

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

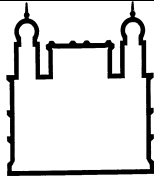
*Leonardo Saboia Vahia Matilde*

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA E DE PEPTIDASES EM  
FORMAS PRÉ-IMAGINAIS E IMAGOS DE *Aedes aegypti* e *Aedes  
albopictus***

Tese de doutorado apresentada à coordenação do Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitaria do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Genética e Bioquímica. A dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, com suporte financeiro da CNPQ.

Orientadores: **José Batista de Jesus.**

Rio de Janeiro  
Setembro de 2013



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Instituto Oswaldo Cruz  
Pós-graduação em Biologia Parasitaria

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA E DE PEPTIDASES EM FORMAS PRÉ-IMAGINAIS E  
IMAGOS DE *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus***

Apresentada por:

**Leonardo Saboia Vahia Matilde**

**Orientador:** José Batista de Jesus

**Local:** Instituto Oswaldo Cruz. Sala 3 – Módulos de expansão do ensino – Pavilhão Arthur Neiva.

**APROVADO EM:** 27 de setembro de 2013

**Banca Avaliadora:**

**Dr. Adailton Alves Brandão** (IOC – FIOCRUZ, RJ)

**Dr. José Bento Pereira Lima** (CPqRR-FIOCRUZ, RJ)

**Dr. André Luis Souza dos Santos** (IMPG-UFRJ, RJ)

**Dra. Leila Mendonça Lima** (IOC-FIOCRUZ, RJ)

**Dr. Gabriel Padrón** (CIGB, Havana, Cuba)

Rio de Janeiro  
Setembro de 2013

## Ficha Catalográfica

M433 Matilde, Leonardo Saboia Vahia

Análise da expressão protéica e de peptidases em formas pré-imaginais e imagos de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* / Leonardo Saboia Vahia Matilde. – Rio de Janeiro, 2013.

xii, 140 f.: il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2013.

Bibliografia: f. 125-139

1. *Aedes aegypti*. 2. *Aedes albopictus*. 3. Peptidases 4. Enzimografia. 5. Serina proteases do tipo tripsina. 5. Análise proteômica. I. Título.

CDD 595.772

**Aos meus pais, por me apoiarem e acreditarem em mim. E aos meus avós, por estarem sempre presentes.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Dr. José Batista de Jesus, por todos esses 9 anos de orientação, paciência, ensinamento e convívio. Tive a oportunidade de não só aprender ciência como também literatura o que para mim foi o melhor dos mundos. Hoje já não o vejo com um orientador, mas sim como um grande amigo e pretendo manter essa amizade por muitos anos. Obrigado Zé.

À Dra. Patricia Cuervo Escobar, por todos esses 9 anos de convívio, por me ajudar a crescer como profissional e como pessoa. Em especial no último ano, me permitindo conhecer uma pessoa maravilhosa, companheira, gentil, carinhosa, tolerante, enfim não há palavras para descrever o quanto ela é especial para mim e sem ela, esta tese ficaria muito difícil de ser realizada. Beijos Patty.

À Dra. Constança Britto por abrir portas do seu laboratório para a realização desta tese e pelo carinho constante.

À Dra. Nildimar Alves Honório por ter aceito colaborar conosco neste trabalho, pela sua atenção e pela gentileza no fornecimento dos insetos usados nesta tese

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas pelos ótimos momentos de convívio. Em especial a Myllena, Bianca, Thais, Ellen, Bernardo, Nathália, Carol, Cris, e todos os outros, um muito obrigado por tudo.

À Dra Cláudia M. D'Ávila Levi, pelas ajudas para a execução do trabalho, por sua amizade.

À Nathália, Geovane, Camila pela amizade e companheirismo no laboratório.

Ao André Borges pela grande amizade, companheirismo, tolerancia e ajuda oferecida em todas as etapas desta tese tanto na bancada quanto fora dela. Cara, muito obrigado! Se não fosse pela sua força teria sido difícil terminar essa tese.

A Débora Petrópolis, Lilian, Kássia, Bruno Azevedo, Gustavo Menezes, Telma, Ana, Renato e Bruno Piva, do laboratório de Biologia da Superfície Celular, do IBCCF, pela amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Transmissores de Hematozoários do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), pela gentileza no fornecimento dos insetos usados nesta tese.

Aos colegas do laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, pela amizade e momentos de descontração. Em especial ao Dr. Renato e Dra. Elisa, pela confiança e por ter aberto e disponibilizado o laboratório cada vez que precisei.

À minha família por todo o auxílio e sacrifício durante o desenvolvimento da minha tese. Obrigado mãe e pai.

## RESUMO

### ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA E DE PEPTIDASES EM FORMAS PRÉ-IMAGINAIS E IMAGOS DE *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*

Leonardo Saboia Vahia Matilde

Orientadores: Jose Batista de Jesus

Os mosquitos *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) e *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) apresentam significativa importância epidemiológica dentro da família Culicidae por serem os principais vetores da febre amarela e dos quatro sorotipos do vírus da dengue. As peptidases ou proteases são enzimas que clivam ligações peptídicas. No sistema digestivo de invertebrados as peptidases, especificamente aquelas da classe das serino-peptidases, são abundantes e participam de vários processos fisiológicos, desempenhando um papel principal na hidrólise de proteínas destinadas à nutrição. Estas enzimas podem apresentar características espécie-específicas e essas diferenças são respostas adaptativas a diferentes estilos de vida, ambientes e habilidade de sobrevivência entre as espécies. Neste trabalho descreve-se a caracterização das atividades proteolíticas detectadas em extratos totais das formas pré-imaginais de *A. aegypti* e *A. albopictus* por enzimografia em uma dimensão. A estabilidade da expressão de peptidases nessas espécies foi avaliada pela comparação do perfil proteolítico de formas larvais obtidas de ovos de insetos recém coletados no ambiente com ovos de insetos mantidos em colônia por longo período. Foram também comparados os perfis proteolíticos das pupas com seus respectivos imagos, bem como a estabilidade térmica das peptidases detectadas. Observaram-se complexos perfis de serino-peptidases do tipo tripsina em ambas as espécies vetoras. Contudo esses perfis apresentam diferenças espécie-específicas e também diferenças entre os distintos estágios evolutivos dentro de uma mesma espécie. Também, neste trabalho, descreve-se a caracterização das atividades proteolíticas detectadas no intestino médio de fêmeas de *A. albopictus* alimentadas com açúcar bem como o primeiro mapa proteômico e a identificação de peptidases por eletroforese bi-dimensional e espectrometria de massas neste órgão. São discutidas aqui as estratégias usadas para analisar as peptidases expressas nesse tecido. As proteínas expressas no intestino médio de *A. albopictus* foram identificadas por similaridade com as sequências de genoma de *A. aegypti* e distintas ferramentas bioinformáticas foram usadas para obter informação funcional de muitas dessas sequências que estão pobremente anotadas. Foram identificadas 59 proteínas entre

as quais três serino-peptidases, e dessas, duas do tipo tripsina e uma quimiotripsina. Os resultados obtidos nos permitiram atribuir de maneira confiável um local de expressão para os genes de tripsina, tripsina alfa e quimiotripsina. Em outras palavras, podemos afirmar que os genes acima mencionados se expressam no intestino médio de fêmeas adultas de *A. albopictus* alimentadas com açúcar. Este achado representa um pequeno, mas importante passo, para a atribuição funcional, ao nível de proteína, de genes codificantes para serino-peptidases do tipo tripsina e quimiotripsina no gênero *Aedes*.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, peptidases, enzimografia, serina proteases do tipo tripsina, análise proteômica

Rio de Janeiro,  
Setembro 2013





---

**ABSTRACT****ANALYSIS OF PROTEIN EXPRESSION AND PEPTIDASES IN PRE-IMAGINAL FORMS AND ADULTS OF *Aedes aegypti* AND *Aedes albopictus***

Leonardo Saboia Vahia Matilde

Orientadores: Jose Batista de Jesus

The mosquitoes *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) and *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) have significant epidemiological importance within the family Culicidae because they are the main vectors of the yellow fever virus and the four serotypes of Dengue virus. Peptidases or proteases are enzymes that hydrolyze peptide bonds. In the digestive system of invertebrates, the peptidases, specifically those from the class of serine peptidases, are abundant and participate in various physiological processes, playing a major role in the hydrolysis of proteins destined to nutrition. These enzymes may have species-specific characteristics, and such differences reflect adaptive responses to different lifestyles and environments. In this work we describe the characterization, using zymography, of the proteolytic activities detected in total extracts of larval forms of *A. aegypti* and *A. albopictus*. The stability of expression of peptidases in these species was evaluated by comparing the proteolytic profile of larval forms obtained from eggs of newly collected insects to that from eggs of insect kept in colony for a long period. We also compared the proteolytic profiles of pupae as well as the thermal stability of the peptidases detected. Complex profiles of trypsin-like serine peptidases were observed in both species. However, these profiles differ between species and also differences between the different evolutionary stages were detected within the same species. Also, in this work, we describe the characterization of the proteolytic activities detected in the midgut of *A. albopictus* females fed on sugar as well as the first proteome map and proteomic identification of peptidases in this organ, using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. The strategies used to analyze the proteases expressed in this tissue are discussed here. The proteins expressed in the midgut of *A. albopictus* were identified by similarity with the genome sequences of *A. aegypti* and various bioinformatic tools were used to obtain functional information for many of these sequences that are poorly annotated. We identified 59 proteins including three serine peptidases, and among these, two types of trypsin-like and one chymotrypsin. The results obtained here allowed us to reliably assign

a localization for the expression of trypsin, trypsin-alpha and chymotrypsin genes. In other words, we can say that the above mentioned genes are expressed in the midgut of adult females of *A. albopictus* fed with sugar. This finding represents a small but important step for the functional assignment, at the protein level, of the genes coding for trypsin-like and chymotrypsin serine peptidases of the *Aedes* genus.

Keywords: *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, peptidases, zymography, trypsin-like serine peptidases, proteomics

Rio de Janeiro

Setembro 2013

# SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	XII
LISTA DE FIGURAS .....	XIV
<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 - TAXONOMIA, BIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA .....	1
1.1.1 - <i>Aedes aegypti</i> .....	1
1.1.2 - <i>Aedes albopictus</i> .....	10
1.2 - <i>A. AEGYPTI</i> E <i>A. ALBOPICTUS</i> COMO VETORES DE DOENÇAS .....	14
1.2.1 - <i>Dengue</i> .....	14
1.2.2 - <i>Febre Amarela</i> .....	18
1.3 – INTestino DOS CULICIDAE .....	20
1.4 - PEPTIDASES .....	25
1.5 – ANÁLISE PROTEÔMICA EM <i>AEDES</i> SPP. ....	27
<b>2 - JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>30</b>
<b>3 - OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>4 – METAS.....</b>	<b>31</b>
<b>5 - RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
5.1 - ARTIGO 1.....	33
5.2 - ARTIGO 2.....	46
5.3 - ARTIGO 3.....	57
5.4 - ARTIGO 4.....	74
<b>6 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>106</b>
<b>6 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>122</b>
<b>7 - BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>125</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>140</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**2DE** – “two-dimensional electrophoresis” (Eletroforese bi-dimensional)

**ARG** – Arginina

**ASP** – Ácido aspártico

**CDC** – “Centers for Disease Control and Prevention”

**DENV**- Vírus da dengue

**DENV-1** – sorotipo 1 do vírus da dengue

**DENV-2** - sorotipo 2 do vírus da dengue

**DENV-3** - sorotipo 3 do vírus da dengue

**DENV-4** - sorotipo 4 do vírus da dengue

**E-64** – “Trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamido-(4-guanidino) Butane”

**HIS** – Histidina

**IEF** - focalização isoeletrica

**JH** – Hormônio Juvenil

**L1** – Larva de primeiro estágio

**L2** – Larva de segundo estágio

**L3** – Larva de terceiro estágio

**L4** – Larva de quarto estágio

**Lys** – Lisina

**MP** - Matriz peritrófica

**Mr** – Massa molecular

**mRNA** – RNA mensageiro

**MS** – “mass spectrometry” (espectrometria de massas)

**MS/MS** – espectrometria de massas em tandem

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**pI** – Ponto isoeletrico

**PMSF** – “Phenyl-methyl sulfonyl-fluoride”

**PBS** – “Phosphate buffered saline” (Tampão solução salina)

**SER** – Serina

**SDS** – “Sodium Dodecyl Sulfate”

**SDS-PAGE** – “Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis”

**TLCK** - “Chloromethyl Ketone Hydrochloride”

**TPCK** – “N-p-Tosyl-L-phenylalanine Chloromethyl Ketone”

**TMOF** - Fator oostático modulador de tripsinas

**WHO** – “World Health Organization”

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Distribuição de *Aedes aegypti* nas Américas em 1970, ano em que o programa de erradicação do mosquito foi finalizado, e em 2002.
- Figura 2** Mapa dos municípios que registraram a presença de *A. aegypti* no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2002, segundo dados do Sistema de Informação em febre Amarela e Dengue/ FUNASA.
- Figura 3** Ciclo evolutivo de *A. aegypti*.
- Figura 4** Esquema do ciclo de vida do mosquito *A. aegypti* demonstrando as mudas larvais e pupal e a influência do hormônio juvenil sobre as mesmas.
- Figura 5** Mapa dos municípios que registraram a presença de *A. albopictus* no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2002.
- Figura 6** Estados e Municípios infestados com *A. albopictus*.
- Figura 7** Sorotipos do vírus Dengue circulantes no Brasil, 2006.
- Figura 8** Risco de transmissão do vírus Dengue no Brasil, 2011
- Figura 9** Esquema dos três ciclos de transmissão da febre amarela.
- Figura 10** Distribuição de casos de febre amarela silvestre e mortes de primatas.
- Figura 11** Esquema ilustrativo geral do intestino de Culicídeos.
- Figura 12** Esquema ilustrativo do intestino médio de Culicídeos.



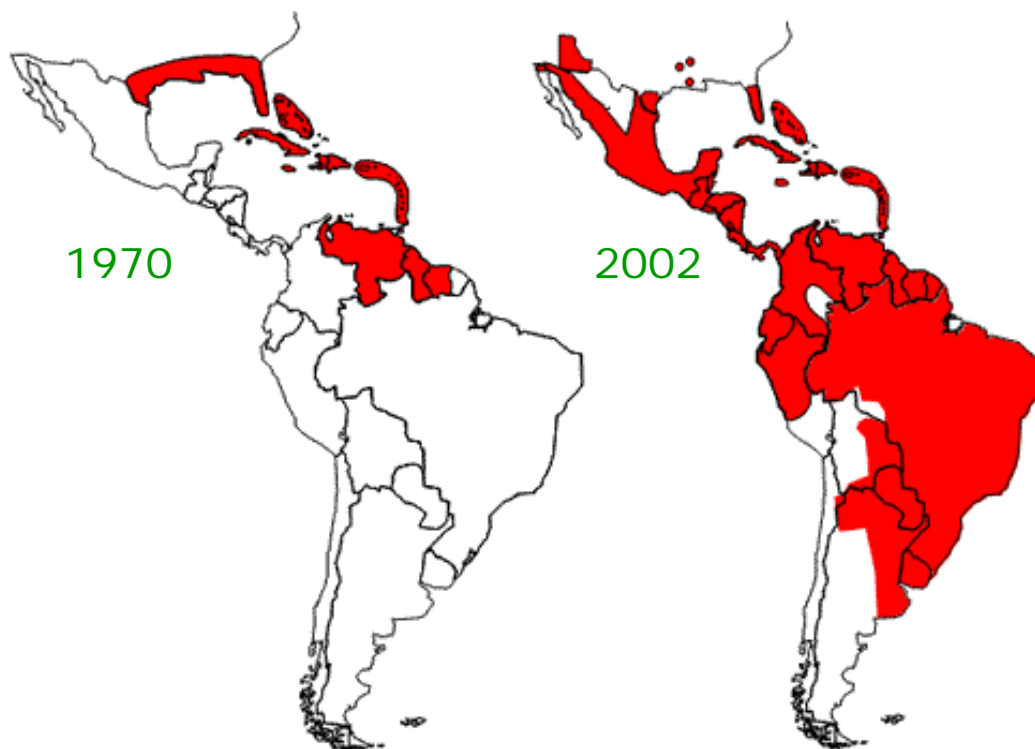
# 1 – INTRODUÇÃO

## **1.1 - Taxonomia, biologia e epidemiologia**

Os mosquitos *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) e *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) pertencem ao filo Arthropoda, classe Hexápode, ordem Díptera, família Culicidae, gênero *Aedes* e sub-gênero *Stegomyia* (Theobald, 1901), o qual agrupa insetos adultos com características particulares, como a presença de faixas branco-prateadas no tórax enegrecido e pernas de aspecto listrado.

### **1.1.1 - *Aedes aegypti***

É considerada a primeira espécie em importância epidemiológica dentro da família Culicidae, por ser o principal vetor da febre amarela urbana e dos quatro sorotipos do vírus da dengue (WHO, 1997). Embora oriundo do Velho Mundo, provavelmente das florestas da região etiópica, na África, o *A. aegypti* acompanhou o homem em navios negreiros e embarcações comerciais dispersando-se pelo mundo entre os séculos XVIII e XIX (Smith, 1956; Gubler, 2002). Foi introduzido no Brasil durante o período colonial e, devido à sua importância como vetor da febre amarela, foi intensamente combatido e considerado erradicado em 1955. No entanto, países vizinhos como as Guianas e a Venezuela e outros países americanos como os Estados Unidos e Cuba não erradicaram o mosquito. Este descuido, que culminou com o fim do programa de erradicação em 1970, impediu a eliminação do *A. aegypti* nestes países e acarretou na re-invasão do Brasil (Figura 1) (CDC, 2009; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). Hoje esse inseto ocupa quase a totalidade do país (Figura 2).



