os dois genes pelos mesmos sítios de regulação, tal como em *Drosophila*.

Entretanto em mosquitos existem duas formas do gene *cryptochrome*: uma semelhante ao fotoreceptor (*cry-1*) de *Drosophila* e outra (*cry-2*) que é o ortólogo ao repressor transcricional encontrado em vertebrados (Yuan et al 2007) e ausente na mosca de frutas. A expressão do gene *cry1* não parece oscilar tanto em *Ae. aegypti* como em *Cx. quinquefasciatus*. No entanto, a expressão do gene *cry2* apresentou uma diferença marcante no padrão de ciclagem entre as duas espécies: em *Culex*, há somente um pico de expressão do gene, na escotofase, enquanto em *Aedes* a expressão de *cry2* apresenta um padrão bimodal, ou seja, dois picos de expressão gênica. Essa diferença sugere fortemente que a regulação desse gene seja diferente nas duas espécies e que isso esteja possivelmente relacionado com o padrão de atividade locomotora – diurna X noturna – observado nestes dois tipos de mosquitos (Gentile et al, 2009).

Ensaio de microarranjos de DNA também já foram feitos para investigar aspectos moleculares da regulação circadiana tanto em *Ae. aegypti* como em *An. gambiae*. Das & Dimopoulos (2008) observaram que pulsos curtos de luz (cerca de 2 a 5 minutos) aplicados no ZT 19:30 (que corresponde à aproximadamente metade da escotofase) são capazes de inibir a alimentação sanguínea momentaneamente, sugerindo um efeito de mascaramento. Porém, pulsos de luz mais longos (cerca de 1 a 2 horas) aplicados no mesmo horário causam um avanço na fase da alimentação sanguínea, de maneira dependente do relógio circadiano. Ensaio de microarranjos mostraram que este mesmos pulsos de luz afetavam a expressão de muitos genes, incluindo diversos ortólogos de genes com regulação circadianos em *Drosophila*. Além disso, eles mostraram que o relógio também regula a propensão à alimentação sanguínea uma vez que alguns genes do relógio, quando silenciados pela técnica de RNA de interferência, promovem uma mudança deste comportamento em *An. gambiae* (Das & Dimopoulos 2008).

Também em *Ae. aegypti*, ensaios de microarranjos em cabeças de fêmeas adultas coletadas em intervalos regulares em ciclos de claro/escuro (Ptitsyn et al, 2011) mostraram que transcritos relacionados às mais diversas funções biológicas apresentavam expressão cíclica. Finalmente, ensaios semelhantes em *An. gambiae* realizados em fêmeas adultas inseminadas e não alimentadas com sangue mostrou que cerca de 15% dos transcritos estão sobre controle do relógio circadiano, como, por exemplo, genes relacionados ao metabolismo, à detoxificação metabólica e aos eventos de transcrição e tradução (Rund et al, 2011).

– Flebotomíneos

Os flebotomíneos pertencem à família Psychodidae e têm grande importância epidemiológica para o homem, pois as fêmeas são hematófagas e muitas espécies são transmissoras dos protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, causadores das leishmanioses. *Lutzomyia longipalpis* é a principal espécie vetora do agente etiológico da leishmaniose visceral americana (Deane & Deane, 1962; Soares & Turco, 2003; Lainson & Rangel, 2005). Em condições naturais, *L. longipalpis* concentra suas atividades principalmente durante as horas de crepúsculo e à noite (Deane & Deane, 1957; Sherlock & Guitton, 1969; Morrison et al, 1995; Feliciangeli et al, 2004).

