

Genética molecular dos ritmos circadianos em insetos vetores

Molecular genetics of circadian rhythms in insect vectors

Gustavo Bueno da Silva Rivas

Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, FIOCRUZ-RJ

Contato do autor: gbsrivas@ioc.fiocruz.br

Resumo. A maioria dos seres vivos apresenta um marcapasso endógeno conhecido como relógio circadiano, responsável por gerar e coordenar oscilações rítmicas em sua fisiologia e comportamento com um período de aproximadamente 24 horas. Em insetos, as bases moleculares deste mecanismo têm sido elucidadas na espécie modelo *Drosophila melanogaster*. Em contrapartida, em insetos vetores pouco se sabe a este respeito apesar da importância dos seus ritmos diários de atividade e hematofagia para a dinâmica de transmissão de patógenos. Neste resumo, revisamos alguns dos trabalhos publicados acerca da genética molecular dos ritmos circadianos em insetos vetores.

Palavras-chave. Relógio circadiano; Insetos vetores; Genética molecular.

Abstract. The majority of living organisms present an endogenous pacemaker, known as the circadian clock, responsible for driving rhythmic oscillations in their physiology and behaviour with a period of approximately 24 hours. In insects, the genetic bases of this mechanism have been elucidated in the model species *Drosophila melanogaster*. However, in insect vectors little is known about it despite the importance of their daily rhythms of activity and blood-feeding for the dynamics of pathogen transmission. We reviewed some of the published papers on the molecular genetics of circadian rhythms in insect vectors.

Keywords. Circadian clock; Insect vectors; Molecular genetics.

Recebido 18out10

Aceito 20mar12

Publicado 27dez12

Introdução

Desde que as primeiras formas de vida surgiram no planeta, estas têm sido submetidas a ciclos diários de luz e temperatura, causados pelas rotações da Terra ao redor de seu próprio eixo. Os mais diversos organismos desenvolveram estratégias que permitiram sua adaptação às variações cíclicas do ambiente, passando a apresentar oscilações diárias em sua fisiologia e comportamento. Estes ritmos, chamados de circadianos (*lat. circa=cerca; diem=dia*) por apresentarem um período de aproximadamente 24 horas em condições constantes, são gerados por um marcapasso endógeno de caráter independente. Diversos estudos, envolvendo a espécie modelo *Drosophila melanogaster*, mostram que seu relógio circadiano é composto por diversos genes que interligados formam alças autorregulatórias (revisado em Hardin, 2011).

Neste marcapasso, os fatores transcricionais codificados pelos genes *Clock* (*Clk*) e *cycle* (*cyc*) formam um heterodímero que ativa as expressões de *period* (*per*), *timeless* (*tim*), *vri* (*vri*) e *PAR domain protein 1* (*Pdp1*) pela ligação às regiões E-box (CACGTG) em seus promotores (Figura 1) (Darlington et al, 1998; Glossop et al, 2003; Cyran et al, 2003; Hardin, 2011). Em uma das alças regulatórias, as proteínas codificadas pelos genes *per* e *tim*

formam um dímero (PER/TIM) que dentro do núcleo interage fisicamente com CLK/CYC, inibindo seu papel de fator transcricional (Figura 1). Desta forma, *per* e *tim* conseguem regular de forma indireta sua própria transcrição (Chang e Reppert, 2003; Yu et al, 2006).

Em outra alça regulatória, dois outros genes, *vri* e *Pdp1*, também são ativados por CLK/CYC (Cyran et al, 2003). Suas proteínas, VRI e PDP1ε (proteína resultante de um dos transcritos alternativos de *Pdp1*) competem entre si para se ligar em um sítio localizado na região promotora de *Clk*, sendo o primeiro, um repressor e o segundo, um ativador desta transcrição (Figura 1) (Cyran et al, 2003). Como o acúmulo de VRI e PDP1ε ocorre em momentos diferentes (VRI no início da noite e PDP1 no meio da noite), a cada 24 horas, isto acaba gerando um controle rítmico tanto na repressão quanto na ativação da expressão de *Clk* (Cyran et al, 2003).

Recentemente, uma terceira alça regulatória foi postulada, envolvendo o gene *clockwork orange* (*cwo*), que codifica um repressor transcricional que atuaria modulando alguns dos principais genes do relógio circadiano de *Drosophila* (Matsumoto et al, 2007). Entretanto, o papel de *cwo* no relógio ainda não está muito bem definido, visto que alguns trabalhos obtiveram resultados diferentes (Kadener et al, 2007; Lim et al, 2007; Matsumoto et al, 2007; Richier et al, 2008).