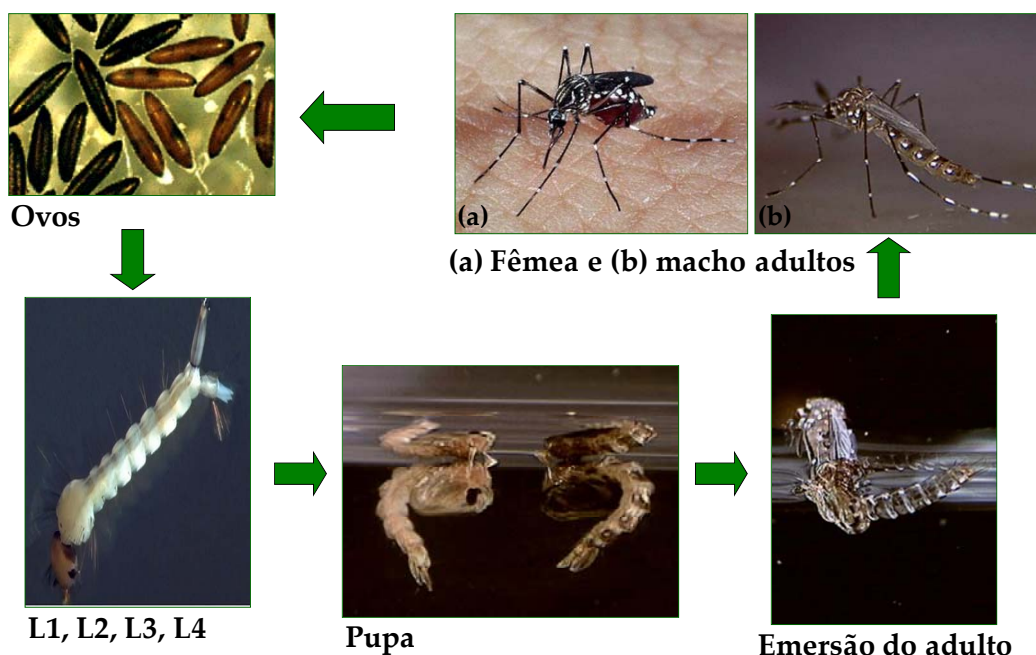
**Figura 1:** Distribuição de *Aedes aegypti* nas Américas em 1970, ano em que o programa de erradicação do mosquito foi finalizado, e em 2002. Em vermelho: áreas onde o mosquito estava presente em 1970 e em 2002. Adaptado de: (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/map-ae-aegypti-distribution.htm>)



**Figura 2.** Mapa dos municípios que registraram a presença de *A. aegypti* no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2008, segundo dados do Sistema de Informação em febre Amarela e Dengue/ FUNASA.

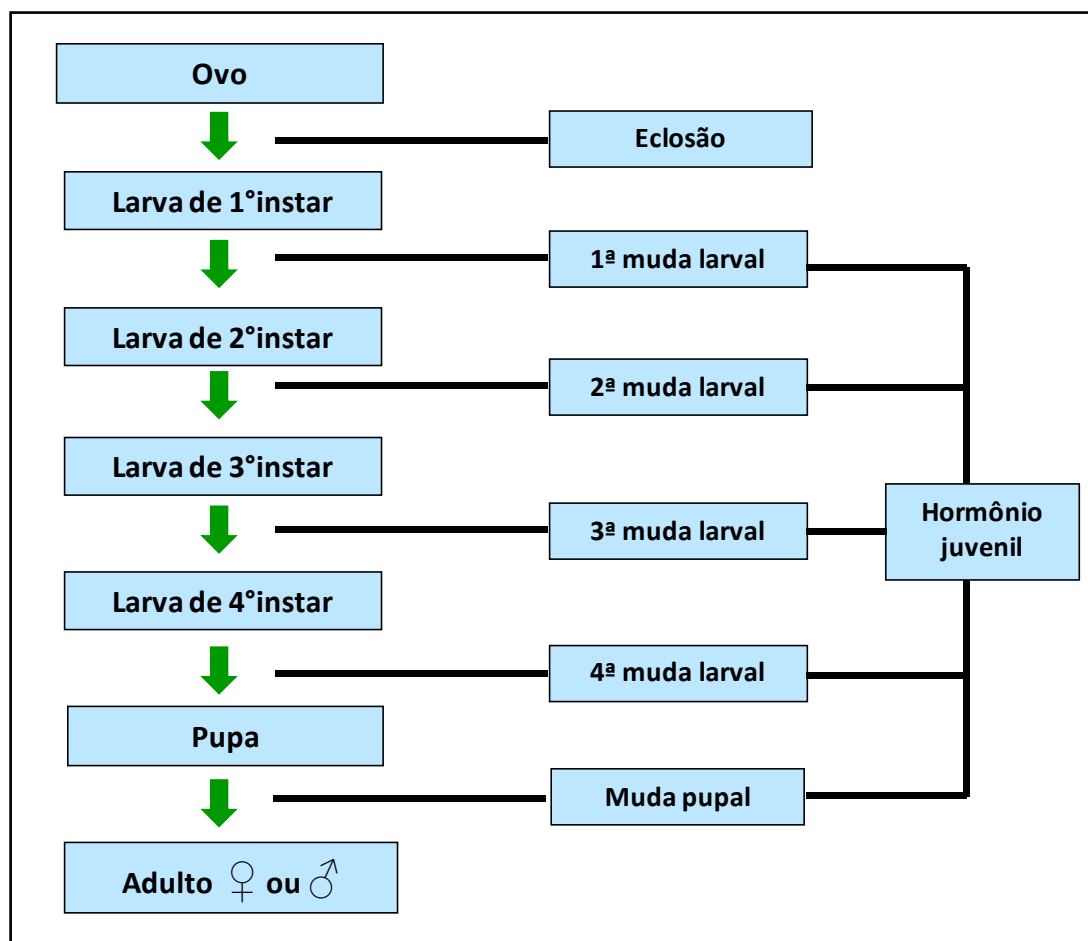
Atualmente, *A. aegypti* é considerado um mosquito cosmopolita, ocorrendo nas regiões tropicais e subtropicais, compreendidas principalmente entre as latitudes 35 °N e 35 °S dentro das zonas isotermais de 10 °C. Embora o *A. aegypti* possa ser encontrado na latitude de 45 °N, estas invasões ocorrem apenas durante os períodos mais quentes do ano, sendo que os mosquitos invasores não sobrevivem ao inverno. A distribuição do *A. aegypti* também é limitada pela altitude. Geralmente, o mosquito não vive acima dos 1.000m, embora tenha sido encontrado a 2.121m na Índia e a 2.200m na Colômbia, locais onde a média da temperatura anual é de aproximadamente 17 °C (WHO, 1997). A descontinuidade observada na distribuição geográfica da espécie pode ser atribuída à sua disseminação passiva pelo ser humano, sendo encontrada nos locais para onde o homem a levou e onde havia condições favoráveis ao seu desenvolvimento (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

O mosquito *A. aegypti* é holometábolo, apresentando metamorfose completa em seu ciclo evolutivo. Deste modo, o inseto passa por uma fase de ovo, por quatro estágios larvais e por uma fase pupal até atingir a forma adulta (Figuras 3 e 4). Enquanto as fases larvais e a pupa vivem em ambiente aquático, o adulto é terrestre. Este fator beneficia a espécie impedindo que haja competição entre as formas imaturas e adultas, uma vez que elas possuem nichos e fontes de nutrição diferentes.



**Figura 3.** Ciclo evolutivo de *A. aegypti*. Fotos gentilmente cedidas por Genilton Vieira, Laboratório de Imagens, IOC-FIOCRUZ.

As fêmeas de *A. aegypti* podem dispersar-se através do vôo para encontrar parceiros, alimento ou locais de oviposição. Na busca pelo hospedeiro a dispersão é um fator de importância epidemiológica, pois neste processo a fêmea adquire e dissemina patógenos. A dispersão para a oviposição também é relevante para a propagação de doenças, uma vez que as fêmeas de *A. aegypti* depositam seus ovos em vários criadouros dentro de um mesmo ciclo gonotrófico (Reiter *et al.*, 1995; Honório *et al.*, 2003). Em áreas urbanas a atividade de oviposição em um único ciclo gonotrófico pode durar vários dias e cobrir uma área de pelo menos 840 metros de diâmetro (Reiter *et al.*, 1995).



**Figura 4.** Esquema do ciclo de vida do mosquito *A. aegypti* demonstrando as mudas larvais e pupal e a influência do hormônio juvenil sobre as mesmas. (Adaptado de Forratini, 1965).

Em relação ao acasalamento, o mosquito *A. aegypti* é considerado estenógamo devido à sua capacidade de acasalar em pequenos espaços pousados sobre uma superfície ou durante o voo. Outras espécies são eurígamas, ou seja, necessitam formar enxames para acasalar, o que depende do estado fisiológico dos mosquitos, da intensidade luminosa, da presença de correntes de ar e de pontos referenciais como postes e arbustos (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Após a cópula, os espermatozoides são armazenados nas espermatecas e utilizados pouco a pouco para fecundar os ovócitos. Neste período as fêmeas intensificam a voracidade pela hematofagia, ingerindo sangue para completar a maturação dos ovócitos nos ovários. Normalmente, três dias após a ingestão de sangue as fêmeas já estão grávidas, passando então a procurar locais para as desovas. (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

A ovogênese em mosquitos é um processo limitado de acordo com a alimentação, prosseguindo apenas quando os nutrientes estão suficientemente disponíveis (Barillas-Mury *et al.*, 1991; Noriega *et al.*, 2001). As diferentes espécies de mosquitos apresentam variações na necessidade de ingestão de sangue para a iniciação e a manutenção do desenvolvimento dos ovócitos. As fêmeas de mosquitos capazes de completar a primeira ovogênese sem ingerir sangue são denominadas autógenas. A autogenia pode ser obrigatória ou facultativa dependendo da espécie e das condições em que ela se encontra. Mosquitos que precisam ingerir sangue para completar tanto a primeira quanto as desovas subsequentes são considerados anautógenos (Attardo *et al.*, 2005; Telang *et al.*, 2005).

O mosquito *Ochlerotatus atropalpus* (Coquillet, 1902) é autógeno obrigatório, não necessitando de sangue para completar sua primeira ovogênese, utilizando reservas acumuladas nos estágios larvais e alimentando-se apenas após a postura de seu primeiro lote de ovos. Outros mosquitos, como o *Ochlerotatus taeniorhynchus* (Wiedemann, 1821), são autógenos facultativos, ou seja, alimentam-se de sangue quando têm oportunidade, mas podem completar a primeira ovogênese mesmo se não houver disponibilidade de sangue (Attardo *et al.*, 2005).

Geralmente, as fêmeas de *A. aegypti* são anautógenas obrigatórias, necessitando de sangue para completar a maturação de seus ovócitos. (Noriega *et al.*, 2001; Attardo *et al.*, 2005; Telang *et al.*, 2005). Contudo, uma corrente autógena foi identificada na África em um ambiente silvestre, onde os seres humanos não estão presentes em grande quantidade. Neste caso, a autogenia possivelmente atua como um mecanismo de preservação de espécies hematófagas quando o hospedeiro está indisponível. A capacidade vetorial de populações autógenas de *A. aegypti* para a transmissão de patógenos é substancialmente menor do que a de populações anautógenas, devido à ausência de repasto sanguíneo para a primeira ovogênese e à menor sobrevivência das fêmeas (Trpis, 1977).

Apenas as fêmeas do mosquito *A. aegypti* são hematófagas, alimentando-se preferencialmente durante o dia, com picos de atividade situados no amanhecer e pouco antes do crepúsculo. O hábito diurno também é observado nos machos fitófagos que seguem as fêmeas em seus abrigos para efetuarem a cópula (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

O hormônio juvenil, que controla a metamorfose em insetos imaturos e a reprodução em adultos, é sintetizado e liberado pela *corpora alata* assim que a fêmea emerge, induzindo ao crescimento pré-vitelogênico dos ovócitos (Gwadz *et al.*, 1973). As condições nutricionais que as fêmeas de *A. aegypti* experimentam durante os estágios larvais definem o tamanho de seus corpos quando adultas e constituem reservas que serão utilizadas no período pré-vitelogênico (Briegel, 1990). Assim que a fase pré-vitelogênica termina, a ovogênese é interrompida até que a fêmea obtenha sangue. A presença de sangue no intestino do inseto inicia uma cascata endócrina que resulta na maturação dos ovócitos, na fecundação e na oviposição (Telang *et al.*, 2005).

Por ser uma espécie endofílica, permanecendo no interior ou nas imediações de habitações mesmo enquanto digere o sangue, o *A. aegypti* alimenta-se, na maior parte das vezes, de sangue humano. No entanto, pode atacar outros animais caso eles estejam próximos aos seus criadouros e abrigos. As fêmeas da espécie voam baixo, até um metro de altura do chão, atacando o homem principalmente nos pés, na parte inferior das pernas e orientando-se em parte pela liberação de ácido láctico, CO<sub>2</sub> e vapores de água presentes no suor. A temperatura corporal também é um importante fator de atração que, somado aos demais citados, auxiliam o vetor hematófago na localização de sua vítima (Lourenço-de-Oliveira, 2006). Quando submetidas à escuridão total sob condições experimentais, as fêmeas de *A. aegypti* interrompem completamente as atividades de busca pela fonte sanguínea, sugerindo que a informação visual também desempenha um importante papel no comportamento do mosquito, regulando os horários de repouso e alimentação (Kawada *et al.*, 2005).

Após a maturação dos ovócitos e a cópula, a fêmea de *A. aegypti* realiza a postura preferencialmente em recipientes artificiais, tanto os abandonados pelo homem a céu aberto e preenchidos com a água das chuvas, como aqueles que armazenam água para uso doméstico. No primeiro caso, esses criadouros são representados principalmente por pneus, latas, vidros, cacos de garrafas, pratos de vasos, calhas entupidas e vasos de cemitério. No segundo caso é comum encontrar ovos do mosquito em caixas d'água, tonéis, latões, cisternas, bebedouros de animais, lagos artificiais, piscinas e aquários (Forratini, 1965; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Souza-Santos, 1999; Honório & Lourenço-de-

Oliveira, 2001). Dentre os criadouros artificiais os pneus merecem atenção especial da vigilância epidemiológica por apresentarem criação relevante de *A. aegypti*. Esses depósitos conseguem armazenar grande quantidade de água, proporcionam baixa evaporação e são importantes artigos de comércio nacional e internacional (Souza-Santos, 1999).

Tanto no Brasil quanto em outros países americanos o *A. aegypti* tem sido observado em recipientes naturais como bromélias, buracos em árvores e escavações em rocha, bambu e solo. No entanto, tais encontros são muito raros em comparação com os criadouros artificiais. Em todos os criadouros citados há proliferação de *A. aegypti* quando a água, acumulada em locais sombreados e dentro de recipientes escuros, contém moderada concentração de sais e matéria orgânica em decomposição. (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Souza-Santos, 1999).

Os ovos, que são escuros e medem aproximadamente 1 mm de comprimento, são depositados pelas fêmeas do *A. aegypti* nas paredes internas dos criadouros, próximos à superfície d'água. Em condições favoráveis de umidade e temperatura o desenvolvimento do embrião é concluído em 48 horas. O contato com a água parece ser o principal estímulo para a saída da larva, contudo, outros fatores como certa agitação do meio e presença de matéria orgânica também atuam como influências estimulantes (Forratini, 1962).

Se após o amadurecimento, que resulta na formação da primeira larva, as condições do ambiente forem desfavoráveis devido à dessecação e baixas temperaturas, essa forma imatura pode entrar em diapausa dentro do ovo, ou seja, permanecer em estado de quiescência que pode durar de seis meses a mais de um ano (Forratini, 1962). No espaço de três meses quase todos os ovos sobrevivem sem contato com a água e a partir deste ponto a taxa de eclosão cai, sobretudo em climas secos (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Do ovo à forma adulta, o ciclo de vida do *A. aegypti* varia de acordo com alguns fatores tais como: condições climáticas, disponibilidade de alimentos e quantidade de larvas existentes no mesmo criadouro, uma vez que a competição entre as larvas por alimento consiste em um obstáculo ao amadurecimento do inseto para a fase adulta. Nas



condições típicas do Rio de Janeiro, esse processo geralmente leva um período de oito a doze dias. A duração dos diferentes estágios larvais não é a mesma: o segundo e o terceiro são mais breves do que o primeiro, e o quarto é o período mais longo, pois é nesta última fase que ocorrem as transformações tissulares destinadas à formação do novo adulto (Forratini, 1962).

Embora aquáticas, as larvas de *A. aegypti* respiram o oxigênio do ar, necessitando para isso chegar até a superfície da água (Forratini, 1962; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). No entanto, quando estão completamente submersas, estas larvas realizam respiração cutânea, podendo sobreviver até 53 dias sem ir à superfície (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). As larvas de insetos detritívoros, como o *A. aegypti*, ingerem grande volume de detritos continuamente, fazendo pausas apenas durante as ecdises. Além disso, apresentam grande quantidade de endopeptidases intestinais (Martin *et al.*, 1980, 1981; Sharma *et al.*, 1984). Provavelmente isso se deve à necessidade de uma digestão eficiente das proteínas presentes em baixas concentrações no grande volume de detritos ingeridos e processados pelas larvas (Mahmood & Borovsky, 1993).

O estudo de elementos importantes para a nutrição das larvas de *A. aegypti* demonstrou que em meio livre de proteínas as larvas do mosquito não conseguem alcançar o segundo estágio de desenvolvimento. Taxas consideráveis de sobrevivência e crescimento foram observadas quando o meio foi acrescido de misturas de aminoácidos. No entanto, quando este meio foi privado de alguns aminoácidos, foi possível estabelecer que glicina, leucina, isoleucina, histidina, arginina, lisina, triptofano, treonina, fenilalanina e metionina são indispensáveis para o desenvolvimento das larvas do mosquito. Na ausência de qualquer um desses aminoácidos não foi possível observar crescimento larval (Golberg & De Meillon, 1948). Em meio livre de lipídios, por sua vez, o crescimento das larvas não se afastou da normalidade. Contudo, houve pouca produção de pupas e adultos, o que sugere a utilização de nutrientes desta natureza durante a metamorfose (Golberg & De Meillon, 1948). A ausência de carboidratos retarda o desenvolvimento larval. Dentre as vitaminas, parecem essenciais a biotina, colina, ácido nicotínico, ácido pantotênico, riboflavina, piridoxina e tiamina. O ácido fólico parece importante no processo de pupação (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

O estágio pupal corresponde a um período de transição no qual ocorrem profundas transformações que acarretam na formação do inseto adulto e na mudança do habitat aquático pelo terrestre. Nos mosquitos em geral, a duração deste período é de cerca de dois dias, sob condições normais. As pupas não se alimentam, utilizando os nutrientes acumulados nos estágios larvais como fonte de energia durante a metamorfose. Em insetos holometábolos muitos tecidos larvais sofrem desintegração durante o estágio pupal, ao mesmo tempo novas estruturas, inerentes ao inseto adulto, desenvolvem-se (Nakajima *et al.*, 1997). As pupas tendem a permanecerem imóveis, captando oxigênio do ar através do contato entre as trompas respiratórias e a superfície líquida. No entanto, quando ocorrem distúrbios superficiais ou mudanças na iluminação da água, elas conseguem se deslocar para locais mais agradáveis através de uma movimentação limitada ao abdômen (Forratini, 1962).