Conforme citado anteriormente, a alimentação sanguínea em mosquitos tem efeito na sua atividade locomotora. Sendo assim, Meirelles-Filho et al (2006a) examinaram se efeito semelhante era observado em *L. longipalpis* sob condições de laboratório. Os autores compararam a atividade locomotora de fêmeas de *L. longipalpis* ingurgitadas com sangue e não ingurgitadas em condições de LD 12:12 e em escuro constante. Em LD 12:12, foi observado que tanto os machos quanto as fêmeas não alimentadas e ingurgitadas com sangue apresentaram um padrão de atividade tipicamente crepuscular-noturno e essencialmente unimodal, com o pico ocorrendo próximo à transição da fotofase e escotofase. Em escuro constante, os machos de *L. longipalpis* mantiveram a atividade locomotora rítmica, porém, com o pico do crepúsculo ocorrendo ligeiramente mais cedo, sugerindo um período endógeno menor que 24h (~23h). A alimentação sanguínea reduziu significativamente o pico da atividade das fêmeas em aproximadamente 40% (Meirelles-Filho et al, 2006a).

No Brasil, diversos estudos indicam que *L. longipalpis* é um complexo de espécies (revisões em Bauzer et al., 2007; Maingon et al., 2008). Em Sobral, Ceará, por exemplo, duas espécies simpátricas do complexo *L. longipalpis*, diferem na composição dos feromônios dos machos, nos padrões de sons de cópula e em marcadores moleculares (Bauzer et al., 2002; Maingon et al., 2003; Souza et al., 2004; Araki et al., 2009). Nessa localidade, machos dessas duas espécies podem ser separados também pelo número de manchas abdominais: Sobral 1S, cujos machos apresentam um par de manchas claras apenas no 4º tergito, e Sobral 2S, cujos machos apresentam um par adicional de manchas claras no 3º tergito (Ward et al 1983). Machos e fêmeas de colônias de laboratório destas duas espécies tiveram seu padrão de atividade locomotora analisado. Foi observado que tanto os machos quanto as fêmeas de Sobral 2S iniciaram a atividade crepuscular aproximadamente de 30 minutos a 1 hora mais cedo do que os machos

e fêmeas de Sobral 1S e que essa diferença foi estatisticamente significativa (Rivas et al. 2008). Esses dados, portanto, mostram duas espécies simpátricas do Complexo *L. longipalpis* no Brasil apresentando diferenças em um aspecto do comportamento que pode ter um impacto na capacidade vetorial.

O estudo da genética molecular do relógio em *L. longipalpis* ainda é rudimentar, mas sugere algumas diferenças claras em relação a *Drosophila* e mosquitos (Meireles-Filho et al, 2006a,b). Em flebotomíneos, os genes *per* e *tim* apresentam perfis de expressão similares entre moscas e mosquitos, mas o gene *Clk* apresenta um padrão de expressão rítmica em antifase em comparação com o seu ortólogo em *Drosophila*. Por fim, o gene *cyc* apresenta expressão cíclica em *L. longipalpis*, tal como em mosquitos e diferentemente do que ocorre em *Drosophila* (Meireles-Filho et al, 2006b).

O gene *cyc* também apresenta uma peculiaridade em relação a *Drosophila*. A proteína CYC, tanto de flebotomíneos quanto de mosquitos, abelhas e mariposas, apresenta um domínio de transativação na porção C-terminal ausente em *Drosophila* (Rutila et al, 1998; Meireles-Filho et al, 2006b, Rubin et al, 2006, Chang et al, 2003). É possível que, ao longo da evolução, CYC de *Drosophila* tenha perdido esse domínio devido à presença de outro domínio de ativação, rico em glutamina (poli-Q), presente em CLK (Allada et al, 1998) Portanto, enquanto em *Drosophila* o ativador transcricional é CLK, em flebotomíneos, este papel seria desempenhado por CYC como ocorre em vertebrados e em alguns outros insetos (Takahata et al, 2000; Chang et al, 2003; Markova et al, 2003; Meireles-Filho et al, 2006a; Rubin et al, 2006; Sandrelli et al 2008).

A relação entre os genes de relógio e ritmos de atividade em *L. longipalpis* também pode ser vista em fêmeas alimentadas com sangue. Nestes ensaios, o padrão de expressão dos genes *per* e *tim* e a amplitude do ritmo de locomoção diminuem em relação às fêmeas não alimentadas. Uma hipótese é que isso seja efeito da modificação do nível redox celular e isso que altere a expressão dos genes de relógio (Meireles-Filho et al, 2006a).