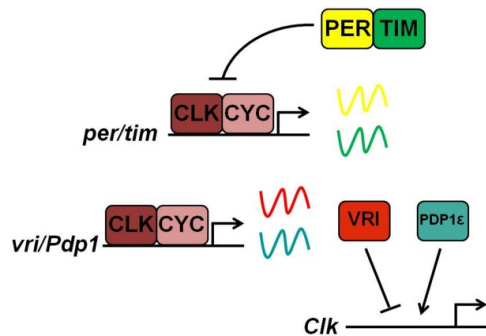


Figura 1. Esquema das alças regulatórias do relógio circadiano de *Drosophila melanogaster*. As senóides em cores representam transcrição rítmica. As setas representam regulação positiva, enquanto que as linhas com barras no final representam regulação negativa. A descrição detalhada do esquema encontra-se no texto.

O processo de autorregulação negativa ocorre de maneira complexa, em diferentes etapas, conforme mostrado na figura 2. No início do dia, o heterodímero CLK/CYC encontra-se livre da repressão de PER/TIM (Figura 2A e B) graças à ação indireta da luz intermediada por CRY. Isto ocorre porque CRY é estimulada pela luz e sofre uma mudança conformacional que a torna ativa, acarretando a fosforilação de TIM, que é marcada para degradação via proteossoma (Figura 2B) (Stanewsky et al, 1998; Ceriani et al, 1999). Já PER é fosforilada pela quinase DOUBLE-TIME (DBT) e tal processo marca PER para uma via de degradação (revisado em Hardin, 2011). Entretanto, no início da noite, com CRY inativo, TIM começa a se acumular no citoplasma (Figura 2C). Neste momento, PER torna-se estável pela presença de TIM e também graças à fosfatase PP2a (Protein phosphatase 2) (Sathyanarayanan et al, 2004), que remove os fosfatos em PER anteriormente adicionados por DBT (Figura 2C). Em seguida, por volta da metade da noite, após o acúmulo de PER e TIM, estas entram no núcleo (Figura 2D). Todavia, sua entrada é regulada por mecanismos pós-traducionais. PER e TIM são fosforiladas pelas quinases Caseína quinase 2 (CK2) e SHAGGY (SGG), respectivamente (Figura 2D) (Martinek et al, 2001; Lin et al, 2002; Akten et al, 2003). No final da noite, já dentro do núcleo, o heterodímero PER/TIM interage com CLK/CYC formando um complexo multimérico que impede a continuidade das transcrições dos genes controlados por CLK/CYC (Figura 2E). Este processo persiste até as primeiras horas do dia (ZT1-ZT3) (Figura 2E).

Uma vez que, em condições constantes os genes de relógio não oscilam com um período de exatamente 24 horas, a luz, diariamente, promove o “acerto” (arrastamento) das fases de oscilação circadiana de expressão destes genes, de acordo com o ciclo ambiental dia/noite. Isto porque a luz é um fator associado à degradação de TIM, conforme descrito anteriormente, determinando, portanto, o tempo de ativação dos genes regulados por CLK/CYC. Além disso, a ação de quinases e fosfatases (Figura 2B/C/D) em PER e TIM promove não somente a manutenção de um atraso entre as fases de suas proteínas, mas também determina o tempo de sua entrada no núcleo (Figura 2D). Estes processos são cruciais, pois impedem uma

repressão prematura de *per* e *tim*, que seria prejudicial no estabelecimento do ritmo.

Outro fato curioso é o controle da atividade da proteína CLK. Apesar de *Clk* ser expresso de forma rítmica (Figura 1), sua proteína não apresenta variação cíclica de abundância (Houl et al, 2006; Yu et al, 2006).

Como então este ativador transcricional, que não oscila, é responsável pela expressão rítmica de *per* e *tim*, por exemplo? A resposta para esta questão está no fato de que, apesar de não oscilar, pode-se observar que CLK está hiperfosforilada, 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* (Figura 2E), o que sugere que CLK seria mais ativa quando hipofosforilada (Kim e Edery, 2006; Yu et al, 2006).

De fato, o relógio circadiano não é completamente dependente de uma ritmicidade de seus transcritos e proteínas. Alguns trabalhos discutem que alterações na transcrição rítmica afetam relativamente pouco a funcionalidade do relógio de diversos organismos e que as modificações pós-traducionais do relógio é que seriam cruciais para o seu funcionamento (Lakin-Thomas, 2006; Zheng e Sehgal, 2008). O cerne do relógio circadiano, como discutido até aqui, gera padrões rítmicos de expressão e atividade protéica sustentando não somente sua própria oscilação, mas também influenciando centenas de genes que controlam aspectos da fisiologia, metabolismo e comportamento (e.g. Keegan et al, 2007).