### 1.1.2 - *Aedes albopictus*

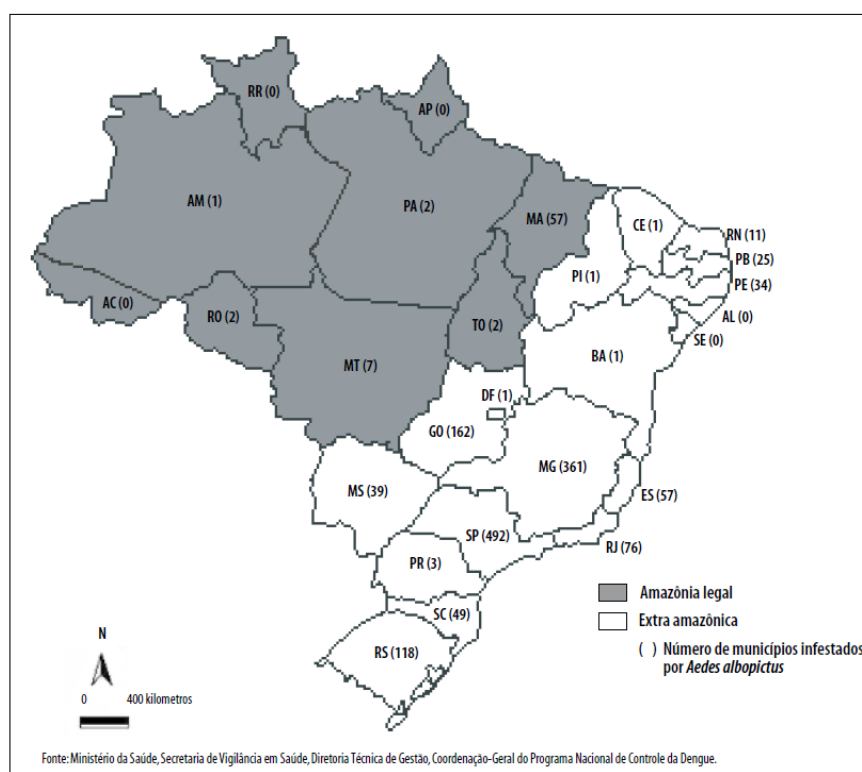
O *A. albopictus* é oriundo da Ásia, de onde provem a sua denominação "Tigre Asiático". Devido ao transporte passivo dos ovos e de larvas em recipientes artificiais, o inseto dispersou-se para outras regiões como o Continente Americano, África, Europa Meridional e algumas ilhas do Oceano Pacífico, como o Arquipélago do Havaí. Atualmente, a espécie está amplamente distribuída no Continente Americano, sendo observada, desde Chicago ao norte dos EUA, 41°55'N (Rigthor *et al.*, 1987) até San Antonio, norte da Argentina, 23°03'S (Rossi 1999). Apesar do inseto poder se dispersar a partir de todas as suas formas evolutivas, a fase adulta é menos importante neste processo, visto que a grande maioria dos adultos permanece em área de aproximadamente 100 m, não obstante a capacidade de voo de machos e fêmeas ser estimada em 225 e 525 m respectivamente (Estrada-Franco & Craig 1995). A distribuição atual do *A. albopictus* deve-se também ao fato desta espécie ser boa colonizadora, capaz de se adaptar a novos habitats com facilidade, principalmente ambientes perturbados tais como ferro velho, depósitos de pneus e recipientes descartados. A partir desses habitats, *A. albopictus* pode vir a ocupar áreas arborizadas próximas, e com o tempo, transformar-se em parte permanente da fauna local (Rai, 1986). A existência de ambientes modificados pelo homem não é essencial para a sobrevivência de *A. albopictus* já que ele é capaz de colonizar criadouros naturais, alimentando-se de néctar e sugando o sangue de animais

silvestres (Moore 1999). Entre os criadouros naturais usados por *A. albopictus* encontram-se oscos de árvores, tocos de bambus, buracos em pedras e tanques de bromélias (Schreiber & Cuda 1994, Estrada-Franco & Craig 1995, Natal *et al.*, 1997, Forattini *et al.*, 1998). Na zona urbana, os sítios de oviposição preferenciais são pneus, latas, vidros, cacos de garrafas, cerâmicas, pratos sob vasos de xaxim, recipientes plásticos, vasos de cemitério, caixas d'água, tonéis, latões (Gilotra *et al.*, 1967, O'meara *et al.*, 1993, Estrada-Franco & Craig 1995). O criadouro ideal é escuro, sombreado e deve conter água limpa, com baixa concentração de sais e matéria orgânica em decomposição (Becnel *et al.*, 1996). Quando comparado ao *A. aegypti*, o *A. albopictus* tolera maior nível de poluição da água, sendo capaz de ovipôlar em qualquer local onde haja acúmulo de água (Knudsen 1995).

O primeiro registro de populações de *A. albopictus* estabelecidas no Continente Americano data de 1985 (Sprenger & Wuithiranyagool 1986). No entanto, a sua presença já havia sido assinalada desde 1946 (Hughes & Porter 1956). Quanto ao Brasil, a primeira notificação foi feita por Forattini (1986), em material coletado no Estado do Rio de Janeiro. Supõe-se que o mosquito entrou no país pelo porto de Vitória, Espírito Santo, por meio de carga de pneus usados procedente dos EUA (Estrada-Franco & Craig 1995). Não obstante, outros autores sugerem que a introdução ocorreu pelo mesmo porto, porém vindo do Japão, e dispersou-se, por via férrea, pelo Vale do Rio Doce (Consoli & Lourenço-De-Oliveira, 1994). Assim, a população de *A. albopictus* que infestou o Brasil seria diferente da população que infestou os EUA. Até 2002, a presença do *A. albopictus* tinha sido registrada em 19 estados brasileiros (Santos, 2003) (Figura 5). Posteriormente, em 2006, verificou-se uma grande disseminação do inseto contabilizando-se 21 estados com 1.502 municípios infestados (Gomes *et al.*, 2008) (Figura 6).



**Figura 5.** Mapa dos municípios que registraram a presença de *A. albopictus* no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2002, segundo dados do Sistema de Informação em febre Amarela e Dengue/ FUNASA.



**Figura 6.** Estados e municípios infestados com *A. albopictus*. Brasil, 2006.

Quanto ao ciclo de vida, *A. albopictus*, assim como *A. aegypti*, apresenta desenvolvimento holometábolo, passando por fase de ovo, quatro estágios larvais e uma fase de pupa até atingir a forma de imago (Figura 3 e 4). Nessa espécie as fases larvais também se desenvolvem em ambientes aquáticos e os adultos em ambientes terrestres. No entanto, diferenças biológicas e comportamentais podem ser observadas nos distintos estágios de desenvolvimento dessas duas espécies. Por exemplo, com relação aos ovos, *A. aegypti* deposita os ovos em grupos 10-30/criadouro, ao passo que *A. albopictus* deposita os ovos isolados.

As larvas de *A. albopictus* desenvolvem-se melhor em depósitos de água com baixa turbidez, rica em aminoácidos e amônia (alto teor de nitrogênio), pH entre 6,8 e 7,6, sendo intolerante a valores extremos de pH (abaixo de 2,0 e acima de 12,0). Em geral, as larvas de *A. albopictus* resistem melhor à poluição da água do criadouro do que as de *A. aegypti* (Estrada-Franco & Craig 1995).

Com relação aos adultos, *A. aegypti* é de cor marrom e apresenta faixas brancas no tórax (em forma de lira) e pernas. Já o *A. albopictus* é um mosquito de cor negra, com uma faixa estreita, longitudinal, mediana, branco-prateada e o abdome tem faixas basais brancas e pernas marcadas de branco e preto. As fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* têm hábitos hematófagos diurnos. Os picos de maior atividade desses insetos são geralmente ao amanhecer e pouco antes do fim da tarde. Os machos acompanham as fêmeas, portanto, também são diurnos (Lourenço-De-Oliveira *et al.*, 1994). As duas espécies são antropofílicas, mas podem fazer repasto sanguíneo em outros animais, como cães, bovinos e roedores. Os mosquitos da espécie *A. aegypti* são mais adaptados ao convívio com o ser humano. Segundo Passos (2003), existe uma predominância de *A. aegypti* em relação ao *A. albopictus* nas áreas urbanas, sendo que o crescimento da população do primeiro afeta a população do segundo.

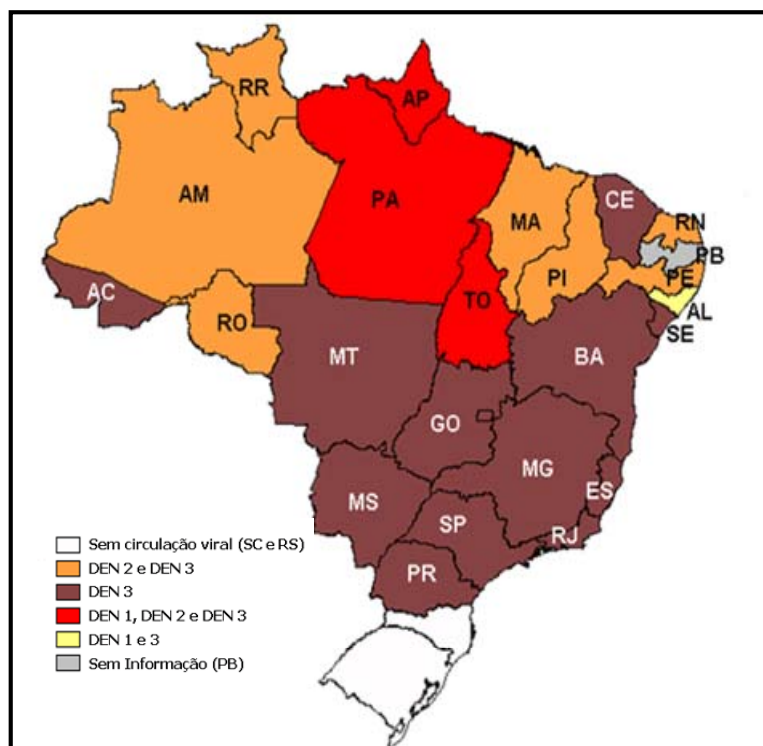
Finalmente, com relação à participação de *A. albopictus* como vetor de doenças, cabe destacar que esta espécie é considerada a segunda em importância na transmissão do vírus da dengue e febre amarela para o homem, além de participar como vetor de filariose. O papel de *A. aegypti* e *A. albopictus* como vetores será analisada na seção a seguir.

## **1.2 - *A. aegypti* e *A. albopictus* como vetores de doenças**

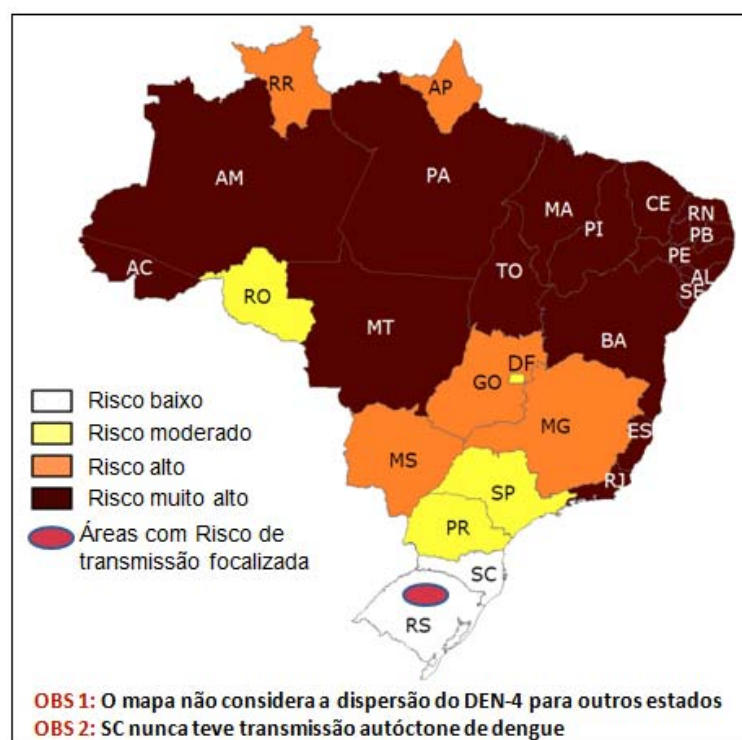
*A. aegypti* e *A. albopictus* são mosquitos vetores de arboviroses. Mais de 200 arbovírus, dentre os 500 conhecidos, são transmitidos por mosquitos. Entre os mais importantes para a saúde pública, podem-se citar o vírus da febre amarela, os da dengue (tipos 1 a 4) e da encefalite japonesa, entre outros. As infecções por arbovírus podem ser clínicas e subclínicas, manifestando-se sob a forma de encefalites, febres benignas de curta duração, febres hemorrágicas e poliartrite acompanhada de erupção cutânea. *A. aegypti* é o principal vetor da febre amarela urbana, dengue e dengue hemorrágica na América Latina e Caribe. As enfermidades mais importantes vetorialmente transmitidas por *A. albopictus* nas Américas são a dengue e febre amarela, podendo também veicular helmintos, parasitos do gênero dirofilaria (Borror *et al.*, 1970).

### **1.2.1 - Dengue**

A dengue é uma enfermidade causada por arbovírus da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, e engloba quatro tipos sorológicos: DEN 1, 2, 3 e 4. O vírus infecta hospedeiros vertebrados, como o homem e outros primatas, mas somente a espécie humana apresenta manifestação clínica com um período de viremia de aproximadamente sete dias. O vírus da dengue é responsável pelas taxas mais altas de doença e mortalidade entre os membros do gênero *Flavivirus*. Epidemias de dengue têm ocorrido nas últimas décadas, em parte, devido à diminuição dos esforços para controlar os mosquitos. Mais de 200 milhões de casos de dengue ocorrem anualmente (Gubler, 2012; WHO, 2002). Infecções sequenciais por múltiplos sorotipos do vírus podem levar à síndrome hemorrágica, cuja estimativa anual é de ~500.000 casos no mundo (WHO, 2002). No Brasil, o número de casos entre 1981 e 2006 chegou a 4.243.049, dentre eles 5.817 casos de dengue hemorrágica e 338 casos fatais (Nogueira *et al.*, 2007), sendo os sorotipos mais frequentes o DENV-1, DENV-2, DENV-3 e um alto risco de transmissão em mais de 15 estados da federação, sendo a maioria da região norte e nordeste (Figura 7 e 8). A infecção de humanos por um sorotipo produz imunidade permanente contra o mesmo sorotipo. No entanto, contra outros sorotipos a imunidade é temporária e parcial (WHO, 1997; CDC, 2009).



**Figura 7.** Sorotipos do vírus Dengue circulantes no Brasil, 2006. Fonte: Secretaria de vigilância em Saúde do Ministério da Saúde.



**Figura 8.** Risco de transmissão do vírus Dengue no Brasil, 2011. Fonte: Secretaria de vigilância em Saúde do Ministério da Saúde.

O DENV-4 foi reportado no Brasil em 1982, na região nordeste da Amazônia brasileira como uma epidemia focal, sem saber-se de mais relatos até 2008, quando foram registrados casos autóctones em Manaus (Melo *et al.*, 2009). Este sorotipo re-emergiu no país em 2010 no estado de Roraima e dispersou-se para outros estados no Norte, Nordeste e Sudeste do país (Temporão *et al.*, 2011; Ministério da Saúde 2011; de Souza *et al.*, 2011). Contudo a sua presença no país pode estar subestimada devido à baixa sensibilidade dos testes diagnósticos usados no programa de controle (Sea *et al.*, 2013).

A dengue pode apresentar-se clinicamente sob quatro formas distintas: infecção inaparente, dengue clássica, dengue hemorrágica e síndrome de choque da dengue. A dengue clássica caracteriza-se pela presença de febre aguda, dores de cabeça, dores musculares e nas articulações, manchas vermelhas na pele, leucopenia e cansaço. A dengue hemorrágica apresenta sintomas como febre alta e hemorragias em função do sangramento de pequenos vasos na pele e nos órgãos internos. O paciente acometido pela síndrome do choque da dengue apresenta choque hipovolêmico resultante das hemorragias (WHO, 1997).

A transmissão da dengue é feita através da picada de fêmeas do gênero *Aedes* infectadas com o vírus. As principais espécies vetoras do vírus são: *A. aegypti*, *A. albopictus*, *A. scutellaris*, *A. africanus* e *A. luteocephalus*. A transmissão do vírus pode ser classificada com relação aos locais onde ela ocorre. Nesse sentido, os ciclos de transmissão podem ser silvestre, rural/suburbano e urbano. O ciclo silvestre envolve primatas não humanos e mosquitos de hábitos silvestres, que habitam o dossel das florestas. Na Ásia, os principais mosquitos envolvidos são dos subgêneros *Finlaya* e *Stegomyia*, como *A. niveus*, do qual foi isolado DENV-4 na Malásia e DENV de sorotipo desconhecido no Vietnã. Na África, as espécies envolvidas foram o *A. africanus*, o *A. luteocephalus*, o *A. opok*, o *A. taylori* e *A. furcifer*. Por outro lado, nas Américas, o ciclo silvestre tem sido pouco estudado. Não obstante, humanos podem participar do ciclo silvestre, como já foi observado na Bolívia, onde se observou pessoas com anticorpos anti-DENV-2 mesmo em localidades em que o *A. aegypti* não estão presentes (Gubler, 1988). No Brasil, o *A. albopictus* tem sido encontrado em florestas (Forattini *et al.*, 1998a; Gomes *et al.*, 1999), possibilitando o início do ciclo silvestre da dengue.



O ciclo rural/suburbano envolve os humanos e os mosquitos *A. albopictus*, *A. polynesiensis*, *A. aegypti* e *A. mediovitatus* (Gubler, 1988). O *A. albopictus* é um vetor tipicamente rural, podendo desempenhar papel secundário no ciclo urbano. Na Ásia, o ciclo rural ocorre em pequenos surtos esporádicos e dispersos. Na América, embora o *A. albopictus* seja encontrado em zona rural, não há notificações de surtos rurais, acontecendo surtos, em geral, na periferia de centros urbanos. O ciclo urbano nas Américas é mediado exclusivamente por *A. aegypti*, mesmo em regiões onde coexistem o *A. albopictus* e o *A. aegypti* (Pontes & Ruffino-Netto 1994, Cardoso Júnior *et al.*, 1997).

O ciclo de vida do vírus ocorre com um período intrínseco de incubação no hospedeiro vertebrado, que vai de um dia antes do aparecimento da febre até o sexto dia da doença, e um período extrínseco de incubação no mosquito, no qual o vírus se multiplica, por período de oito a doze dias e, a seguir, migra para as glândulas salivares. Assim, o vetor torna-se competente para transmitir a doença pelo resto da sua vida, a qual é de seis a oito semanas para o *A. aegypti* (MS, 1996). *A. aegypti* é um mosquito altamente antropofílico e endofílico além de apresentar larga distribuição geográfica, o que o torna o principal vetor da dengue em países tropicais e subtropicais (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Honório *et al.*, 2003; de Lima-Camara *et al.*, 2006; Vasilakis *et al.*, 2008; Troyo *et al.*, 2008; Maidana & Yang, 2008). A infecção de uma fêmea de *A. aegypti* com o vírus da dengue ocorre através da ingestão de sangue contendo partículas virais. O sucesso da infecção dependerá da magnitude da viremia, ou seja, do título viral no repasto sanguíneo e da duração da viremia no vertebrado (WHO, 1997; Lourenço-de-Oliveira, 2006). Em mosquitos suscetíveis, a proliferação dos vírus ocorre inicialmente nas células do epitélio do estômago. Posteriormente, os vírus alcançam a hemolinfa sendo distribuídos para o tecido nervoso, o corpo gorduroso, os ovários e as glândulas salivares, a partir de onde são inoculados em um próximo hospedeiro vertebrado (Lourenço-de-Oliveira, 2006).