Nesse capítulo pudemos observar que, apesar da importância epidemiológica de dípteros vetores, muito pouco ainda se sabe sobre o controle molecular dos seus diferentes ritmos circadianos. No entanto, os ensaios de comportamento e os experimentos de biologia molecular já realizados mostram que, assim como em outros organismos, os ritmos circadianos são fundamentais na biologia desses animais e tem provavelmente um papel importante na dinâmica de transmissão de doenças relacionadas aos patógenos transmitidos por eles. O avanço nos estudos das bases moleculares do marcapasso que controla estes ritmos certamente contribuirá tanto para um maior entendimento do relógio circadiano nestes vetores, como também de que forma este afeta aspectos da capacidade vetorial destes.

Referencias Bibliográficas.

- Ahid S.M., Vasconcelos P.S., Lourenço-de-Oliveira R., 2000. Vector competence of *Culex quinquefasciatus* Say from different regions of Brazil to *Dirofilaria immitis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 95:769-75.
- Allada R., White N.E., So W.V., Hall J.C., Rosbash M., 1998. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian *Clock* disrupts circadian rhythms and transcription of *period* and *timeless*. Cell. 93, 791-804.
- Araki A.S., Vigoder F.M., Bauzer L.G., Ferreira G.E., Souza N.A., Araújo I.B., Hamilton J.G., Brazil R.P., Peixoto A.A., 2009. Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). PLoS Negl Trop Dis. 3(1):e365.
- Aschoff J., 1954. Zeitgeber der Tierischen Tagesperiodik. Naturwissenschaften. 41, 49-56.
- Aschoff J., 1951. Die 24-Strunden-Periodik der Maus under konstanten Umweltbedingungen. Naturwissenschaften. 38, 506-507
- Bauzer L.G., Gesto J.S., Souza N.A., Ward R.D., Hamilton J.G., Kyriacou C.P., Peixoto A.A., 2002. Molecular divergence in the *period* gene between two putative sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex. Molecular Biology and Evolution. 9,1624 – 1627 .
- Bauzer L.G., Souza N.A., Maingon R.D., Peixoto A.A., 2007. *Lutzomyia longipalpis* in Brazil: a complex or a single species? A minireview. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.102, 1 – 12 .
- Boothroyd C.E., Young, M.W., 2008. The in(put)s and out(put)s of the *Drosophila* circadian clock. Ann N Y Acad Sci. 1129:350-7.
- Chang D.C., McWatters H.G., Williams J.A., Gotter A.L., Levine J.D., Reppert S.M., 2003. Constructing a feedback loop with circadian clock molecules from the silkworm, *Antheraea pernyi*. J Biol Chem. 278, 38149-38158.
- Clements A.N., 1999. The Biology of Mosquitoes Vol. 2: Sensory Reception and Behaviour. CABI Publishing, New York.
- Collins B.H., Rosato E., Kyriacou C.P., 2004. Seasonal behavior in *Drosophila melanogaster* requires the photoreceptors, the circadian clock, and phospholipase C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101, 1945–1950.
- Daan S., Pittendrigh, C.S., 1976. A Functional analysis of circadian pacemaker in nocturnal rodents. J. Comp. Physiol. 106A, 223-266.