Genética dos ritmos circadianos em insetos vetores

Assim como em outros organismos, os ritmos de atividade e de alimentação apresentados por insetos vetores são controlados por um marcapasso endógeno (revisado em Clements, 1999; Saunders, 2002). Estes ritmos são cruciais na determinação do tempo e do grau de contato com seus hospedeiros e conseqüentemente são importantes para a transmissão de patógenos. Apesar disso, pouco é sabido a respeito das bases moleculares que controlam o relógio circadiano de insetos hematófagos. Abaixo revisamos alguns dos trabalhos feitos, estudando a genética e biologia molecular do relógio circadiano de três grupos de vetores: flebotomíneos, mosquitos e triatomíneos.

Flebotomíneos

O flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* s.l. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) é o principal vetor da leishmaniose visceral nas Américas. Esta espécie, na natureza, é mais ativa no crepúsculo vespertino e à noite (Morrison et al, 1995; Feliciangeli et al, 2004). De fato, este padrão também é observado em condições controladas artificialmente no laboratório (Meyreles-Filho et al, 2006a; Rivas et al, 2008). O estudo da genética molecular do relógio nesta espécie parece indicar algumas diferenças em relação ao modelo *Drosophila* (Meyreles-Filho et al, 2006a; Meyreles-Filho et al, 2006b). Embora os genes *per* e *tim* apresentem perfis de expressão similares nas duas espécies

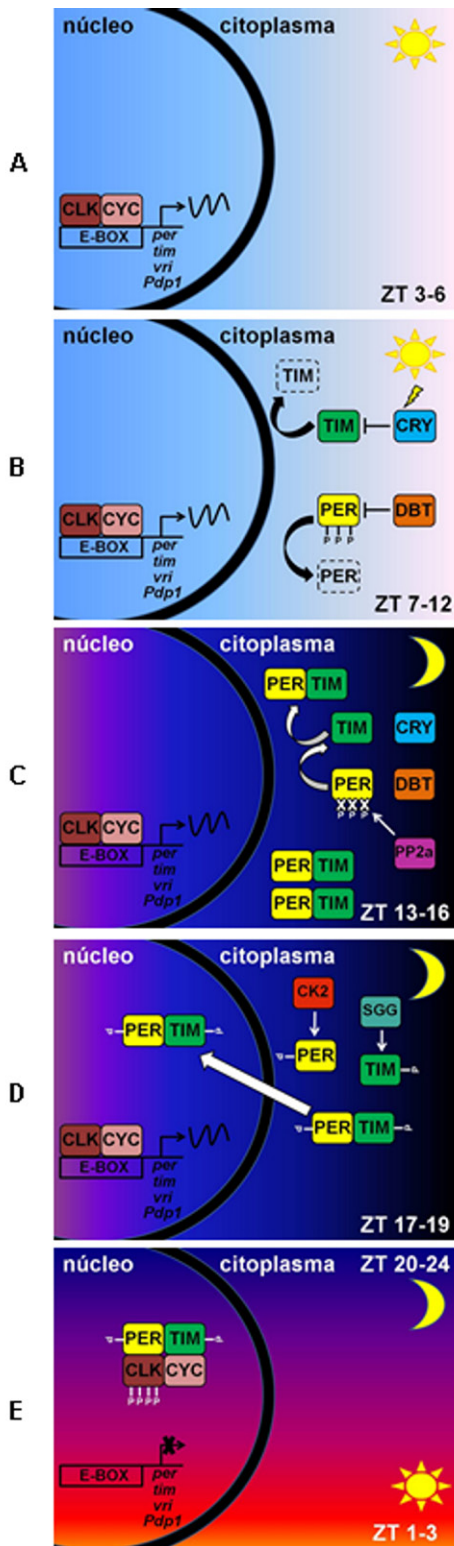


Figura 2. Modelo representativo do relógio circadiano dentro de uma célula de *D. melanogaster* em diferentes momentos do ciclo (A-E). A descrição detalhada deste processo encontra-se no texto. As senóides representam transcrição rítmica. As setas finas representam regulação positiva, enquanto que as linhas com barras no final representam regulação negativa. Setas largas, curvas e pretas, via de degradação. Setas largas, curvas e claras, interação de PER com TIM. Setas largas, retas e claras entrada no núcleo. P, sítios de fosforilação. Raio, ativação de CRY pela luz. PER e TIM, retângulos pontilhados, representam suas respectivas proteínas degradadas. ZT (Zeitgeber Time: representação do ciclo ambiental medido em horas).