O vírus da dengue também pode ser transmitido entre mosquitos por via vertical, infectando os ovócitos ou os ovos, resultando em larvas que já eclodem infectadas (Gunther *et al.*, 2007). Os ovos de *A. aegypti*, por sua vez, podem permanecer em diapausa por longos períodos, o que aumenta ainda mais a capacidade vetorial do mosquito (Ferratini, 1965; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Lourenço-de-Oliveira, 2006).

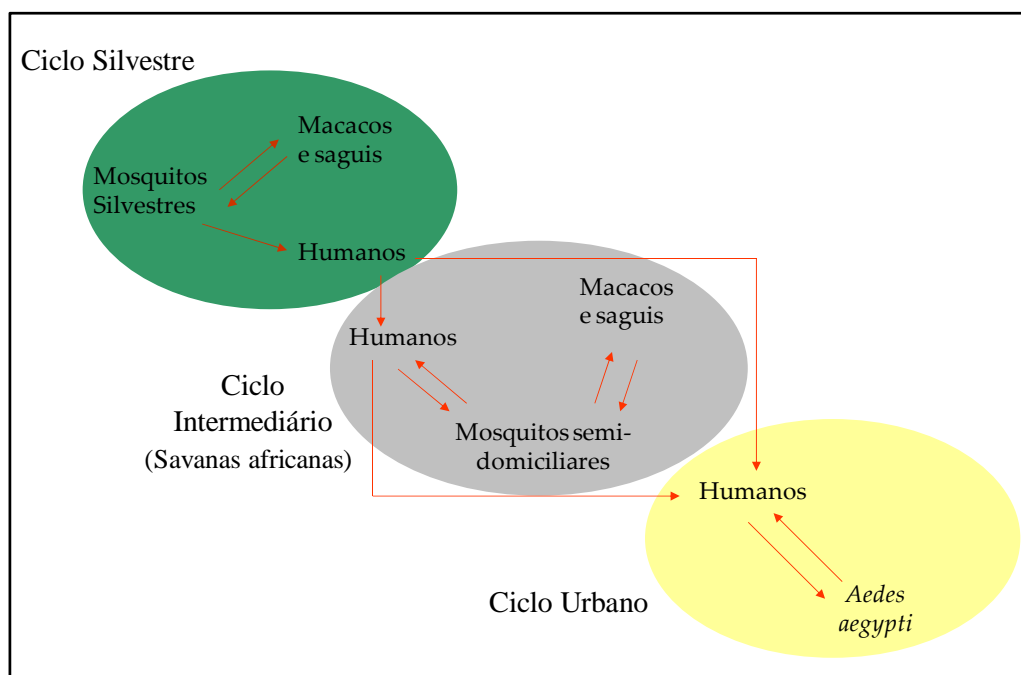
Mudanças sociais e demográficas como o crescimento da população, a urbanização descontrolada e a utilização de meios de transporte modernos contribuem para o aumento da incidência e da distribuição geográfica da dengue. A falta de recursos da saúde pública para pesquisa, prevenção, vigilância e controle é outro fator agravante (Gubler, 2002).

### 1.2.2 - Febre Amarela

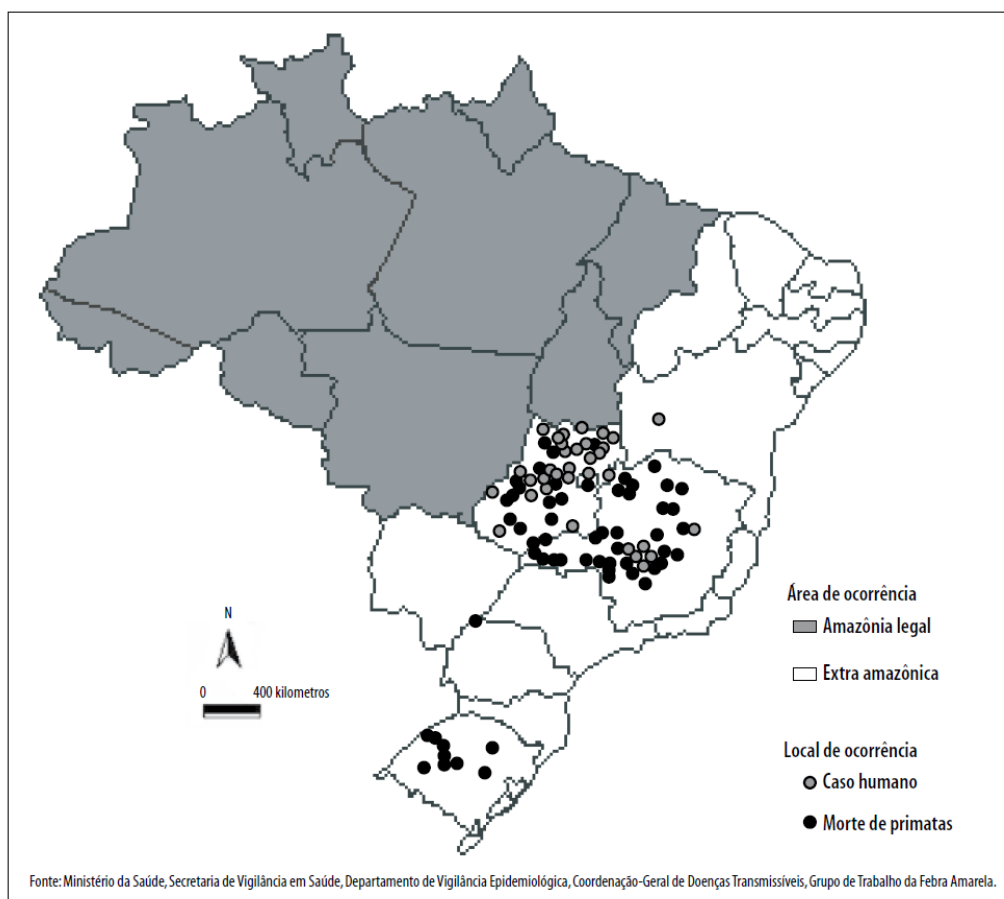
A febre amarela é uma doença infecciosa aguda, de curta duração e gravidade variável, causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus*, da família Flaviviridae que ocorre na América do Sul e na África. Os casos mais benignos têm sintomas e sinais indefinidos; os típicos têm sintomatologia semelhante à da dengue, com início súbito, febre, cefaléia, prostração, náuseas e vômitos. Apesar da existência de vacina usando vírus atenuados, a febre amarela ainda constitui um grande problema no mundo (Lindenbach & Rice, 2001). A OMS estima que cada ano ocorrem 200.000 casos de febre amarela, com aproximadamente 30.000 mortes no mundo (WHO, 2001). O período de incubação intrínseco é de 3 a 6 dias e o extrínseco, de 9 a 12 dias. O vetor, uma vez infectado, permanece transmissor até o fim de sua vida. Existem três ciclos de transmissão para a febre amarela: silvestre, intermediário e urbano. Os três ciclos coexistem na África, mas na América do Sul apenas o silvestre e o urbano estão presentes (WHO, 2009). Na febre amarela urbana, o hospedeiro é o homem e o vetor é o *A. aegypti*. Nas Américas não há surtos de febre amarela urbana desde 1942, com exceção de raros casos, notificados em Trinidad, em 1954 (Estrada-Franco & Craig, 1995). A febre amarela silvestre, que é a forma epidemiológica que persiste no Brasil, é veiculada na floresta por mosquitos silvestres como o *Haemagogus janthinomys* (Dyar, 1921) – vetor primário na maior parte do país – e o *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar & Shannon, 1924) – vetor primário essencialmente nos limites sul dessa arbovirose. Estes mosquitos mantêm o ciclo da febre amarela entre macacos e saguis dentro das florestas e matas de galeria, sendo o homem um hospedeiro acidental, infectado principalmente quando invade esses ambientes (Figura 9) (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Lourenço-de-Oliveira, 2006). Eventos epizootico-epidêmicos de febre amarela em primatas e humanos em regiões onde convivem mosquitos do gênero *Haemagogus* e *A. albopictus* têm sido relatados em vários estados Brasileiros (Figura 10) (Gomes *et al.*, 2008). Quando indivíduos infectados a partir do ciclo silvestre migram para o ambiente urbano, o mosquito *A. aegypti*, devido à sua endofilia, antropofilia

e suscetibilidade ao vírus da febre amarela passa a atuar como vetor da forma urbana da doença. A partir de então o vírus é transmitido somente para humanos, sem a necessidade de macacos para a manutenção do ciclo. A febre amarela urbana é considerada extinta do Brasil desde 1942, quando os últimos casos ocorreram no Acre (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Lourenço-de-Oliveira, 2006).

O ciclo de transmissão intermediária da febre amarela ocorre nas savanas africanas, e pode originar pequenas epidemias em vilarejos rurais. Mosquitos semidomésticos infectam tanto seres humanos quanto macacos sendo que a proximidade entre homens e mosquitos infectados acarreta no estabelecimento a doença (WHO, 2009).



**Figura 9.** Esquema dos três ciclos de transmissão da febre amarela. Adaptado de: WHO

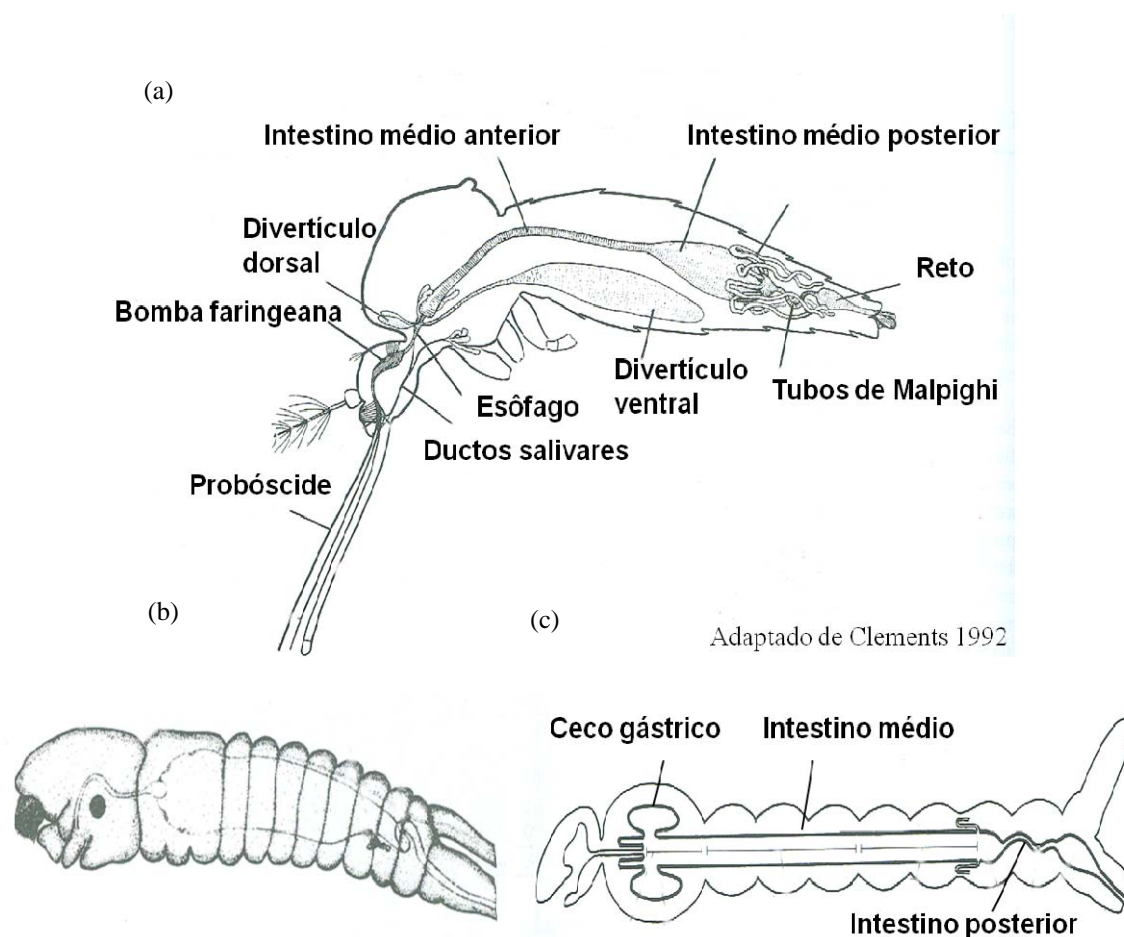


**Figura 10.** Distribuição de casos de febre amarela silvestre e mortes de primatas. Brasil, 2005

### **1.3 – Intestino dos Culicidae**

O processo de digestão mediado pelas enzimas proteolíticas acontece no canal digestivo dos insetos. Este canal é formado por uma camada de epitélio simples (uma célula de espessura) com uma camada acelular de lâmina basal voltada para a hemocele. Este canal se divide em três regiões: (1) intestino anterior, geralmente envolvido com a ingestão, condução e estoque de alimento; (2) intestino médio (estômago), onde ocorre a síntese de enzimas e componentes da membrana peritrófica, a digestão e absorção dos nutrientes; (3) intestino posterior, envolvido na regulação da composição da hemolinfa e na excreção e eliminação do material não digerido proveniente do intestino médio e túbulos de Malpighi (Romoser, 1996) (Figura 11). O néctar ingerido pelos adultos machos e fêmeas é estocado no intestino anterior em uma região impermeável (divertículos = papo) e é liberado para o intestino médio, quando necessário, para ser digerido e absorvido, sendo que nesses casos o processo ocorre na região anterior do intestino médio. Este processo provavelmente é regulado de acordo com as necessidades da hemolinfa,

protegendo o mosquito de um choque osmótico. Apesar do intestino médio ser o principal órgão responsável pela digestão, alguns dissacarídeos contidos no néctar são, em parte, hidrolisados no papo por enzimas salivares. O destino e o estoque do sangue ingerido variam entre os grupos de hematófagos. Na maioria dos casos (incluindo mosquitos), o sangue ingerido somente pelas fêmeas vai direto para o intestino médio onde ocorre na região posterior deste, a digestão e absorção do alimento (Romoser, 1996; Terra & Ferreira, 1994). Além da água, as proteínas são os constituintes predominantes do sangue, portanto o intestino médio dos mosquitos secreta grande quantidade de enzimas proteolíticas. Entretanto, as proteínas do sangue contêm moléculas de carboidratos e lipídios as quais são liberadas durante a digestão e são hidrolisadas pela ação de carboidrases e esterases (Clements, 2000).

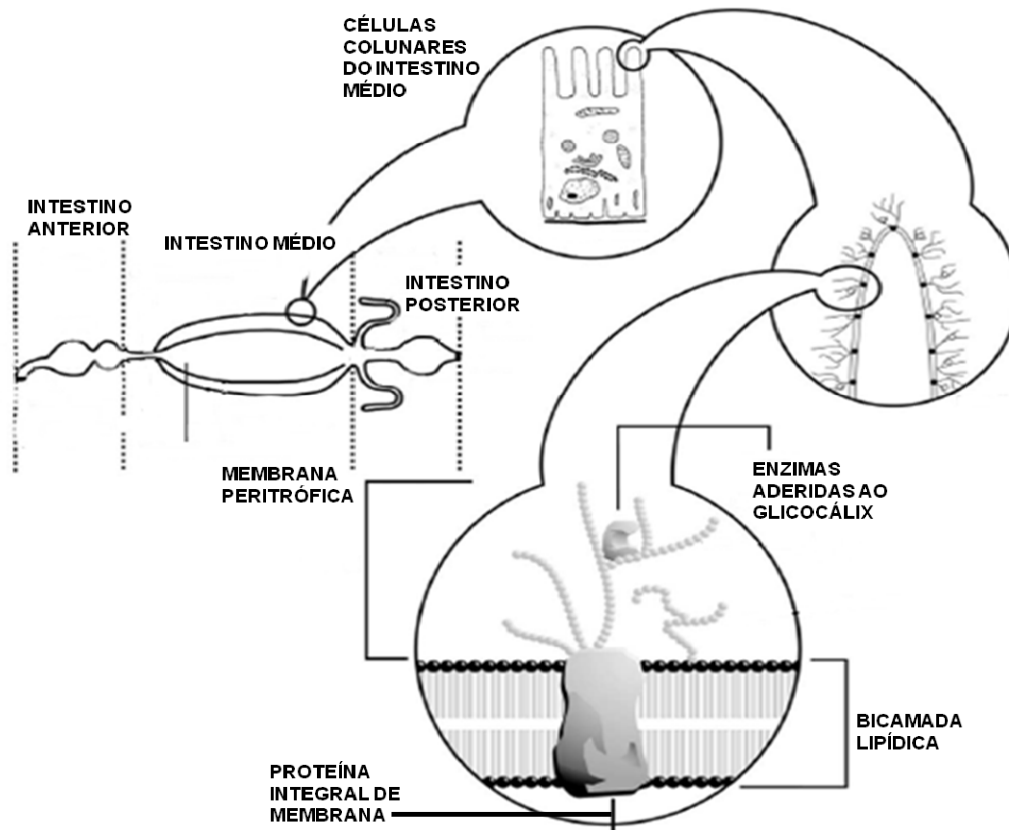


**Figura 11.** Esquema ilustrativo geral do intestino de Culicídeos. Órgãos envolvidos na alimentação: em (a) mosquito adulto; (b) tubo digestivo em um embrião formado; (c) tubo digestivo em larvas. Adaptado de Clements 2000. *The Biology of Mosquitoes*.