- Das S., Dimopoulos G., 2008. Molecular analysis of photic inhibition of blood-feeding in *Anopheles gambiae*. BMC Physiol. 8,23.
- Deane L.M., Deane M.P., 1957. Observações sobre abrigos e criadouros de flebótomos do Noroeste do Estado do Ceará . Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais. 9, 225 – 246.
- Deane L.M., Deane M.P. 1962. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 4, 198–212.
- Doherty C.J., Kay S.A., 2010. Circadian control of global gene expression patterns. Annu Rev Genet. 44,419-44.
- Feliciangeli M.D., Arrivillaga J.C., Bravo A., Arias F., 2004. Activity of *Lutzomyia pseudolongipalpis* and *L. longipalpis* s.l. (Diptera: Psychodidae) in Venezuela. Parasite. 11, 273-278.
- Gentile C., Rivas G.B.S., Meireles-Filho A.C.A., Lima J.B.P., Peixoto A.A., 2009. Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: *cry2* is different. J Biol Rhythms. 24, 444-51.
- Gillett J.D., Haddow A.J., Corbet P.S., 1959. Observations on the oviposition-cycle of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus), II. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 53, 35-41.
- Glaser F.T., Stanewsky R., 2005. Temperature synchronization of the *Drosophila* circadian clock. Curr Biol. 15,1352-63.
- Gomes A.S., Sciavico C.J.S., Eiras A.E., 2006. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. Rev Soc Bras Med Trop. 39, 327-332.
- Grima B., Chélot E., Xia R., Rouyer F., 2004. Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. Nature. 431,869-73.
- Haddow A.J., Gillett J.D., 1957. Observations on the oviposition-cycle of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus). Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 51,159-169.
- Hamasaka Y., Rieger D., Parmentier M.L., Grau Y., Helfrich-Förster C., Nässel D.R., 2007. Glutamate and its metabotropic receptor in *Drosophila* clock neuron circuits. J Comp Neurol. 505, 32-45
- Hardin P.E., 2005. The Circadian Timekeeping System of *Drosophila*. Curr Biol. 15, R714-R722.
- Hardin P.E., 2011. Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. Adv Genet. 74, 141-73.
- 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, 135-54.
- 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.
- Houl J.H., Yu W., Dudek S.M., Hardin P.E., 2006. *Drosophila* CLOCK is constitutively expressed in circadian oscillator and non-oscillator cells. J Biol Rhythms. 21, 93-103.
- Jones M.D.R., 1981.The programming of circadian flight activity in relation to mating and the gonotrophic cycle in the mosquito *Aedes aegypti*. Physiology Entomology. 6, 307-313.
- Keegan K.P., Pradhan S., Wang J.P., Allada R., 2007. Meta-analysis of *Drosophila* circadian microarray studies identifies a novel set of rhythmically expressed genes. PLoS Comput Biol. 3, e208.

- Kim E.Y., Bae K., Ng F.S., Glossop N.R., Hardin P.E., Edery I., 2006. *Drosophila* CLOCK protein is under posttranscriptional control and influences light-induced activity. *Neuron*. 34, 69-81.
- Konopka R.J., Benzer S., 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 68, 2112-2116.
- Kumar, S., Chen, D., Sehgal, A., 2012. Dopamine acts through Cryptochrome to promote acute arousal in *Drosophila*. *Genes Dev*, May 11. [Epub ahead of print]
- Lainson R., Rangel E.F., 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 100, 811-27.
- Lima-Camara T.N., Bruno R.V., Luz P.M., Castro M.G., Lourenço-de-Oliveira R., Sorgine M.H., Peixoto A.A., 2011. Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. *PLoS One*. 6(3):e17690.
- Maingon R.D., Ward R.D., Hamilton J.G., Noyes H.A., Souza N.A., Kemp, S.J., Watts P.C., 2003. Genetic identification of two sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) that produce distinct male sex pheromones in Sobral, Ceará State, Brazil. *Molecular Ecology*. 12, 1879 – 1894.
- Maingon R.D., Ward R.D., Hamilton J.G., Bauzer L.G., Peixoto, A.A., 2008. The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to *Leishmania* transmission? *Trends in Parasitology*. 24, 12 – 17.
- Majercak J., Sidote D., Hardin P.E., Edery, I., 1999. How a circadian clock adapts to seasonal decreases in temperature features of *Drosophila* day length. *Neuron*. 24, 219–230
- Majercak J., Chen W.F., Edery I., 2004. Splicing of the gene 3'-terminal intron is regulated by light, circadian clock factors, and phospholipase C. *Mol. Cell. Biol*. 24, 3359– 2116.
- Markova E.P., Ueda H., Sakamoto K., Oishi K., Shimada T., Takeda M., 2003. Cloning of *Cyc* (*Bmal1*) homolog in *Bombyx mori*: structural analysis and tissue specific distributions. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 134, 535-542.
- Marques M.D., Golombek D., Moreno C. 2003. Adaptação temporal. In: Marques N, Menna-Barreto L, orgs. *Cronobiologia: princípios e aplicações*. São Paulo: EDUSP-Fiocruz; 2003. p. 45-84.
- Meireles-Filho A.C., da S Rivas G.B., Gesto J.S., Machado R.C., Britto C., de Souza N.A., Peixoto A.A., 2006a. The biological clock of an hematophagous insect: Locomotor activity rhythms, circadian expression and downregulation after a blood meal. *FEBS Lett*. 580, 2-8.
- Meireles-Filho A.C., Amoretty P.R., Souza N.A., Kyriacou C.P., Peixoto A.A., 2006b . Rhythmic expression of the *cycle* gene in a hematophagous insect vector. *BMC Mol Biol*. 7, 38.
- Moore-Ede M.C., Sulzman F.M., Fuller C.A., 1982. The clocks that time us- *Physiology of the circadian timing system*. London: Harvard University Press; 1982.
- Morrison, A.C., Ferro C., Pardo R., Torres M., Wilson M.L., Tesh R.B., 1995. Nocturnal activity patterns of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *Journal of Medical Entomology*. 32, 605-617.
- Murad A., Emery-Le M., Emery P., 2007. A subset of dorsal neurons modulates circadian behavior and light responses in *Drosophila*. *Neuron*. 53,689-701.