(Figura 3), o gene *Clk* de *Lutzomyia* apresenta um padrão de expressão rítmica em antifase ao de seu homólogo em *Drosophila* (Figura 3). Já o gene *cyc* apresenta expressão cíclica em *L. longipalpis*, enquanto que em *Drosophila*, a expressão deste gene é constitutiva (Figura 3) (Rutila et al, 1998; Meireles-Filho et al, 2006b).

Além disso, no caso de *cyc*, a diferença entre estas espécies não se limita apenas à expressão gênica, já que a proteína codificada por este gene em flebotomíneos, assim como em muitos outros insetos, apresenta uma cauda de ativação que está ausente em *Drosophila* (Meireles-Filho et al, 2006b; Sandrelli et al, 2008). Acredita-se que ao longo da evolução, *CYC* de *Drosophila* tenha perdido esta cauda devido à presença na proteína CLK de outra cauda (poli-Q) que exerce a mesma função ativadora vista em *CYC* (Allada et al, 1998).

Desta forma, enquanto que em *Drosophila* o ativador transcricional é CLK, em flebotomíneos, este papel seria possivelmente desempenhado por *CYC* como ocorre em vertebrados e em outros insetos (Takahata et al, 2000; Chang et al, 2003; Markova et al, 2003; Meireles-Filho et al, 2006a; Rubin et al, 2006).

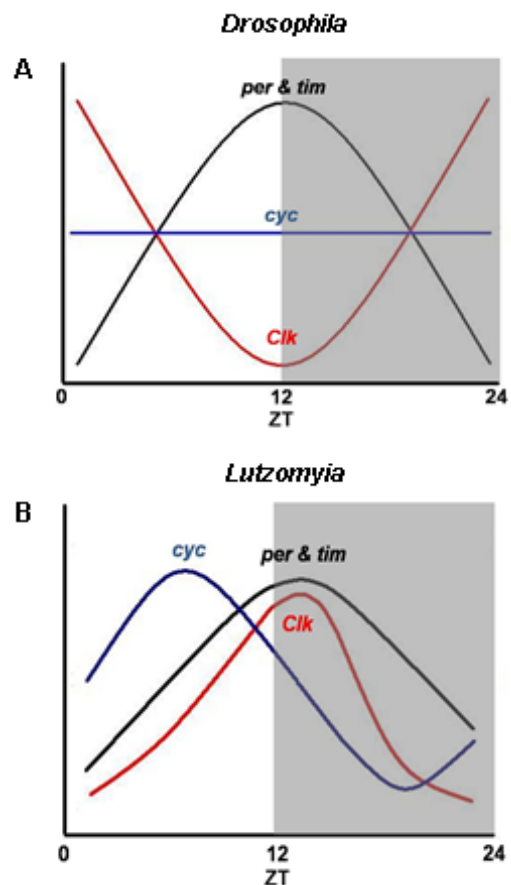


Figura 3. Expressão circadiana de quatro genes de relógio de *Drosophila melanogaster* e *Lutzomyia longipalpis* em um regime claro/escuro 12:12h. A área em cinza representa a fase escura (noite) deste regime. A) *Drosophila melanogaster* (baseado em Hardin et al., 1990; Sehgal et al., 1995; Bae et al., 1998; Rutila et al., 1998). B) *L. longipalpis* (baseado em Meireles-Filho et al., 2006a; Meireles-Filho et al., 2006b). Em cada espécie: cycle (linha azul), period e timeless (linha preta) e Clock (linha vermelha). ZT (Zeitgeber Time: representação do ciclo ambiental medido em horas).

Outro aspecto do relógio circadiano de *Lutzomyia longipalpis* que foi estudado é a influência da alimentação sanguínea. A hematofagia é capaz de reduzir os níveis de atividade locomotora desta espécie (Meireles-Filho et al, 2006a), assim como ocorre em culicídeos (Rowland, 1989; revisado em Clements, 1999). A redução da atividade pode ser um reflexo do efeito da alimentação sanguínea na regulação do relógio circadiano, pois dois genes de relógio, *per* e *tim*, apresentam níveis de expressão reduzidos nestas condições (Meireles-Filho et al, 2006a).

Mosquitos

Os ritmos de atividade de mosquitos (Diptera: Culicidae) já foram extensamente estudados em laboratório (revisado em Clements, 1999). Contudo os estudos moleculares do relógio circadiano ainda são incipientes. Em um dos primeiros estudos, Gentile et al. (2006) isolaram o gene *tim* de *Aedes aegypti*, vetor dos vírus da dengue e febre amarela, e analisaram a sua expressão circadiana.