O intestino médio da grande maioria dos insetos é revestido internamente por uma membrana que envolve o alimento, separando-o do epitélio de modo a formar dois compartimentos digestivos, a membrana ou matriz peritrófica (MP), fazendo da digestão um processo compartimentalizado. A MP é uma camada acelular composta por quitina, proteínas e proteoglicanas, envolvendo o bolo alimentar separando-o do epitélio do intestino médio (Jacobs-Lorena & Oo, 1996). Assim a MP evita que partículas abrasivas de alimento e micro-organismos patogênicos cheguem ao epitélio do intestino médio, bem como permite o movimento de fluidos durante o peristaltismo e digestão (Clements, 2000). A maioria dos insetos possui MP tanto no estágio larvar quanto no adulto, mas esta pode ser encontrada em apenas um dos dois estágios. Em alguns casos a MP está intimamente associada às microvilosidades do intestino médio (MP tipo I), não possui limites bem definidos e pode ter um aspecto de gel. Em larvas de Díptera, por exemplo, cuja MP é do tipo II esta estrutura é mais bem organizada, definida, possui aspecto membranoso e é capaz de formar um compartimento bem definido entre si e o epitélio (Jordão *et al.*, 1996; Terra, 2001). Atividades de tripsinas e quimiotripsinas foram detectadas na MP e intestino de larvas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, e sugeriu-se seu papel no processamento de nutrientes (Ho *et al.*, 1992). As larvas do flebotômíneo *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), principal vetor de *Leishmania infantum* (Killick-Kendrick, 1985), agente etiológico da leishmaniose visceral americana, apresentam serino peptidases do tipo tripsina e quimiotripsina além de aminopeptidases que atuam na digestão das proteínas contidas nos detritos presentes no meio aquático (Fazito-do-Vale *et al.*, 2007).

A região no interior da membrana peritrófica é chamada de espaço endoperitrófico, e o exíguo compartimento entre a membrana peritrófica e as células epiteliais é chamado de espaço ectoperitrófico. As moléculas de proteínas adquiridas durante a alimentação são clivadas inicialmente em peptídeos grandes pela ação de endopeptidases, os grandes peptídeos por sua vez são progressivamente reduzidos pela ação de exopeptidases e dipeptidases, que removem peptídeos únicos ou dipeptídeos das regiões extremas das cadeias polipeptídicas (Clements, 2000). As endopeptidases atuam, geralmente, no espaço endoperitrófico e possuem um papel importante na fase inicial de digestão, devendo apresentar um tamanho suficientemente pequeno para possibilitar a passagem através da membrana peritrófica e atuar no espaço endoperitrófico. Enquanto as exopeptidases e dipeptidases atuam no espaço ectoperitrófico, disponibilizando os aminoácidos para serem

absorvidos pelas células epiteliais. Assim as enzimas envolvidas na digestão intermediária atuam livres no fluido contido no espaço ectoperitrófico, enquanto que as enzimas responsáveis pela fase final da digestão são ligadas às células da microvilli do intestino médio (Terra & Ferreira, 1994) (Figura 12).



**Figura 12.** Esquema ilustrativo geral do intestino médio de Culicídeos. Adaptado de Terra & Ferreira (1994).

Os mecanismos de controle da biossíntese e secreção de enzimas digestivas são pouco conhecidos. Em insetos que se alimentam continuamente, (larvas de dípteros), a síntese e secreção de peptidases parece ser constitutiva, ao passo que em insetos que não se alimentam continuamente, (predadores ou hematófagos), a síntese parece ser finamente regulada (Lehane *et al.*, 1996). As enzimas digestivas, assim como as demais proteínas animais, são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso, processadas no complexo de Golgi e empacotadas em vesículas secretórias. De maneira geral, é aceito que as variações de curto prazo nas atividades enzimáticas são controladas por mecanismos secretórios, ao passo que as alterações de longo prazo são reguladas hormonalmente (Lehane *et al.*, 1996).

Algumas informações a respeito dos fatores de transcrição que regulam a indução dos genes têm sido reportadas, o que tem ajudado a esclarecer os mecanismos de regulação da síntese dessas biomoléculas. Entretanto todos os hormônios e fatores que são responsáveis pela indução da biossíntese de tripsinas não são conhecidos (Borovsky *et al*, 1988; Borovsky *et al*, 1995). A distensão do epitélio intestinal, a presença de alimento no intestino, pressão osmótica e diferentes hormônios (ecdisona, hormônio juvenil, neuroendócrinos) são alguns dos fatores apontados como responsáveis pela indução da síntese de tripsinas pelas células epiteliais no intestino médio (estômago) dos mosquitos. A indução da biossíntese de tripsina nas células epiteliais do intestino médio é um processo que apresenta duas etapas envolvendo a produção imediata e tardia de tripsinas. A primeira etapa da biossíntese dessas hidrolases é estimulada por proteínas solúveis de variados pesos moleculares logo após a alimentação e envolve a tradução de transcritos de RNAm que já estavam estocados nas células epiteliais prontos para produzirem as “early-trypsin” (tripsinas imediatas). A segunda etapa ocorre aproximadamente às 7-9 horas após a alimentação, sendo ativada por peptídeos de baixo peso molecular provenientes da digestão iniciada pelas tripsinas imediatas, que por sua vez, irão estimular a síntese de novos transcritos RNAm que codificarão para “late trypsin” (tripsinas tardias) as quais otimizarão a digestão (Felix & Freyvogel, 1991; Noriega & Wells, 1999). Tal nível de regulação evita o gasto energético com a produção de enzimas digestivas quando o intestino está vazio, sendo que grandes quantidades dessas enzimas são produzidas apenas se houverem alimentos a serem digeridos (Borovsky *et al*, 1994).

Outro mecanismo de regulação da biossíntese de peptidases intestinais está relacionado com um decapeptídeo conhecido como fator oostático modulador de tripsinas (TMOF), que foi isolado de ovários de *Ae. aegypti*. Tal fator é um sinal ovariano que, não induz ou estimula, e sim reprime e finaliza a biossíntese de tripsina nas células do intestino médio após o sangue ter sido digerido e seus aminoácidos utilizados na síntese de proteínas do ovo, sendo este hormônio importante no fim de cada ciclo gonadotrófico e o seu pico de síntese coincide com o rápido declínio na biossíntese de tripsinas (Borovsky *et al.*, 1994; Borovsky *et al*, 2004). Um fator tipo TMOF foi também encontrado na hemolinfa de *H. virescens* que parece deprimir a síntese de tripsinas no final de cada instar larval (Nauen *et al.*, 2001).



Semelhanças na conformação tridimensional das tripsinas em distintas espécies de insetos indicam que o mecanismo de controle da biossíntese dessas enzimas é comum para estes organismos (Borovsky *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1999). Contudo, de acordo com o processo de digestão e a qualidade do alimento ingerido, diferentes isoenzimas de tripsinas devem ser expressas em cada espécie e em cada fase do ciclo de vida. Estudos que abordem as questões supracitadas são necessários para entender a expressão de tripsinas nos distintos estágios e tecidos dos insetos, bem como as variações quantitativas e/ou qualitativas desta expressão. O papel fundamental destas biomoléculas as postulam como importantes alvos para o desenvolvimento de estratégias de controle de insetos vetores.

#### **1.4 - Peptidases**

As peptidases desempenham funções centrais durante o desenvolvimento dos insetos tais como: digestão de nutrientes, ovogênese, metamorfose e defesa (Nakajima *et al.*, 1997; Terra & Ferreira, 1994; Borowsky & Mahmood, 1995), tendo sido identificadas tanto em adultos quanto em formas imaturas da ordem Diptera.

Peptidases ou proteases são enzimas que clivam ligações peptídicas. Estas enzimas podem atuar como exopeptidases, removendo um ou mais aminoácidos das extremidades protéicas, ou endopeptidases, clivando ligações no interior de cadeias polipeptídicas. As exopeptidases podem ser classificadas como aminopeptidases ou carboxipeptidases, dependendo em qual extremidade da cadeia acontece à clivagem. As endopeptidases, também chamadas de proteases, são subdivididas de acordo com seus mecanismos de catálise em: aspártico-proteases, serino-proteases, cisteíno-proteases e metaloproteases (Barret *et al.*, 1998).

A classe serino peptidase é subdividida em duas superfamílias que apresentam mecanismos catalíticos similares que evoluíram de forma independente. A superfamília de tripsina inclui tripsina e quimiotripsina, que são encontradas abundantemente em animais, enquanto a superfamília de subtilisinas está presente nas bactérias e fungos estudados até o momento (Hu & Leger 2004, Page & Di Cera, 2008). As tripsinas possuem uma tríade catalítica composta pelos resíduos de aminoácidos His, Asp e Ser (que caracterizam todas as serino peptidases), a qual cliva ligações peptídicas no lado carboxílico de L-

aminoácidos básicos, com maior preferência para Arg (2- a 10-vezes) em relação à Lys (Craik *et al.*, 1985; Terra & Ferreira, 1994; Barrett *et al.*, 2004). Além disso, possuem habilidade de ativação de outras formas inativas (zimogênios) pancreáticas (De Albuquerque *et al.*, 2001).

No sistema digestivo de invertebrados a tripsina (EC 3.4.21.4) é a mais abundante, estando presente em diversas formas (isoenzimas). Participa de vários processos fisiológicos, desempenhando um papel principal na hidrólise de proteínas destinadas à nutrição (Muhlia-Almazán *et al.*, 2008). Esta enzima pode apresentar características espécie-específicas desde que haja diferenças significativas em hábitos alimentares, composição do alimento ingerido e no processo de digestão protéica. Essas diferenças são respostas adaptativas a diferentes estilos de vida, ambientes e habilidade de sobrevivência entre as espécies (Muhlia-Almazán *et al.*, 2008). Os primeiros dados sobre tripsinas de invertebrados relataram a secreção de enzimas digestivas responsáveis pela hidrólise de nutrientes no alimento (Davie & Neurath 1955; KEIL *et al.*, 1968; Arnon & Neurath, 1969; Pxeiderer *et al.*, 1970; Yang & Davies, 1971; Gooding, 1975; Gibson & Barker, 1979).

Em fêmeas adultas de *A. aegypti* a tripsina está relacionada à digestão da maior parte das proteínas presentes no sangue. Em poucos segundos as fêmeas do mosquito são capazes de ingerir grande quantidade de sangue, ao passo que gastam pelo menos 36 horas no processo de conversão dos aminoácidos, resultantes da proteólise do sangue, em componentes de seus ovos (Graf *et al.*, 1986; Noriega & Wells, 1999). Aminopeptidases, carboxipeptidase A e carboxipeptidase B têm sua ação estimulada pela ingestão de sangue, apresentando maior atividade durante o pico de proteólise da tripsina, que ocorre entre 20 e 24 horas após a ingestão de sangue pelas fêmeas de *A. aegypti* (Noriega *et al.*, 1996; Noriega *et al.*, 2002).

Cisteíno proteases relacionadas à vitelogenese também foram descritas em *A. aegypti*. Elas são sintetizadas no corpo gorduroso do inseto, um órgão análogo ao fígado dos vertebrados, e armazenadas nos ovócitos em desenvolvimento, desempenhando um importante papel na degradação da vitelina, principal proteína presente no vitelo dos embriões do mosquito (Cho *et al.*, 1999). Em *Anopheles stephensi* (Liston, 1901) e *Anopheles darlingi* (Root, 1926) serino proteases e aminopeptidases identificadas na

hemolinfa e no intestino de mosquitos adultos provavelmente também estão relacionadas à digestão das proteínas do sangue (Rosenfeld & Vandenberg, 1998; Okuda *et al.*, 2005). Em *Anopheles gambiae* (Giles, 1926), *Anopheles dirus* (Peyton & Harrison, 1979) e *Anopheles culifacies* (Giles, 1901) serino proteases isoladas dos hemócitos e da hemolinfa estão envolvidas na regulação da resposta imune inata, sendo responsáveis por processos como coagulação da hemolinfa, melanização e síntese de peptídeos antimicrobianos que atuam na supressão da infecção por protozoários do gênero *Plasmodium* (Marchiafava & Celli, 1885), causadores da malária (Volz *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2007). Atividades de tripsinas e quimiotripsinas foram detectadas na matriz peritrófica e intestino larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*, e sugeriu-se seu papel no processamento de nutrientes (Ho *et al.*, 1992). As larvas do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), vetor de *Leishmania infantum* (Killick & Kendrick, 1985), agente etiológico da leishmaniose visceral americana, apresentam serino proteases do tipo tripsina e quimiotripsina além de aminopeptidases que atuam na digestão das proteínas contidas nos detritos presentes no meio aquático (Fazito-do-Vale *et al.*, 2007). As larvas de *Oestrus ovis* (Linnaeus, 1761) são parasitas da cavidade nasal de ovelhas e cabras enquanto as larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr, 1781) parasitam diversos tecidos de animais domésticos e do homem causando miíase. Nas duas espécies as serino proteases degradam o tecido do hospedeiro, facilitando a migração das larvas para outras áreas bem como a aquisição de nutrientes necessários para o desenvolvimento larval. (Tabouret *et al.*, 2003; Pires *et al.*, 2007). Larvas de primeiro instar de *Oxysarcodexia thornax* (Walker, 1849), uma mosca saprófaga, expressam de forma constitutiva serino proteases do tipo quimiotripsina as quais poderiam estar associadas com metamorfose do inseto (Cuervo *et al.*, 2008). Em *Dermatobia hominis* enzimas pertencentes à classe das cisteíno proteases também estão relacionadas à proteólise dos tecidos do hospedeiro, contribuindo para a ocorrência das miíases (Pires *et al.*, 2007). Em larvas de *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) duas metaloproteases foram identificadas. A metaloprotease de matriz 1 (MMP 1) é essencial para que o crescimento das células da traquéia acompanhe a síntese do novo exoesqueleto durante a muda ou ecdise. A metaloprotease de matriz 2 (MMP 2), por outro lado, atua na proteólise de tecidos larvais durante a metamorfose (Glasheen *et al.*, 2009; Page-McCaw, 2008).

### **1.5 – Análise proteômica em *Aedes* spp.**

Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas de *Aedes* spp. adquirem os nutrientes necessários para a maturação e produção das proteínas do ovo (Raikhel & Dhadialla, 1992). Contudo, durante tal alimentação, as fêmeas podem ser infectadas também com vários patógenos, tais como o vírus da Dengue, os quais devem cruzar as células epiteliais do intestino médio para finalmente alcançar as glândulas salivares e garantir a sua transmissão a um novo hospedeiro durante o próximo repasto sanguíneo. Por esta razão vários estudos prévios têm focado nas glândulas salivares com o objetivo de identificar e descobrir novas moléculas envolvidas na interação das células do hospedeiro com os patógenos e identificar moléculas envolvidas na resposta imune no momento do repasto sanguíneo do inseto (Ribeiro, 1995; Ribeiro & Francischetti, 2003; Wasinpiyamongkol *et al.*, 2010; Fontaine *et al.*, 2011; Juhn *et al.*, 2011). Não obstante, o intestino médio é a primeira barreira que os patógenos devem atravessar para estabelecer a infecção e representa um dos principais locais imunologicamente ativos do inseto (Sánchez-Vargas *et al.*, 2009).

Desta forma, muitos elementos convergem no intestino incluindo o sangue dos vertebrados a ser processado, os patógenos e as moléculas da resposta imune do vetor, entre outros. Entretanto, pouco se sabe sobre as proteínas envolvidas no processamento do sangue nem sobre aquelas que têm um papel na detoxificação de metabólitos produzidos durante este processo. Além do mais, tampouco se conhecem as proteínas envolvidas na defesa contra patógenos nem aquelas expressas durante os intervalos de alimentação do mosquito. A descrição dessas moléculas pode ajudar a entender os fenômenos que controlam o desenvolvimento dos patógenos e sua subsequente transmissão pelo inseto.

A caracterização do perfil de proteínas do intestino médio de fêmeas é um dos primeiros passos para entender a complexa fisiologia deste tecido. As abordagens proteômicas possibilitam a completa definição do perfil protéico de um tecido ou célula bem como permitem identificar as proteínas expressas sob diferentes condições.

O proteoma é definido como o conjunto das proteínas expressas pelo genoma de uma célula em um determinado momento ou sob determinado estímulo (Ashton *et al.*, 2001). Os estudos proteômicos em insetos e em outros organismos vêm sendo facilitados e

estimulados graças ao seqüenciamento dos genomas de diversas espécies (Ribeiro *et al.*, 2007). As técnicas proteômicas, além de permitirem inferências sobre a expressão gênica diferencial em grande escala também se prestam para a definição do mapa protéico global dos organismos e, a partir deste, para o estudo específico da regulação protéica tanto em órgãos como em células individualizadas.

Uma das técnicas mais usadas para definir o proteoma de uma célula ou tecido tem sido a eletroforese bidimensional (2DE). A 2DE acopla focalização isoelétrica (IEF) na primeira dimensão com eletroforese em géis de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) na segunda dimensão (Scheele, 1975; O'Farrell, 1975), possibilitando a separação de misturas complexas de proteínas de acordo com o ponto isoelétrico (*pI*), com a massa molecular (*Mr*), com a solubilidade e a abundancia relativa. Dependendo do tamanho do gel e do gradiente de pH usado, a 2DE pode resolver milhares de proteínas simultaneamente e pode detectar menos de 1 ng de proteína por “spot” (Görg *et al.*, 2004).

Análises transcriptômicas têm contribuído para o entendimento da biologia de *Aedes* spp, mas poucos estudos proteômicos têm sido desenvolvidos neste gênero. Contudo, distintas técnicas proteômicas têm sido usadas para caracterizar sub-proteomas de *A. aegypti* tais como a membrana do intestino médio de larvas, a glândula salivar, as vesículas de membrana de borda em escova do intestino, os túbulos de Malpigi e o sêmen de adultos (Bayyareddy *et al.*, 2009; Popova-Butler & Dean, 2009; Beyenbach *et al.*, 2009; Sirot *et al.*, 2011; Tchankouo-Nguetcheu *et al.*, 2012; Tetreau *et al.*, 2012). Ademais, foi reportada uma análise proteômica de uma linha celular de *A. albopictus* infectada com os sorotipos 1 e 3 do Dengue (Patramool *et al.*, 2011).

## 2 - JUSTIFICATIVA

Apesar da existência de valiosa informação sobre a presença de peptidases em tecidos específicos de distintas espécies de insetos, nada tem sido reportado sobre o perfil e o papel de peptidases ativas expressas pelas formas larvais, pupa e adultos das espécies a serem investigadas neste estudo. Nesse sentido, a aplicação de técnicas enzimográficas e de tecnologias proteômicas pode ser útil para mapear e identificar peptidases expressas durante as diferentes fases evolutivas desses insetos. Assim, o racional deste trabalho assenta-se na (1) análise comparativa do perfil proteolítico dos estádios larvais e das pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* e (2) análise do mapa proteômico parcial do intestino médio da fêmeas de *Aedes albopictus* alimentadas com açúcar, com foco na identificação de proteases nesse órgão. Pretendeu-se com tal proposta elaborar o perfil proteolítico global dos diferentes estágios evolutivos das espécies estudadas bem como identificar as peptidases expressas no intestino médio de fêmeas adultas. Com tal abordagem, também foi possível identificar as mudanças na expressão de peptidases durante os estágios evolutivos das duas espécies investigadas.

### 3 - OBJETIVOS

3.1 – Caracterizar e comparar o perfil proteolítico dos estádios larvais e das pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*;

3.2 - Obter o mapa proteômico parcial do intestino médio da fêmeas de *Aedes albopictus* alimentadas com açúcar, com foco na identificação de proteases expressas nesse órgão.