- Peschel N., Chen K.F., Szabo G., Stanewsky R., 2009. Light-dependent interactions between the *Drosophila* circadian clock factors cryptochrome, jetlag, and timeless. *Curr Biol.* 19,241-7.
- Picot M., Klarsfeld A., Chélot E., Malpel S., Rouyer F., 2009. A role for blind DN2 clock neurons in temperature entrainment of the *Drosophila* larval brain. *J Neurosci.* 29,8312-20.
- Platt K.B., Linthicum K.J., Myint K.S., Innis B.L., Lerdthusnee K, et al. 1997. Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 57,119-125.
- Ptitsyn A.A., Reyes-Solis G., Saavedra-Rodriguez K., Betz J., Suchman E.L., Carlson J.O., Black WC 4th., 2011. Rhythms and synchronization patterns in gene expression in the *Aedes aegypti* mosquito. *BMC Genomics.* 12,153.
- Putnam J.L., Scott T.W., 1995. Blood-feeding behavior of dengue-2 virus-infected *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 52, 225-227.
- Reischig T., Stengl M., 2003. Ectopic transplantation of the accessory medulla restores circadian locomotor rhythms in arrhythmic cockroaches (*Leucophaea maderae*). *J Exp Biol.* 206,1877–1886.
- Rieger D., Shafer O.T., Tomioka K., Helfrich-Förster C., 2006. Functional analysis of circadian pacemaker neurons in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci.* 26,2531-43.
- Rivas G.B., Souza N.A., Peixoto AA., 2008. Analysis of the activity patterns of two sympatric sandfly siblings of the *Lutzomyia longipalpis* species complex from Brazil. *Med Vet Entomol.* 22,288-90.
- Rubin E.B., Shemesh Y., Cohen M., Elgavish S., Robertson H.M., 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.
- Rund S.S., Hou T.Y., Ward S.M., Collins F.H., Duffield G.E., 2011. Genome-wide profiling of diel and circadian gene expression in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108,E421-30.
- Rutila J.E., Suri V., Le M., So W.V., Rosbash M., Hall J.C., 1998. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila period* and *timeless*. *Cell.* 93, 805-814.
- Saunders D.S., 2002. *Insect Clocks*. 3rd edition Elsevier Science. Amsterdam.
- Savage H.M., Anderson M., Gordon E., McMillen L., Colton L., Delorey M., Sutherland G., Aspen S., Charnetzky D., Burkhalter K., Godsey M., 2008. Host-seeking heights, host-seeking 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.* 45,276-88.
- Sehadova H., Glaser F.T., Gentile C., Simoni A., Giesecke A., Albert J.T., Stanewsky R., 2009. Temperature entrainment of *Drosophila*'s circadian clock involves the gene *nocte* and signaling from peripheral sensory tissues to the brain. *Neuron.* 64,251-66.
- Shafer O.T., Helfrich-Förster C., Renn S.C., Taghert P.H., 2006. Reevaluation of *Drosophila melanogaster*'s neuronal circadian pacemakers reveals new neuronal classes. *J Comp Neurol.* 498,180-93.
- Shang Y., Griffith L.C., Rosbash M., 2008. Light-arousal and circadian photoreception circuits intersect at the large PDF cells of the *Drosophila* brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105,19587-94.