Em outro trabalho, o mesmo grupo realizou uma análise comparativa da expressão circadiana em *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, vetor da filariose e do vírus do oeste do Nilo, duas espécies com ritmos de atividade locomotora distintos. *Ae. aegypti* apresenta atividade diurna, enquanto *Cx. quinquefasciatus* apresenta atividade essencialmente noturna (Clements, 1999; Gentile et al, 2009). A análise da expressão circadiana de sete genes (*Clk*, *cyc*, *per*, *tim*, *vri*, *Pdp1* e *cry1*) envolvidos no cerne do relógio de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* revelou uma grande conservação nos padrões de expressão desses genes nas duas espécies. No entanto, o gene *cry2* mostrou perfis diferentes nas duas espécies, apresentando apenas um pico de expressão em *Cx. quinquefasciatus* e um padrão bimodal em *Ae. aegypti* (Gentile et al, 2009). CRY2 é um repressor transcricional relacionado a criptocromos de mamíferos, que é encontrado em diversos insetos, mas que está ausente em *Drosophila* (Yuan et al, 2007). Acredita-se que esta diferença seja possivelmente causada por mecanismos distintos de regulação da expressão de *cry2* nas duas espécies (Gentile et al, 2009). Os resultados sugerem também que *cry2* possa ser um dos genes, direta ou indiretamente, associados ao controle das diferenças encontradas nos padrões temporais da atividade nas duas espécies de mosquitos (Gentile et al, 2009).

No mosquito *Anopheles gambiae*, vetor da malária, Das e Dimopoulos (2008) aplicaram pulsos de luz no início da escotofase e obtiveram mudanças no padrão de alimentação sanguínea, além de alterações no transcriptoma desta espécie, entre eles, transcritos que são regulados pela hematofagia. Os autores mostraram também que o silenciamento de alguns genes de relógio, pela técnica de RNAi (RNA de interferência), promove uma mudança da atividade hematofágica deste mosquito (Das e Dimopoulos, 2008). Mais recentemente, essa conexão entre metabolismo, ritmos de alimentação e relógio circadiano, foi reforçada por dois outros trabalhos com microarranjos de *An. gambiae* e *Ae. aegypti* (Ptitsyn et al, 2011; Rund et al, 2011). Nestes, observa-se pela primeira vez em mosqui-

tos, a expressão rítmica de diversos genes importantes na fisiologia, resposta imune e até mesmo resistência a pesticidas (Ptitsyn et al, 2011; Rund et al, 2011).

Outro trabalho recente, em *Ae. aegypti*, mostrou um aumento da atividade locomotora de fêmeas infectadas com o vírus Dengue 2, o que sugere um papel do relógio circadiano na dinâmica de transmissão desta doença (Lima-Camara et al, 2011).

Triatomíneos

Diversas espécies de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), conhecidas popularmente como “barbeiros”, são transmissores do agente causador da doença de Chagas nas Américas. Uma das espécies mais estudadas é o *Rhodnius prolixus*. O processo de muda deste inseto é induzido e controlado por hormônios chamados ecdisteróides, que apresentam um padrão rítmico de acúmulo na hemolinfa com um período de aproximadamente 24 horas, mesmo em condições constantes (regimes de escuro ou claro constante), indicando, portanto, um controle pelo relógio circadiano (Steel e Ampleford, 1984; Vafopoulou e Steel, 1991). As glândulas protorácicas (PG) sintetizam os ecdisteróides (Vafopoulou e Steel, 1989) e estudos *in vitro* mostraram que estas apresentam um ritmo circadiano de síntese destes hormônios em escuro constante e que este ritmo pode ser arrastado por ciclos de claro/escuro (Vafopoulou e Steel, 1998). Nas PG, as proteínas de relógio PER e TIM apresentam um padrão cíclico de acúmulo citoplasmático e entrada no núcleo, mostrando que as glândulas protorácicas possuem um oscilador molecular que é importante para a síntese rítmica de ecdisteróides (Terry e Steel, 2001).

Entretanto este oscilador molecular presente nas glândulas protorácicas seria regulado pelo neuropeptídeo PTTH (hormônio protoracicotrópico) de forma circadiana (Warren et al, 1988). Em *Rhodnius*, o PTTH é produzido ritmicamente e mesmo em condições constantes observa-se que este padrão persiste (Vafopoulou e Steel, 1996a; Vafopoulou e Steel, 1996b). No cérebro destes insetos, grupos de neurônios laterais (LN), juntamente com neurônios dorsais (DN) são responsáveis pela liberação cíclica de PTTH (Vafopoulou e Steel, 1996b). Recentemente foi demonstrado que estes neurônios apresentam um acúmulo rítmico de PER e TIM (Vafopoulou et al, 2010). Os neurônios laterais de *Rhodnius* seriam homólogos ao grupo de neurônios laterais de *Drosophila*, considerados componentes do oscilador central desta espécie modelo e importantes para o controle de sua atividade locomotora (Steel e Vafopoulou, 2002; Helfrich-Förster, 2004; Vafopoulou e Steel, 2005; Vafopoulou et al, 2010). Sendo assim, especula-se que os LN de *Rhodnius* poderiam desempenhar papel semelhante ao das mesmas estruturas em *Drosophila* (Steel e Vafopoulou, 2006). Desta forma, em *Rhodnius* estes neurônios além de modularem a ritmicidade locomotora desta espécie participariam também do controle circadiano do sistema endócrino, funcionando de maneira similar aos núcleos supraquiasmáticos (NSQs) de mamíferos.