### 4 – METAS

4.1 – Identificar e caracterizar, por enzimografia em SDS-PAGE co-polimerizado com substrato gelatina, as atividades proteolíticas dos quatro estádios larvais e dos estágios de pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*;

4.2 – Verificar, através da comparação dos perfis enzimográficos, a ocorrência de expressão diferencial de peptidases nos quatro estádios larvais e pupa de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*;

4.3 – Identificar e caracterizar o perfil enzimográfico do intestino médio das fêmeas de *Aedes albopictus*;

4.4 – Corroborar a expressão de peptidases em formas pré-imaginais e intestino médio, usando ensaios de degradação de substrato em solução;

4.5 – Análise da expressão proteica global, usando técnicas proteômicas, do intestino médio de fêmeas de *Aedes albopictus* alimentadas com açúcar.

## 5 - RESULTADOS

Os resultados desta tese são apresentados em forma de três artigos já publicados e um artigo submetido, os quais condensam os dados obtidos de acordo com os objetivos propostos:

### Artigo 1:

Expression of trypsin-like serine peptidases in pre-imaginal stages of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).

Mesquita-Rodrigues C, **Saboia-Vahia L**, Cuervo P, Levy CM, Honorio NA, Domont GB, de Jesus JB.

Arch Insect Biochem Physiol. 2011 Apr;76(4):223-35. doi: 10.1002/arch.20412.

### Artigo 2:

Trypsin-like serine peptidase profiles in the egg, larval, and pupal stages of *Aedes albopictus*.

**Saboia-Vahia L**, Borges-Veloso A, Mesquita-Rodrigues C, Cuervo P, Dias-Lopes G, Britto C, Silva AP, De Jesus JB.

Parasit Vectors. 2013 Feb 27;6:50. doi: 10.1186/1756-3305-6-50.

### Artigo 3:

Protein expression in the midgut of sugar-fed *Aedes albopictus* females.

**Saboia-Vahia L**, Borges-Veloso A, Cuervo P, Junqueira M, Mesquita-Rodrigues C, Britto C, Domont GB, De Jesus JB.

Parasit Vectors. 2012 Dec 11;5:290. doi: 10.1186/1756-3305-5-290.

### Artigo 4:

Midgut of *Aedes albopictus* females expresses active trypsin-like serine peptidases

**Leonardo Saboia-Vahia**; Andre Borges-Veloso; Patrícia Cuervo; Constança Britto; José Batista De Jesus

Submetido



## 5.1 - Artigo 1

## Article

## EXPRESSION OF TRYPSIN-LIKE SERINE PEPTIDASES IN PRE-IMAGINAL STAGES OF *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)

Camila Mesquita-Rodrigues and Leonardo Saboia-Vahia  
*Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil*

Patrícia Cuervo  
*Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil*

Claudia Masini d'Avila Levy  
*Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil*

Nildimar Alves Honorio  
*Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil*

Gilberto Barbosa Domont  
*Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Laboratório de Química de Proteínas, Rio de Janeiro, Brazil*

Jose Batista de Jesus  
*Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; Departamento de Engenharia de Biosistemas, Universidade Federal de São João del Rei, MG, Brazil*

*This study reports the biochemical characterization and comparative analyses of highly active serine proteases in the larval and pupal developmental stages of *Aedes aegypti* (Linnaeus) using substrate-SDS-PAGE. Zymographic analysis of larval stadia detected proteolytic activity in 6–8 bands with apparent molecular masses ranging from 20 to 250 kDa, with activity observed from pH 5.5 to 10.0. The pupal stage showed a complex proteolytic activity in at least*

Grant sponsors: FIOCRUZ-IOC; MCT/CNPq; FAPERJ; FAPEMIG; Grant number: APQ-02093-09.  
Correspondence to: Jose Batista de Jesus, Departamento de Engenharia de Biosistemas, Universidade Federal de São João del Rei, MG, Brazil. E-mail: jbj@ioc.fiocruz.br

11 bands with apparent  $M_r$  ranging from 25 to 250 kDa, and pH optimum at 10.0. The proteolytic activities of both larval and pupal stages were strongly inhibited by phenyl-methyl sulfonyl-fluoride and *N*- $\alpha$ -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride, indicating that the main proteases expressed by these developmental stages are trypsin-like serine proteases. The enzymes were active at temperatures ranging from 4 to 85°C, with optimal activity between 37 and 60°C, and low activity at 85°C. Comparative analysis between the proteolytic enzymes expressed by larvae and pupae showed that substantial changes in the expression of active trypsin-like serine proteases occur during the developmental cycle of *A. aegypti*. © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

**Keywords:** *Aedes aegypti*; protease; trypsin-like serine protease; zymographic analysis.

## INTRODUCTION

*Aedes aegypti* is the main vector for dengue and yellow fever in tropical and subtropical regions of the world (Honório et al., 2003; de Lima-Camara et al., 2006; Kaur et al., 2008; Maidana and Yang, 2008; Troyo et al., 2008; Vasilakis and Weaver, 2008). These viral human diseases have become major international public health concerns because of the geographical spread of mosquitoes that readily vector dengue and yellow fever viruses (Shope, 1991; Gubler, 2002; Lourenço-de-Oliveira et al., 2004; Maciel-de-Freitas et al., 2006; Wilder-Smith and Gubler, 2008). Dengue is the most common mosquito-borne viral disease of humans; globally 2.5 billion people live in areas where dengue viruses can be transmitted (WHO, 2008). In 2007, over 830,000 cases of dengue were reported in the American continent alone (PAHO, 2008). *A. aegypti* is widespread in Brazil transmitting three of the four dengue virus serotypes (Nogueira et al., 2000; Ríos-Velásquez et al., 2007).

During insect development, proteases play central roles in numerous processes, such as digestion, oogenesis, and metamorphosis (Terra and Ferreira, 1994; Borovsky and Mahmood, 1995; Nakajima et al., 1997). A number of proteases have been identified in both adults and larvae of the order Diptera. Serine proteases have been described in *A. aegypti* (Yang and Davies, 1971; Graf et al., 1986; Graf and Briegel, 1989; Ho et al., 1992; Borovsky and Meola, 2004), *Anopheles* (Han et al., 1997; Rosenfeld and Vanderberg, 1998; Abraham et al., 2005; Okuda et al., 2005; Rodrigues et al., 2007), *Oestrus ovis* (Tabouret et al., 2003), *Culex pipiens pallens* (Gong et al., 2005), *Lutzomyia longipalpis* (Fazito do Vale et al., 2007), and *Dermatobia hominis* (Pires et al., 2007). In addition, cysteine peptidases, leucine-aminoprotease, carboxypeptidase A, and carboxypeptidase B have also been described in *A. aegypti* (Cho et al., 1999; Noriega et al., 2002) and metalloproteases have been reported in *Anopheles stephensi*, *Drosophila melanogaster*, and *D. hominis* (Rosenfeld and Vanderberg, 1998; Vierstraete et al., 2003; Pires et al., 2007).

Despite the existence of valuable information about the presence of proteases in specific tissues of *A. aegypti*, as far as we know, no data have been reported on the proteolytic enzyme profile of whole extracts of pre-imaginal stages of this species. This study employed zymographic analyses (gelatin-SDS-PAGE) to characterize and

compare the proteolytic expression patterns in the four larval stadia and pupae of *A. aegypti*.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

Stock solutions of 1,10-phenantroline (200 mM) and pepstatin A (1 mg/ml) were prepared in ethanol, whereas trans-epoxysuccinyl L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64, 1 mM) was prepared in water. Phenyl-methyl sulfonyl-fluoride (PMSF, 250 mM) was diluted in isopropanol, and *N*- $\alpha$ -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride (TLCK, 100 mM) and *N*-*p*-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK, 100 mM) were prepared in methanol. All protease inhibitors were maintained at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Insects and Collecting Methods

All experiments were conducted using larvae (L1, L2, L3, and L4) and pupae of *A. aegypti* obtained from a colony originating from insects captured in the Brazilian state of Rio de Janeiro and maintained in the Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

### Zymographic Analysis

Larvae and pupae were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, and homogenized in lysis buffer containing 10% glycerol, 0.6% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl pH 6.8, and 150 mM NaCl. The homogenates were centrifuged at 14,000g for 40 min at  $4^{\circ}\text{C}$  to remove insoluble material, and proteins were resolved as previously described (Cuervo et al., 2008). Briefly, the supernatants were mixed with sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) sample buffer (125 mM Tris, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 0.002% bromophenol blue) and resolved in 12% SDS-PAGE co-polymerized with 0.1% porcine gelatin. The gels were loaded with 20  $\mu\text{g}$  of protein per well. After electrophoresis at a constant voltage of 110 V and at  $4^{\circ}\text{C}$ , the gels were washed twice for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$  in either 100 mM sodium acetate buffer pH 3.5 or 5.5 containing 2.5% Triton X-100 or 100 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 or 10.0 plus 2.5% Triton X-100. Protease activities were detected by incubating the gels in a reaction buffer containing 100 mM sodium acetate (pH 3.5 or 5.5) or 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5 or 10.0) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 30, 60, and 120 min for larvae, and 24 h for pupae homogenates. Bands of hydrolyzed gelatin were visualized by staining the gels with 0.2% Coomassie blue R-250, 40% methanol, 10% acetic acid, and destaining them with 10% acetic acid. The molecular masses of the proteases were estimated by comparison with the mobility of molecular mass standards (Fermentas Life Science, Hanover). The results are representative of five independent experiments carried out in triplicate.

### Thermal Stability

After electrophoresis, gels of larvae extracts were incubated at 4, 10, 37, 50, 60, or  $85^{\circ}\text{C}$  for 60 min in preheated 100 mM Tris-HCl pH 7.5 reaction buffer.

### Protease Inhibition Assays

Larvae and pupa homogenates were pre-incubated (before electrophoresis) for 30 min at 37°C with one of the following protease inhibitors: 10  $\mu$ M E-64, 1 mM PMSE, 100  $\mu$ M TLCK, 100  $\mu$ M TPCK, 10  $\mu$ M pepstatin-A, or 10 mM 1,10-phenanthroline. Inhibitor was also added to the reaction buffer at the same concentration. Samples were then resolved as described above.

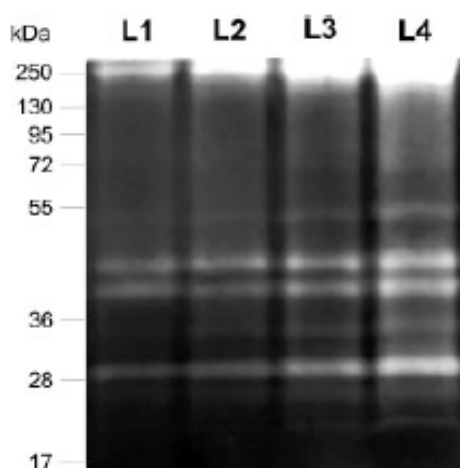
## RESULTS

### Zymographic Profiles and Time-Courses of Proteolytic Activities From Larval Instars

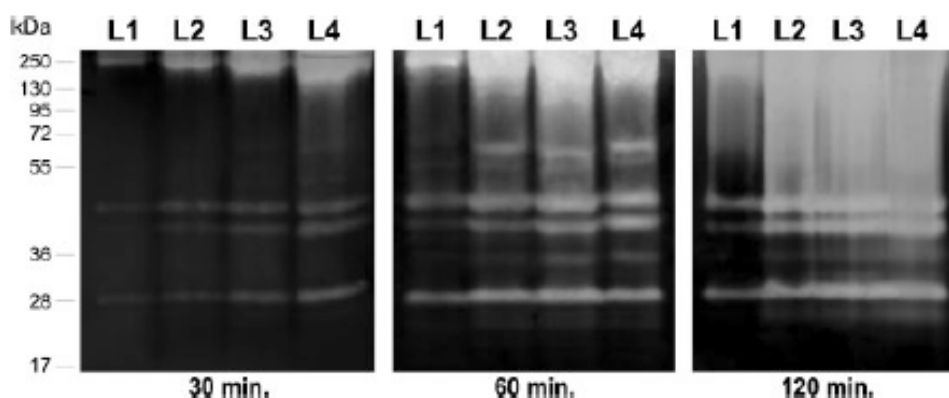
The zymographic profile from L1, L2, L3, and L4 larval instars was first analyzed after a 1-h reaction at pH 7.5. The protease activities resulted in the appearance of six to eight bands ranging in molecular masses from 20 to 250 kDa (Fig. 1). Qualitative differences in the proteolytic profiles were observed between the larval instars. Time-course assays were performed to evaluate how the length of the incubation time impacted the enzymatic activity (Fig. 2). The intensity of proteolysis increased progressively during incubation from 30 to 120 min. Although enzymatic activities were detected in all experimental conditions, the protease composition of all larval instars was clearly pronounced in gels that were allowed to incubate for 60 min. Thus, a reaction time of 60 min was used for all subsequent larval enzymatic assays.

### Influence of pH on the Proteolytic Activities of Larval Instars

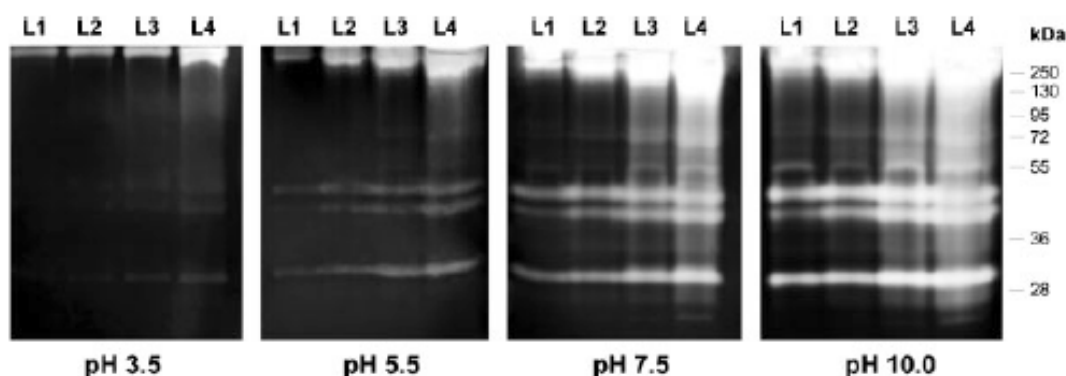
To investigate the pH dependence of the protease activities, the gels were incubated for 1 h in buffers ranging from pH 3.5 to 10.0. Proteolytic activities were detected at all pHs in each of the four larval instars (Fig. 3). However, the intensities of the proteolytic profiles at pH 3.5 and 5.5 were drastically reduced when compared to those obtained at pH 7.5 and 10.0. At pH 10.0, some of the proteolytic zones overlapped in L3 and L4



**Figure 1.** Gelatin-SDS-PAGE profiles of active peptidases detected in homogenates from the four larval instars of *A. aegypti*. Peptidase activities were detected after incubation of the gels for 1 h at 37°C in 100 mM Tris-HCl buffer pH 7.5. L1, first instar larva; L2, second instar larva; L3, third instar larva; L4, fourth instar larva. The numbers on the left indicate the apparent molecular masses of the active bands expressed in kiloDaltons (kDa).



**Figure 2.** Time-course of proteolytic activities exhibited by the four larval instars of *A. aegypti*. Protease activities were detected after incubation of the gels at 37°C in reaction buffer at pH 7.5 for 30, 60, and 120 min. L1, first instar larva; L2, second instar larva; L3, third instar larva; L4, fourth instar larva. The numbers on the left indicate the apparent molecular masses of the active bands expressed in kiloDaltons (kDa).



**Figure 3.** Effect of pH on the proteolytic pattern from the four larval instars of *A. aegypti*. Enzymatic activities were evaluated after incubation of the gels for 1 h at 37°C in reaction buffer containing 100 mM sodium acetate at pH 3.5 or 5.5 or 100 mM Tris-HCl at pH 7.5 or 10.0. L1, first instar larva; L2, second instar larva; L3, third instar larva; L4, fourth instar larva. The numbers on the left indicate the apparent molecular masses of the active bands expressed in kiloDaltons (kDa).

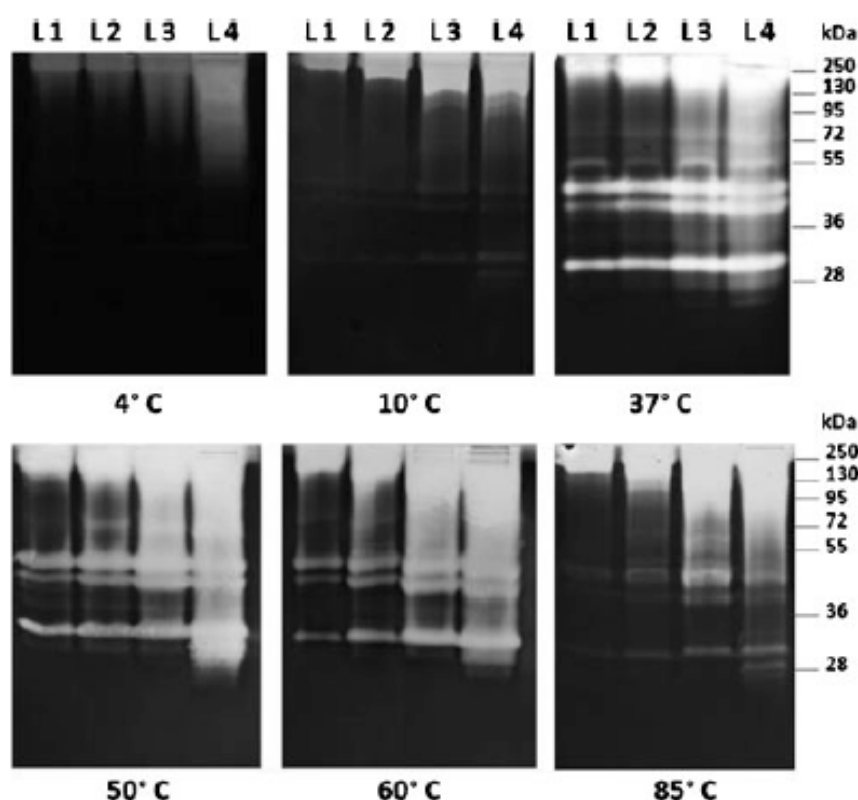
instars, whereas some bands with molecular masses between 55 and 95 kDa were more pronounced in L1 and L2 instars.

#### *Effect of Temperature on the Proteolytic Activity From Larval Instars*

The effect of temperature on the proteolysis was followed at 4–85°C (Fig. 4). Low enzymatic activity was observed at 4 and 10°C when compared with the standard assay at 37°C. Proteolytic activities reached a maximum at 50 and 60°C, and decreased at 85°C to a lower level that observed at 37°C.