- Sherlock I., Guitton N., 1969. Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia IV - Variação horária e estacional do *Phlebotomus longipalpis*. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais. 21, 715-727.
- Soares R.P.P., Turco S.J., 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae:Phlebotominae): a review. An. Acad. Bras. Cienc. 75, 301–330.
- Souza N.A., Vigoder F.M., Araki A.S., Ward R.D., Kyriacou C.P., Peixoto, A.A., 2004. Analysis of the copulatory courtship songs of *Lutzomyia longipalpis* in six populations from Brazil. Journal of Medical Entomology. 41 906 – 913.
- Stanewsky R., Kaneko M., Emery P., Beretta B., Wager-Smith K., Kay S.A., Rosbash M., Hall J.C., 1998. The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. Cell. 95, 681–92.
- Stanewsky R., 2003. Genetic analysis of the circadian system in *Drosophila melanogaster* and mammals. J Neurobiol. 54, 111-47.
- Stoleru D., Nawathean P., Fernández M.P., Menet J.S., Ceriani M.F., Rosbash M., 2004. The *Drosophila* circadian network is a seasonal timer. Cell. 129, 207-19.
- Takahata S., Ozaki T., Mimura J., Kikuchi Y., Sogawa K., Fujii-Kuriyama Y., 2000. Transactivation mechanisms of mouse clock transcription factors, *mClock* and *mArnt3*. Genes Cells. 5, 739-747.
- Taylor B., Jones M.D.R., 1969. The circadian rhythm of flight activity in the mosquito *Aedes aegypti* (L.): the phase-setting effects of light-on and light-off. Journal of Experimental Biology, 51, 59-70.
- Tomioka K, Matsumoto A., 2010. A comparative view of insect circadian clock systems. Cell Mol Life Sci. 67, 1397-406.
- Ward RD, Ribeiro AL, Ready PD, Murtagh A (1983) Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) the vector of *Leishmania donovani* chagasi Cunha & Chagas and its significance to Kala-azar distribution in South America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 78,269-280.
- Wheeler, D.A., Hamblen-Coyle, M.S., Dushay, M.S., Hall, J.C., 1993. Behavior in light-dark cycles of *Drosophila* mutants that are arrhythmic, blind, or both. J.Biol. Rhythms 8, 67–94.
- Xi Z., Ramirez J.L., Dimopoulos G., 2008. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. PLoS Pathogens 4, e1000098.
- Yoshii, T., Sakamoto, M., Tomioka, K., 2002. A temperature-dependent timing mechanism is involved in the circadian system that drives locomotor rhythms in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Zool. Sci. 19, 841–850.
- Yu W., Zheng H., Houl J.H., Dauwalder B., Hardin P.E., 2006. PER-dependent rhythms in CLK phosphorylation and E-box binding regulate circadian transcription. Genes Dev. 20, 723-733.
- Yuan Q., Metterville D., Briscoe A.D., Reppert S.M., 2007. Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. Mol Biol Evol. 24, 948-55.
- Zhang E.E., Kay S.A., 2011. Clocks not winding down: unravelling circadian networks. Nat Rev Mol Cell Biol. 11,764-76.