Em insetos, além das glândulas protorácicas, diversos outros osciladores periféricos, como glândulas salivares, gônadas e tubos de Malpighi já foram identificados (revisado em Saunders, 2002). Entretanto, em triatomíneos, a caracterização dos seus relógios moleculares ainda encontra-se restrita às glândulas protorácicas. Apesar disso, a evidência de um sistema circadiano multi-oscilatório sugere que os relógios se organizem para assegurar a ordem temporal interna no organismo. Os relógios periféricos poderiam acoplar-se e/ou se tornar sensíveis a sinais de sincronização interna gerada pelo relógio central (Giebultowicz 2001).

Como nestes insetos, diversas células, em vários tecidos, são alvos da ação de ecdisteróides, sua liberação circadiana propicia a sincronização destas células e, por sua vez, a sincronização de mudanças ao longo do desenvolvimento, de acordo com as variáveis do meio ambiente (Steel e Vafopoulou, 2006).

Considerações Finais

O estudo da biologia e genética molecular do relógio circadiano de insetos vetores ainda encontra-se em um estágio inicial, contudo alguns dados importantes já foram obtidos como aqueles descritos acima. Estes estudos são importantes já que diversos trabalhos apontam diferenças no relógio circadiano de diferentes grupos de insetos, indicando que o que é sabido a respeito do modelo *Drosophila* nem sempre pode ser aplicado a outras espécies sem uma análise prévia (revisado em Sandrelli et al, 2008).

O relógio circadiano de insetos vetores é fundamental em diversos aspectos do seu ciclo vital. Sendo assim, o conhecimento das suas bases moleculares poderá permitir futuramente o uso de ferramentas que levem a alterações do seu funcionamento, que possivelmente influenciariam sobremaneira sua capacidade vetorial, servindo assim como uma nova estratégia de controle.

Agradecimentos

Agradeço ao Dr. Alexandre Afranio Peixoto pela orientação durante a elaboração do texto. Também agradeço a Dra. Rafaela Bruno e a Dra. Samira Chahad pela revisão do texto final além de Israel de Souza Pinto pela edição final das figuras.

Referências

Akten B, Jauch E, Genova GK, Kim EY, Edery I, Raabe T, Jackson FR. 2003. A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator. *Nature Neuroscience* 6: 251-257.

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.

Bae K, Lee C, Sidote D, Chuang KY, Edery I. 1998. Circadian regulation of a *Drosophila* homolog of the mammalian Clock gene: PER and TIM function as positive regulators. *Molecular Cell Biology* 18: 6142-51.

Ceriani MF, Darlington TK, Staknis D, Más P, Petti AA, Weitz

CJ, Kay SA. 1999. Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science* 285: 553-6.

Chang DC, McWatters HG, Williams JA, Gotter AL, Levine JD, Reppert SM. 2003. Constructing a feedback loop with circadian clock molecules from the silkworm, *Antheraea pernyi*. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 38149-38158.

Chang DC, Reppert SM. 2003. A novel C-terminal domain of *Drosophila* PERIOD inhibits dCLOCK:CYCLE-mediated transcription. *Current Biology* 13: 758-762.

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

Cyran SA, Buchsbaum AM, Reddy KL, Lin MC, Glossop NR, Hardin PE, Young MW, Storti RV, Blau J. 2003. vrille, Pdp1, and dClock form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 112: 329-41.

Darlington TK, Wager-Smith K, Ceriani MF, Staknis D, Gekakis N, Steeves TD, Weitz CJ, Takahashi JS, Kay SA. 1998. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim. *Science* 280: 1599-603.

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

Feliciangeli MD, Arrivillaga JC, 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 GBS, Meireles-Filho ACA., Lima JBP, Peixoto AA. 2009. Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: cry2 is different. *Journal of Biological Rhythms* 24: 444-51.

Gentile C, Meireles-Filho AC, Britto C, Lima JB, Valle D, Peixoto AA. 2006. Cloning and daily expression of the timeless gene in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 878-84.