#### *Enzymatic Inhibition Assays in Larval Instars*

The effect of a number of protease inhibitors on larval proteolytic activities was determined (Fig. 5). Enzymatic activities in the larval homogenates were not affected by 10 µM E-64, 10 µM pepstatin A, 100 µM TPCK, or 10 mM 1,10-phenanthroline. On

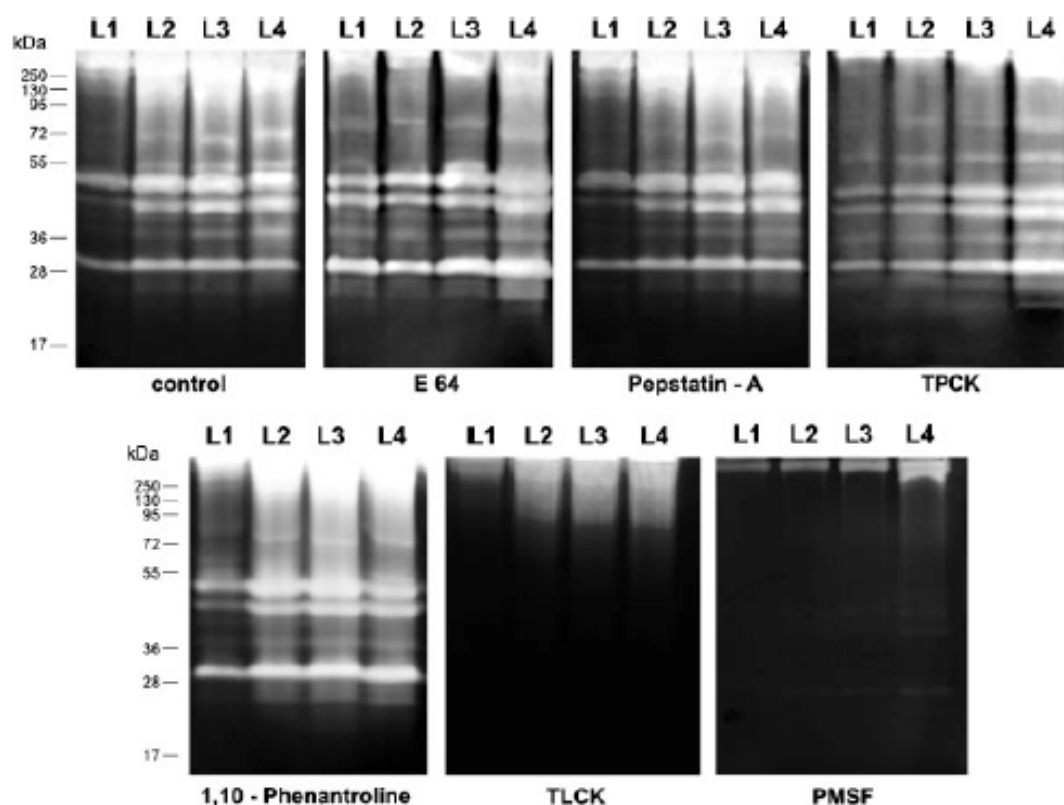


**Figure 4.** Effect of temperature on the proteolytic activities from larvae of *A. aegypti*. Enzymatic activities were detected after incubation of the gels for 60 min at 4, 10, 37, 50, 60, or 85°C in reaction buffer containing 100 mM Tris-HCl at pH 7.5. The numbers on the left indicate the apparent molecular masses of the active bands expressed in kiloDaltons (kDa).

the contrary, 100  $\mu$ M TLCK and 1 mM PMSF strongly inhibited the enzymatic activities in all larval instars.

#### *Effect of pH and Inhibitors on the Proteolytic Activity Profile of the Pupa*

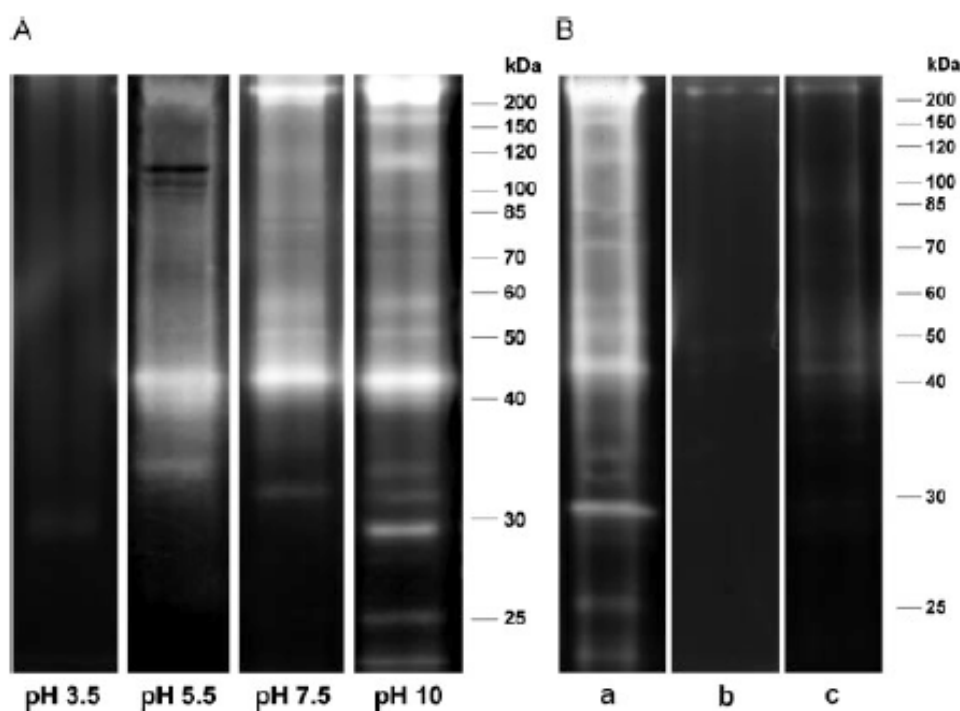
The proteolytic profile during the pupa stage was evaluated after incubation of the gels in buffers at pH 3.5–10.0 for 24 h (Fig. 6A). Protease activities were detected at a pH range of 5.5–10.0, with no proteolytic bands detected at pH 3.5. Differences in the number and intensity of the activity bands were observed across pH 5.5, 7.5, and 10.0. The most complex proteolytic profile from the pupal stage was observed at pH 10.0, with at least 11 bands ranging from 25 to  $\sim$ 200 kDa resolved. The activity of a proteolytic band appearing to have a molecular mass of 200 kDa was strongly increased at pH 7.5 and 10.0, while strong proteolytic activity exhibited by an enzyme of approximately 40 kDa was uniformly intense in a pH range of 5.5–10.0. The minimum incubation time to detect protease activities from the pupal stage was fixed at 24 h, as no enzymatic activity was detected when homogenates were incubated for 30, 60, or 120 min (data not shown), indicating very low activity. The enzymatic profile exhibited by pupa homogenates was strongly inhibited by 1 mM PMSF or 100  $\mu$ M TLCK (Fig. 6B). Proteolytic activities were not affected by 10  $\mu$ M E-64, 100  $\mu$ M TPCK, 10  $\mu$ M pepstatin A, or 10 mM 1,10-phenanthroline (data not shown).



**Figure 5.** Effect of protease inhibitors on the proteolytic profiles of the four larval instars of *A. aegypti*. Peptidase activities were detected after incubation of the gels for 1 h at 37°C in 100 mM Tris-HCl pH 7.5. Proteolytic assays were performed in the absence (control) or presence of each of the following protease inhibitors: 10 μM E-64; 1 mM PMSF; 100 μM TLCK; 100 μM TPCK; 10 μM pepstatin-A, and 10 mM 1,10-phenanthroline. L1, first instar larva; L2, second instar larva; L3, third instar larva; L4, fourth instar larva. The numbers on the left indicate the apparent molecular masses of the active bands expressed in kiloDaltons (kDa).

## DISCUSSION

This study reports the biochemical characterization and comparative analysis of diverse serine proteases in larvae and pupae of *A. aegypti* at different developmental stages using gelatin-SDS-PAGE. The detection of larval protease activities is time and pH dependent. Although a time-course experiment demonstrated that activities increased with longer incubation time, no additional bands were observed after 1 h of incubation. In addition, even though all activities were strongly detected at pH 10.0 and some proteolytic bands from L1 and L2 instars were better visualized at this pH (when compared to pH 7.5), the hyperactivity of the proteases at pH 10.0 produced overlapping zones and smears in several regions of the gel, precluding an accurate analysis of the proteolytic profile expressed by different larval instars. Therefore, the optimal experimental conditions to detect proteolytic activities in different larval instars were incubation for 1 h at pH 7.5. Protease inhibitors PMSF and TLCK strongly inhibited the proteolytic activities during different larval stadia. The inhibition of the proteolytic pattern by PMSF (an inhibitor of chymotrypsin and trypsin), and TLCK (a specific inhibitor of trypsin), indicates that the main proteolytic enzymes of larval of *A. aegypti* are trypsin-like serine proteases. These results agree with previous descriptions of the presence of trypsin in larval stages of *A. aegypti*, which have been



**Figure 6.** Gelatin-SDS-PAGE profiles demonstrating peptidase activity at a range of pH values and the effects of the serine peptidase inhibitors TLCK and PMSF on peptidase activities in the pupal stage of *A. aegypti*. (A) Peptidase activities were detected after incubation of the gels for 24 h at 37°C in reaction buffer containing 100 mM sodium acetate at pH 3.5 or 5.5 or 100 mM Tris-HCl at pH 7.5 or 10.0. The numbers on the left indicate the apparent molecular masses of the active bands expressed in kiloDaltons (kDa). (B) Proteolytic assays were performed in the absence of inhibitors (a), the presence of 1 mM PMSF (b), and the presence of 100  $\mu$ M TLCK (c). Peptidase activities were detected after incubation of the gels for 24 h at 37°C in reaction buffer containing 100 mM Tris-HCl pH 10.0. The numbers on the left indicate the apparent molecular masses of the active bands expressed in kiloDaltons (kDa).

detected using other biochemical methods (Yang and Davies, 1971; Ho et al., 1992; Borovsky and Meola, 2004). In fact, it has been reported that the gut of larval stages of *A. aegypti* synthesizes mostly trypsin-like enzymes (~90%) and also other proteases in a lesser extent (Borovsky and Meola, 2004). The experimental conditions used here were intended for the detection of proteases from whole larvae and pupa extracts. Using dissected guts from pre-imaginal stages of *A. aegypti* and other Diptera species, other authors have also detected trypsin and chymotrypsin-like enzymes (Mahmood and Borovsky, 1992; Tabouret et al., 2003; Borovsky and Meola, 2004; Fazito do Vale et al., 2007; Pires et al., 2007).

Due to the fact that SDS-substrate-gel electrophoresis detects active proteases, proteins are not completely denatured and reduced. Therefore, the molecular weight calculated for proteolytic activities is only an estimated. Here we detect trypsin-like serine proteases ranging from 20 to 250 kDa whereas genome data revealed molecular masses between 24 and 35 kDa (Nene et al., 2007). Because the protein samples are not boiled in the presence of SDS and  $\beta$ -mercaptoethanol, the proteolytic activities of high molecular masses detected here could be due to protein aggregates or to proteases still bound to some membranes that precipitated at the top of the gels or migrated very slowly. In addition, it is possible that binding of the proteases to the substrate also impeded the migration on the gel. Such factors may slow the migration of the proteases, giving an illusion of a higher molecular mass (Nauen et al., 2001).



Differences in the observed intensities of the proteolytic banding patterns in the intra- and inter-stadium samples may indicate that some proteases are differentially expressed and/or exist in distinct isoforms with specific catalytic features. Supporting this hypothesis, quantitative differences in trypsin biosynthesis in the gut of *A. aegypti* larvae were previously reported (Borovsky and Meola, 2004). Such quantitative differences could correspond to our observation of differences in proteolytic band intensity in distinct larval instars. Additionally, the expression of functionally different proteases may be associated with distinct processes such as nutrition, development, and defense (Ho et al., 1992; Yano et al., 1995; Nakajima et al., 1997; Borovsky and Meola, 2004; Philip et al., 2007).

Comparison of protease activities from pupae and larvae show that both developmental stages express trypsin-like serine proteases that exhibit optimal activities at alkaline pH. However, the larval proteases exhibit a broader pH range of activity than that of the pupal enzymes. Enhanced resolution of proteolytic bands from pupa was obtained at pH 10.0; on the other hand, larval instars were resolved adequately at pH 7.5. Additionally, the composition of the proteolytic profile from pupae is qualitatively different from that exhibited by larval stadia. Although the pupa presents at least 11 main bands at pH 10.0, the larval stadia present only eight proteolytic bands. Also, the incubation time required for detecting proteolytic activities differs greatly between the stages as proteases of larval stadia can be detected after just 1 h of incubation, while detection of pupal protease activities requires 24 h of incubation. This observation could indicate the presence of highly active digestive proteases in larvae, the expression of which diminishes after larval-pupal ecdysis. It has been previously suggested (Yang and Davies, 1971) that highly active serine proteases at the larval stage may be necessary to accomplish the digestion of food particles at the low temperatures of the aquatic environment, and that the production of these enzymes would decrease upon the termination of active digestion, i.e., when larval-pupal ecdysis is complete. On the contrary, other authors have shown that the level of trypsin-like enzymes in the gut of pupae is similar to that found in the fourth instar larva (Borovsky and Meola, 2004). These differences between our work and these previous results could be due to: (i) the activities detected here are from whole larvae and pupae extracts, whereas the other authors used dissected guts; (ii) proteases detected in larval instars and pupae displayed different kinetics; (iii) the previous work was a quantitative comparison of total trypsin synthesis (active and inactive) in the gut of larvae and pupae, whereas in this study we detected only active proteases; and (iv) an endogenous serine protease inhibitor synthesized by pupae may be released when this stage is homogenized.

Despite notable differences in proteolytic profiles between pupae and larval stadia, common features, such as a band migrating at ~40 kDa, were present in both the four larval stadia and in the pupa stage. These results suggest that both developmental stages constitutively express a trypsin-like serine protease that could perform similar functions throughout the life cycle of the insect. Thermal stability experiments illustrated that despite decreases in enzymatic activity at 4 and 10°C, the proteolytic profile of the four larval instars could still be observed. Enzymatic activity increased between 37 and 60°C, and decreased at 85°C, indicating that serine proteases of *A. aegypti* larvae are well adapted to extreme temperature conditions. Similar results were described for serine proteases of *O. ovis* (Angulo-Valadez et al., 2007), and *Tenebrio molitor* (Elpidina et al., 2005; Tsybina et al., 2005).

Trypsin and chymotrypsin serine proteases have been identified in specific organs from different stages of *A. aegypti* (Yang and Davies, 1971, 1972; Terra and Ferreira,

1994; Noriega et al., 1996; Noriega and Wells, 1999; Borovsky and Meola, 2004); however, to our knowledge, the application of zymography to the biochemical characterization and comparative study of the expression of proteases from the whole extracts of this species has not been reported. Our findings demonstrate that zymographic analysis is a practical and reliable methodology that could be applied to study changes in the expression of active proteases in species that progress through several developmental stages during their life cycle. In addition, this method also allows: (i) the study of the effect of pH, temperature, and reaction time on the protease profile, (ii) the detection of protease isoforms, and (iii) the isolation of specific active proteases (Zhao and Russell, 2003; Cuervo et al., 2008). Finally, this methodology together with other protein identification methods, such as mass spectrometry, could be a powerful approach for the analysis of active forms of proteases compared to traditional biochemical methods (Zhao et al., 2004; De Jesus et al., 2009).

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Bruno Esquenazi and Rodrigo Mexas (Laboratório de Produção e Tratamento de Imagem-FIOCRUZ) for their valuable contributions.

### LITERATURE CITED

- Abraham EG, Pinto SB, Ghosh A, Vanlandingham DL, Budd A, Higgs S, Kafatos FC, Jacobs-Lorena M, Michel K. 2005. An immune-responsive serpin, SRPN6, mediates mosquito defense against malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16327–16332.
- Angulo-Valadez CE, Cepeda-Palacios R, Ascencio F, Jacquiet P, Dorchie P, Romero MJ, Khelifa RM. 2007. Proteolytic activity in salivary gland products of sheep bot fly (*Oestrus ovis*) larvae. *Vet Parasitol* 149:117–125.
- Borovsky D, Mahmood F. 1995. Feeding the mosquito *Aedes aegypti* with TMOF and its analogs; effect on trypsin biosynthesis and egg development. *Regul Pept* 57:273–281.
- Borovsky D, Meola SM. 2004. Biochemical and cytoimmunological evidence for the control of *Aedes aegypti* larval trypsin with Aea-TMOF. *Arch Insect Biochem Physiol* 55:124–139.
- Cho WL, Tsao SM, Hays AR, Walter R, Chen JS, Snigirevskaya ES, Raikhel AS. 1999. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *J Biol Chem* 274:13311–13321.
- Cuervo P, Mesquita-Rodrigues C, d'Avila Levy CM, Britto C, Pires FA, Gredilha R, Alves CR, De Jesus JB. 2008. Serine protease activities in *Oxysarcodexia thornax* (Walker) (Diptera: Sarcophagidae) first instar larva. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:504–506.
- de Lima-Camara TN, Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R. 2006. Frequency and spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica* 22:2079–2084.
- De Jesus JB, Cuervo P, Britto C, Sabóia-Vahia L, Silva-Filho FC, Borges-Veloso A, Petrópolis DB, Cupolillo E, Domont GB. 2009. Cysteine peptidase expression in *Trichomonas vaginalis* isolates displaying high and low virulence phenotypes. *J Proteome Res* 8:1555–1564.
- Elpidina EN, Tsybina TA, Dunaevsky YE, Belozersky MA, Zhuzhikov DP, Oppert B. 2005. A chymotrypsin-like proteinase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Biochimie* 87:771–779.
- Fazito do Vale V, Pereira MH, Gontijo NF. 2007. Midgut pH profile and protein digestion in the larvae of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Insect Physiol* 53:1151–1159.