Giebultowicz JM. 2001. Peripheral clocks and their role in circadian timing: insights from insects. *Philosophical Transactions of The Royal Society of London Series B Biological Sciences* 356:1791-1799.

Glossop NR, Houl JH, Zheng H, Ng FS, Dudek SM, Hardin PE. 2003. VRILLE feeds back to control circadian transcription of Clock in the *Drosophila* circadian oscillator. *Neuron* 37: 249-61.

Hardin PE. 2011. Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. *Advances in Genetics* 74: 141-73

Hardin PE, Hall JC, Rosbash M. 1990. Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* 343: 536-340.

Helfrich-Förster C. 2004. The circadian clock in the brain: a structural and functional comparison between mammals and insects. *Journal of Comparative Physiology* 190: 601-613.

Houl JH, Yu W, Dudek SM, Hardin PE. 2006. *Drosophila* CLOCK is constitutively expressed in circadian oscillator and non-oscillator cells. *Journal of Biological Rhythms* 21: 93-103.

Kadener S, Stoleru D, McDonald M, Nawathean P, Rosbash M. 2007. Clockwork Orange is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. *Genes and Development* 21: 1675-86.

Keegan KP, Pradhan S, Wang JP, Allada R. 2007. Meta-analysis of *Drosophila* circadian microarray studies identifies a novel set of rhythmically expressed genes. *PLoS Computational Biology* 3: 2087-2110.

Kim EY, Edery I. 2006. Balance between DBT/CKIepsilon kinase and protein phosphatase activities regulate phosphorylation and stability of *Drosophila* CLOCK

- protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 6178-6183.
- Lakin-Thomas PL. 2006. Transcriptional feedback oscillators: maybe, maybe not... Journal of Biological Rhythms 21: 83-92.
- Lim C, Chung BY, Pitman JL, McGill JJ, Pradhan S, Lee J, Keegan KP, Choe J, Allada R. 2007. Clockwork orange encodes a transcriptional repressor important for circadian-clock amplitude in *Drosophila*. Current Biology 17: 1082-9.
- Lima-Camara TN, Bruno RV, Luz PM, Castro MG, Lourenço-de-Oliveira R, Sorgine MH, Peixoto AA. 2011. Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. PLoS One 8: e17690.
- Lin JM, Kilman VL, Keegan K, Paddock B, Emery-Le M, Rosbash M, Allada R. 2002. A role for casein kinase 2alpha in the *Drosophila* circadian clock. Nature 420: 816-20.
- Markova EP, 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. Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology 134: 535-542.
- Martinek S, Inonog S, Manoukian AS, Young MW. 2001. A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the *Drosophila* circadian clock. Cell 105: 769-779.
- Matsumoto A, Ukai-Tadenuma M, Yamada RG, Houl J, Uno KD, Kasukawa T, Dauwalder B, Itoh TQ, Takahashi K, Ueda R, Hardin PE, Tanimura T, Ueda HR. 2007. A functional genomics strategy reveals clockwork orange as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. Genes and Development 21: 1687-700.
- Meireles-Filho AC, Amoretty PR, Souza NA, Kyriacou CP, Peixoto AA. 2006b. Rhythmic expression of the cycle gene in a hematophagous insect vector. BMC Molecular Biology 7: 38.
- Meireles-Filho AC, da S Rivas GB, Gesto JS, Machado RC, Britto C, de Souza NA, Peixoto AA. 2006a. The biological clock of an hematophagous insect: Locomotor activity rhythms, circadian expression and downregulation after a blood meal. FEBS Letter 580: 2-8.
- Morrison AC, Ferro C, Pardo R, Torres M, Wilson ML, Tesh RB. 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.
- Ptitsyn AA, Reyes-Solis G, Saavedra-Rodriguez K, Betz J, Suchman EL, Carlson JO, Black WC 4th. 2011. Rhythms and synchronization patterns in gene expression in the *Aedes aegypti* mosquito. BMC Genomics 17: 12-153.
- Richier B, Michard-Vanhée C, Lamouroux A, Papin C, Rouyer F. 2008. The clockwork orange *Drosophila* protein functions as both an activator and a repressor of clock gene expression. Journal of Biological Rhythms 23: 103-16.
- Rivas GB, Souza NA, Peixoto AA. 2008. Analysis of the activity patterns of two sympatric sandfly siblings of the *Lutzomyia longipalpis* species complex from Brazil. Medical and Veterinary Entomology 22: 288-90.
- Rowland M. 1989. Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles stephensi* associated with insemination, blood-feeding, oviposition and nocturnal light intensity. Physiological Entomology 14: 77-84.
- Rubin EB, Shemesh Y, Cohen M, Elgavish S, Robertson HM, 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 Research 16: 1352-1365.
- Rund SS, Hou TY, Ward SM, Collins FH, Duffield GE. 2011. Genome-wide profiling of diel and circadian gene expression in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 9: E421-30.
- Rutila JE, Suri V, Le M, So WV, Rosbash M, 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.
- Sandrelli F, Costa R, Kyriacou CP, Rosato E. 2008. Comparative analysis of circadian clock genes in insects. Insect and Molecular Biology 17: 447-63.
- Sathyanarayanan S, Zheng X, Xiao R, Sehgal A. 2004. Posttranslational regulation of *Drosophila* PERIOD protein by protein phosphatase 2A. Cell 116: 603-615.
- Saunders DS. 2002. Insect Clocks, 3rd edition. Amsterdam: Elsevier Science.
- Sehgal A, Rothenfluh-Hilfiker A, Hunter-Ensor M, Chen Y, Myers MP, Young MW. 1995. Rhythmic expression of timeless, a basis for promoting circadian cycles in period gene autoregulation. Science 270: 808-10.
- Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, Kay SA, Rosbash M, Hall JC. 1998. The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. Cell 95: 681-92.
- Steel CGH, Ampleford EJ. 1984. Circadian control of hemolymph ecdysteroid titres and the ecdysis rhythm in *Rhodnius prolixus*. In: Porter R, Collins GM, editors. Photoperiodic Regulation of Insect and Molluscan Hormones. Pitman, p150-162.
- Steel CGH, Vafopoulou X. 2002. Physiology of circadian systems. In: Saunders DS, editor. Insect Clocks, Third Edition. Amsterdam: Elsevier Science p115-188.
- Steel CGH, Vafopoulou X. 2006. Circadian orchestration of developmental hormones in the insect, *Rhodnius prolixus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular and Integrative Physiology 144: 351-364.
- 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 to Cells 5: 739-747.
- Terry KL, Steel CGH. 2001. Neuropeptides and steroid hormone rhythms are regulated by distinct cellular oscillators during the development of the insect *Rhodnius prolixus*. In: Goos HJTh, Rastogi RK, Vaudry H, Pierantoni R, editors. Perspective in Comparative Endocrinology: Unity and Diversity. Bologna: Monduzzi Editore p309-314.
- Vafopoulou X, Steel CGH. 1989. Developmental and diurnal changes in ecdysteroid biosynthesis by prothoracic glands of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) in vitro during the last larval instar. General and Comparative Endocrinology 74: 484-493.
- Vafopoulou X, Steel CGH. 1991. Circadian regulation of synthesis of ecdysteroids by prothoracic glands of the insect *Rhodnius prolixus*: evidence of a dual oscillator system. General and Comparative Endocrinology 83: 27-34.
- Vafopoulou X, Steel CGH. 1996a. The insect neuropeptide prothoracicotrophic hormone is released with a daily rhythm: re-evaluation of its role in development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93: 3368-3372.
- Vafopoulou X, Steel CGH. 1996b. Circadian regulation of a daily rhythm of release of prothoracicotrophic hormone from the brain-retrocerebral complex of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) during larval-adult development. General and Comparative Endocrinology 102: 123-129.

- Vafopoulou X, Steel CGH. 1998. A photosensitive circadian oscillator in an insect endocrine gland: photic induction of rhythmic steroidogenesis in vitro. *Journal of Comparative Physiology* 182: 343-349.
- Vafopoulou X, Steel CGH. 2005. Circadian organization of the endocrine system. In: Gilbert LI, Latrou K, Gill SS, editors. *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol. 3. Oxford: Elsevier p551-614.
- Vafopoulou X, Terry KL, Steel CG. 2010. The circadian timing system in the brain of the fifth larval instar of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Journal of Comparative Neurology* 518: 1264-82.
- Warren JT, Sakurai S, Rountree DG, Gilbert LI, Lee SS, Nakanishi K. 1988. Regulation of the ecdysteroid titer of *Manduca sexta*: reappraisal of the role of the prothoracic glands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 958-962.
- Yu W, Zheng H, Houl JH, Dauwalder B, Hardin PE. 2006. PER-dependent rhythms in CLK phosphorylation and E-box binding regulate circadian transcription. *Genes and Development* 20: 723-733.
- Yuan Q, Metterville D, Briscoe AD, Reppert SM. 2007. Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *Molecular and Biology Evolution* 24: 948-55.
- Zheng X, Sehgal A. 2008. Probing the relative importance of molecular oscillations in the circadian clock. *Genetics* 178: 1147-55.