- Graf R, Briegel H. 1989. The synthetic pathway of trypsin in the mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) and in vitro stimulation in isolated midguts. *Insect Biochem* 19:129–137.
- Graf R, Raikhel AS, Brown MR, Lea AO, Briegel H. 1986. Mosquito trypsin: immunocytochemical localization in the midgut of blood-fed *Aedes aegypti* (L.). *Cell Tissue Res* 245:19–27.
- Gong M, Shen B, Gu Y, Tian H, Ma L, Li X, Yang M, Hu Y, Sun Y, Hu X, Li J, Zhu C. 2005. Serine proteinase over-expression in relation to deltamethrin resistance in *Culex pipiens pallens*. *Arch Biochem Biophys* 438:53–62.
- Gubler DJ. 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 10:100–103.
- Han YS, Salazar CE, Reese-Stardy SR, Cornel A, Gorman MJ, Collins FH, Paskewitz SM. 1997. Cloning and characterization of a serine protease from the human malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* 6:385–395.
- Ho BC, Khoo HG, Chew LM, Wong KP, Ewert A. 1992. Food ingestion and digestive enzymes in larval *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 29:960–964.
- Honório NA, Silva C, Leite PJ, Gonçalves JM, Lounibos LP, Lourenço-de-Oliveira R. 2003. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:191–198.
- Kaur P, Ponniah M, Murhekar MV, Ramachandran V, Ramachandran R, Raju HK, Perumal V, Mishra AC, Gupte MD. 2008. Chikungunya outbreak, South India, 2006. *Emerg Infect Dis* 14:1623–1625.
- Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, de Filippis AM, Failloux AB. 2004. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98:43–54.
- Maciel-de-Freitas R, Neto RB, Gonçalves JM, Codeço CT, Lourenço-de-Oliveira R. 2006. Movement of dengue vectors between the human modified environment and an urban forest in Rio de Janeiro. *J Med Entomol* 43:1112–1120.
- Mahmood F, Borovsky D. 1992. Biosynthesis of trypsinlike and chymotrypsinlike enzymes in immature *Lutzomyia anthophora* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 29:489–495.
- Maidana NA, Yang HM. 2008. Describing the geographic spread of dengue disease by traveling waves. *Math Biosci* 215:64–77.
- Nakajima Y, Tsuji Y, Homma K, Natori S. 1997. A novel protease in the pupal yellow body of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). Its purification and cDNA cloning. *J Biol Chem* 272:23805–23810.
- Nauen R, Sorge D, Sterner A, Borovsky D. 2001. TMOF-like factor controls the biosynthesis of serine proteases in the larval gut of *Heliothis virescens*. *Arch Insect Biochem Physiol* 47:169–180.
- Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B, Xi Z, Megy K, Grabherr M, Ren Q, Zdobnov EM, Lobo NF, Campbell KS, Brown SE, Bonaldo MF, Zhu J, Sinkins SP, Hogenkamp DG, Amedeo P, Arensburger P, Atkinson PW, Bidwell S, Biedler J, Birney E, Bruggner RV, Costas J, Coy MR, Crabtree J, Crawford M, Debruyne B, Decaprio D, Eiglmeier K, Eisenstadt E, El-Dorry H, Gelbart WM, Gomes SL, Hammond M, Hannick LI, Hogan JR, Holmes MH, Jaffe D, Johnston JS, Kennedy RC, Koo H, Kravitz S, Kriventseva EV, Kulp D, Labutti K, Lee E, Li S, Lovin DD, Mao C, Mauceli E, Menck CF, Miller JR, Montgomery P, Mori A, Nascimento AL, Naveira HF, Nusbaum C, O'leary S, Orvis J, Perteua M, Quesneville H, Reidenbach KR, Rogers YH, Roth CW, Schneider JR, Schatz M, Shumway M, Stanke M, Stinson EO, Tubio JM, Vanzee JP, Verjovski-Almeida S, Werner D, White O, Wyder S, Zeng Q, Zhao Q, Zhao Y, Hill CA, Raikhel AS, Soares MB, Knudson DL, Lee NH, Galagan J, Salzberg SL, Paulsen IT, Dimopoulos G, Collins FH, Birren B, Fraser-Liggett CM, Severson DW. 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* 316:1718–1723.

- Nogueira RM, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. 2000. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. *Cad Saude Publica* 16:205–211.
- Noriega FG, Wells MA. 1999. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol* 45:613–620.
- Noriega FG, Wang XY, Pennington JE, Barillas-Mury CV, Wells MA. 1996. Early trypsin, a female-specific midgut protease in *Aedes aegypti*: isolation, aminoterminal sequence determination, and cloning and sequencing of the gene. *Insect Biochem Mol Biol* 26:119–126.
- Noriega FG, Edgar KA, Bechet R, Wells MA. 2002. Midgut exopeptidase activities in *Aedes aegypti* are induced by blood feeding. *J Insect Physiol* 48:205–212.
- Okuda K, Caroci A, Ribolla P, Marinotti O, de Bianchi AG, Bijovsky AT. 2005. Morphological and enzymatic analysis of the midgut of *Anopheles darlingi* during blood digestion. *J Insect Physiol* 51:769–776.
- PAHO. 2008. <http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue.htm>
- Philip JM, Fitches E, Harrison RL, Bonning B, Gatehouse JA. 2007. Characterisation of functional and insecticidal properties of a recombinant cathepsin L-like proteinase from flesh fly (*Sarcophaga peregrina*), which plays a role in differentiation of imaginal discs. *Insect Biochem Mol Biol* 37:589–600.
- Pires FA, Moya-Borja GE, Barreira JD, Pinho RT, Alves CR. 2007. The main proteinases in *Dermatobia hominis* second and third instars larvae are serine-proteinases. *Vet Parasitol* 145:326–331.
- Ríos-Velásquez CM, Codeço CT, Honório NA, Sabroza PS, Moresco M, Cunha IC, Levino A, Toledo LM, Luz SL. 2007. Distribution of dengue vectors in neighborhoods with different urbanization types of Manaus, state of Amazonas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:617–623.
- Rodrigues J, Agrawal N, Sharma A, Malhotra P, Adak T, Chauhan VS, Bhatnagar RK. 2007. Transcriptional analysis of an immune-responsive serine protease from Indian malarial vector, *Anopheles culicifacies*. *BMC Mol Biol* 8:33.
- Rosenfeld A, Vanderberg JP. 1998. Identification of electrophoretically separated proteases from midgut and hemolymph of adult *Anopheles stephensi* mosquitoes. *J Parasitol* 84:361–365.
- Shope R. 1991. Global climate change and infectious diseases. *Environ Health Perspect* 96:171–174.
- Tabouret G, Bret-Bennis L, Dorchies P, Jacquiet P. 2003. Serine protease activity in excretory-secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. *Vet Parasitol* 114:305–314.
- Terra WR, Ferreira C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp Biochem Physiol* 109:1–62.
- Troyo A, Calderón-Arguedas O, Fuller DO, Solano ME, Avendaño A, Arheart KL, Chadee DD, Beier JC. 2008. Seasonal profiles of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larval habitats in an urban area of Costa Rica with a history of mosquito control. *J Vector Ecol* 33:76–88.
- Tsybina TA, Dunaevsky YE, Belozersky MA, Zhuzhikov DP, Oppert B, Elpidina EN. 2005. Digestive proteinases of yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae: purification and characterization of a trypsin-like proteinase. *Biochemistry* 70:300–305.
- Vasilakis N, Weaver SC. 2008. The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res* 72:1–76.
- Vierstraete E, Cerstiaens A, Baggerman G, Van den Bergh G, De Loof A, Schoofs L. 2003. Proteomics in *Drosophila melanogaster*: first 2D database of larval hemolymph proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 304:831–838.
- WHO. 2008. <http://www.who.int/topics/dengue/en/>
- Wilder-Smith A, Gubler DJ. 2008. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. *Med Clin North Am* 92:1377–1390.

- Yang YJ, Davies DM. 1971. Trypsin and chymotrypsin during metamorphosis in *Aedes aegypti* and properties of the chymotrypsin. *J Insect Physiol* 17:117–131.
- Yang YJ, Davies DM. 1972. The effect of cations on chymotrypsin from *Aedes aegypti* larvae. *J Insect Physiol* 18:747–755.
- Yano T, Takahashi N, Kurata S, Natori S. 1995. Regulation of the expression of cathepsin B in *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) at the translational level during metamorphosis. *Eur J Biochem* 234:39–43.
- Zhao Z, Russell PJ. 2003. Trypsin activity assay in substrate-specific one- and two-dimensional gels: a powerful method to separate and characterize novel proteases in active form in biological samples. *Electrophoresis* 24:3284–3288.
- Zhao Z, Raftery MJ, Niu XM, Daja MM, Russell PJ. 2004. Application of in-gel protease assay in a biological sample: characterization and identification of urokinase-type plasminogen activator (uPA) in secreted proteins from a prostate cancer cell line PC-3. *Electrophoresis* 25:1142–1148.

## 5.2 - Artigo 2

Saboia-Vahia et al. *Parasites & Vectors* 2013, **6**:50  
<http://www.parasitesandvectors.com/content/6/1/50>



### RESEARCH

### Open Access

# Trypsin-like serine peptidase profiles in the egg, larval, and pupal stages of *Aedes albopictus*

Leonardo Saboia-Vahia<sup>1</sup>, André Borges-Veloso<sup>1</sup>, Camila Mesquita-Rodrigues<sup>1</sup>, Patricia Cuervo<sup>2</sup>, Geovane Dias-Lopes<sup>1</sup>, Constança Britto<sup>1</sup>, Ana Paula de Barros Silva<sup>1</sup> and Jose B De Jesus<sup>1,3\*</sup>

#### Abstract

**Background:** *Aedes albopictus*, a ubiquitous mosquito, is one of the main vectors of dengue and yellow fever, representing an important threat to public health worldwide. Peptidases play key roles in processes such as digestion, oogenesis, and metamorphosis of insects. However, most of the information on the proteolytic enzymes of mosquitoes is derived from insects in the adult stages and is often directed towards the understanding of blood digestion. The aim of this study was to investigate the expression of active peptidases from the preimaginal stages of *Ae. albopictus*.

**Methods:** *Ae. albopictus* eggs, larvae, and pupae were analyzed using zymography with substrate-SDS-PAGE. The pH, temperature and peptidase inhibitor sensitivity was evaluated. In addition, the proteolytic activities of larval instars were assayed using the fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-AMC.

**Results:** The proteolytic profile of the larval stage was composed of 8 bands ranging from 17 to 130 kDa. These enzymes displayed activity in a broad range of pH values, from 5.5 to 10.0. The enzymatic profile of the eggs was similar to that of the larvae, although the proteolytic bands of the eggs showed lower intensities. The pupal stage showed a complex proteolytic pattern, with at least 6 bands with apparent molecular masses ranging from 30 to 150 kDa and optimal activity at pH 7.5. Peptidases from larval instars were active from 10°C to 60°C, with optimal activity at temperatures between 37°C and 50°C. The proteolytic profile of both the larval and pupal stages was inhibited by phenyl-methyl sulfonyl-fluoride (PMSF) and Na-Tosyl L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride (TLCK), indicating that the main peptidases expressed during these developmental stages are trypsin-like serine peptidases.

**Conclusion:** The preimaginal stages of *Ae. albopictus* exhibited a complex profile of trypsin-like serine peptidase activities. A comparative analysis of the active peptidase profiles revealed differential expression of trypsin-like isoforms among the preimaginal stages, suggesting that some of these enzymes are stage specific. Additionally, a comparison of the peptidase expression between larvae from eggs collected in the natural environment and larvae obtained from the eggs of female mosquitoes maintained in colonies for a long period of time demonstrated that the proteolytic profile is invariable under such conditions.

**Keywords:** *Aedes albopictus*, Culicidae, Preimaginal stages, Trypsin-like serine peptidases, Peptidases, Zymography

\* Correspondence: [jbj@ioc.fiocruz.br](mailto:jbj@ioc.fiocruz.br)

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Engenharia de Biosistemas, Universidade Federal de São João Del Rey, Minas Gerais, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2013 Saboia-Vahia et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## Background

During the last three decades, the mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* has spread from Southeast Asia to Africa, the Middle East, Europe and America. This species has demonstrated a strong ecological plasticity that allows for rapid adaptation to diversified habitats, including urban environments [1-6]. Female oviposition occurs in both natural conditions and in artificial containers, and it has been reported that *Ae. albopictus* successfully compete against other container-breeding mosquitoes, including *Ae. aegypti* [5,7]. *Ae. albopictus* is a competent vector for at least 22 arboviruses and plays significant role in the transmission of all four serotypes of the dengue virus as well as in the transmission of nematodes, such as *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* [5,8-12].

The secretion of serine peptidases responsible for the hydrolysis of nutrients from food was first reported for *Ae. aegypti* in the early 1970s [13]. Furthermore, serine peptidases have been implicated in the regulation of immunity in *Anopheles* sp. [14-16]. Within the serine peptidase family, trypsin and chymotrypsin are the most abundant digestive enzymes in the midgut of several insect species [17]. These enzymes are characterized as having a His-Asp-Ser catalytic triad and the same basic tridimensional structure, consisting of two six-stranded  $\beta$ -barrels that contain the active site, the substrate recognition region and the zymogen activation domain [18]. Despite the high similarity of serine peptidases among mosquito species, each enzyme has a unique set of accessory catalytic residues that are thought to be important for determining substrate specificity [19,20].

Previous studies have reported the proteolytic activity of both trypsin and chymotrypsin in the peritrophic matrix and gut of *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* and *Culex quinquefasciatus* larvae [21-23]. These enzymes have also been associated with the digestion of nutrients by larvae of other diptera species, such as *Dermatobia hominis*, *Lutzomyia longipalpis*, *Musca domestica*, and *Oxysarcodexia thornax* [24-27]. In addition, trypsins secreted in the lumen of the gut have been implicated in the process of pathogen establishment in vector mosquitoes. For example, trypsins secreted by the mosquito for food digestion are involved in the activation of the pro-enzyme form of a chitinase from the *Plasmodium* species [28-32]. Moreover, arboviruses such as the La Crosse virus (LACV; Bunyaviridae), blue tongue virus (BTV; Reoviridae) and dengue virus serotype 2 (DENV-2, Flaviviridae) use vector midgut peptidases for the proteolytic processing of viral proteins to increase viral infectivity [33-35].

The current study aims to characterize and compare the serine-peptidase proteolytic profiles of the egg, four larval instars and the pupal stage of *Ae. albopictus* using substrate SDS-PAGE zymographic analysis.

## Methods

### Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma Chemical Company (USA). Stock solutions of N $\alpha$ -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride (TLCK, 100 mM) and N-*p*-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK, 100 mM) were prepared in methanol. Phenylmethyl sulfonyl-fluoride (PMSE, 250 mM) was diluted in isopropanol, whereas 1,10-phenanthroline (200 mM) and pepstatin A (1 mg/ml) were dissolved in ethanol. *Trans*-epoxysuccinyl L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64, 10  $\mu$ M) was prepared in water. The stock solution of *Z*-carbobenzoxy-L-phenylalanyl-L-arginine-(7-amino-4-methylcoumarin) [*Z*-Phe-Arg-AMC] (3 mM) was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO).

### Insects

Pre-imaginal stages (eggs, larvae and pupae) of *Ae. albopictus* used in the present study came from two sources: (i) a closed continuous colony (Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro) originated from insects captured in the Brazilian state of Rio de Janeiro, and (ii) F1 generation of larvae hatched from eggs collected by ovitraps in the natural environment in endemic areas of Rio de Janeiro. In the closed colony, eggs (two days old), larvae (first larval instar, L1; second larval instar, L2; third larval instar, L3; and fourth larval instar, L4) and pupae (16–20 h old) were reared at  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  under  $80 \pm 10\%$  relative humidity, with a photoperiod of 12:12 h (LD). The larvae were kept in plastic basins containing dechlorinated water and were fed with fish food (Tetramin<sup>®</sup>). The F1 generation of larvae hatched from eggs collected by ovitraps in the natural environment in endemic areas of Rio de Janeiro was used to compare with larvae obtained from the eggs of female mosquitoes maintained for a long period of time in the closed continuous colony. The ovitrap consist in a plastic vase with a wooden oviposition paddle and hay infusion as described previously [36]. The paddles with eggs from the field were placed in plastic basins to hatch and the larvae were reared up until the fourth instar for identification using the key by Consoli & Lourenço-de-Oliveira [37]. The L4 larvae were separated from the others and reared up until imaginal stages for F1 eggs collection. F1 larvae were reared in the same conditions as mentioned above.

### Protein extraction and quantification

The larvae and pupa of *Ae. albopictus* were washed twice in PBS buffer (pH 7.2). Then, they were mechanically disrupted in lysis buffer containing 10% glycerol, 0.6% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl and 150 mM NaCl. Protein was extracted from the eggs by five cycles

of freezing and thawing in liquid nitrogen, followed by mechanical disruption in the same lysis buffer. The extracts were then centrifuged at  $14000 \times g$  for 10 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$  to remove insoluble material. Total protein was quantified using a commercial kit (Pierce Protein assay), according to the manufacturer's instructions.

#### Zymographic assays

To investigate the proteolytic profile of total extracts, 30  $\mu\text{g}$  of protein were subject to electrophoresis (110 V at  $4^{\circ}\text{C}$ ) on 12% SDS-PAGE gels copolymerized with 0.1% porcine gelatin. After electrophoresis, the resulting gels were washed twice for 30 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$  in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 3.5 or 5.5) containing 2.5% Triton X-100, or in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5 or 10) containing 2.5% Triton X-100. Proteolytic activity was detected after incubating the gels at  $37^{\circ}\text{C}$  in reaction buffer containing 0.1 M sodium acetate (pH 3.5 or 5.5), or in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5 or 10). Gels loaded with egg protein were incubated for 120 minutes, whereas gels loaded with larvae protein were incubated for 30, 60, 120 or 180 minutes. Pupal enzymes were incubated for 3, 6, 12, 24, 36 or 48 h. Bands of gelatin degradation were visualized by staining the gels with 0.25% Coomassie blue R-250 and subsequent destaining with 10 % acetic acid. The molecular mass of the proteases was calculated by comparison with the mobility of a commercial molecular mass standard. All results are derived from five independent experiments carried out in triplicate.

#### Effect of temperature on the proteolytic activities of larvae

The thermal sensitivity of larval peptidase activities was evaluated by incubating gels at  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $10^{\circ}\text{C}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $50^{\circ}\text{C}$ , and  $60^{\circ}\text{C}$  in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5). Prior to gel electrophoresis, the protease extracts were incubated until they reached the proper temperature for the assay. In addition, after electrophoresis, the gels were incubated in reaction buffer that was adjusted to each temperature.

#### Zymographic analysis of peptidase profiles of larvae from eggs collected from the natural environment vs. larvae from eggs of a colony maintained for a long period

For this assay, two different types of *Ae. albopictus* larvae were used: (i) larvae from eggs collected in the natural environment in endemic areas of Rio de Janeiro and (ii) larvae obtained from the eggs of female mosquitoes maintained for a long period of time in a closed continuous colony. Larvae hatched from both types of eggs (i and ii) were prepared for zymography as previously described.

#### Protease inhibition assays

Larvae and pupa homogenates were pre-incubated (before electrophoresis) for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$  with one of the following peptidase inhibitors: 10  $\mu\text{M}$  E-64, 1 mM PMSE, 100  $\mu\text{M}$  TLCK, 100  $\mu\text{M}$  TPCK, 10  $\mu\text{M}$  pepstatin-A or 10 mM 1,10-phenanthroline. After electrophoresis, each inhibitor, at the same concentration, was also added to the reaction buffer. Peptidase activities were then resolved as described previously.

#### In-solution enzymatic assays

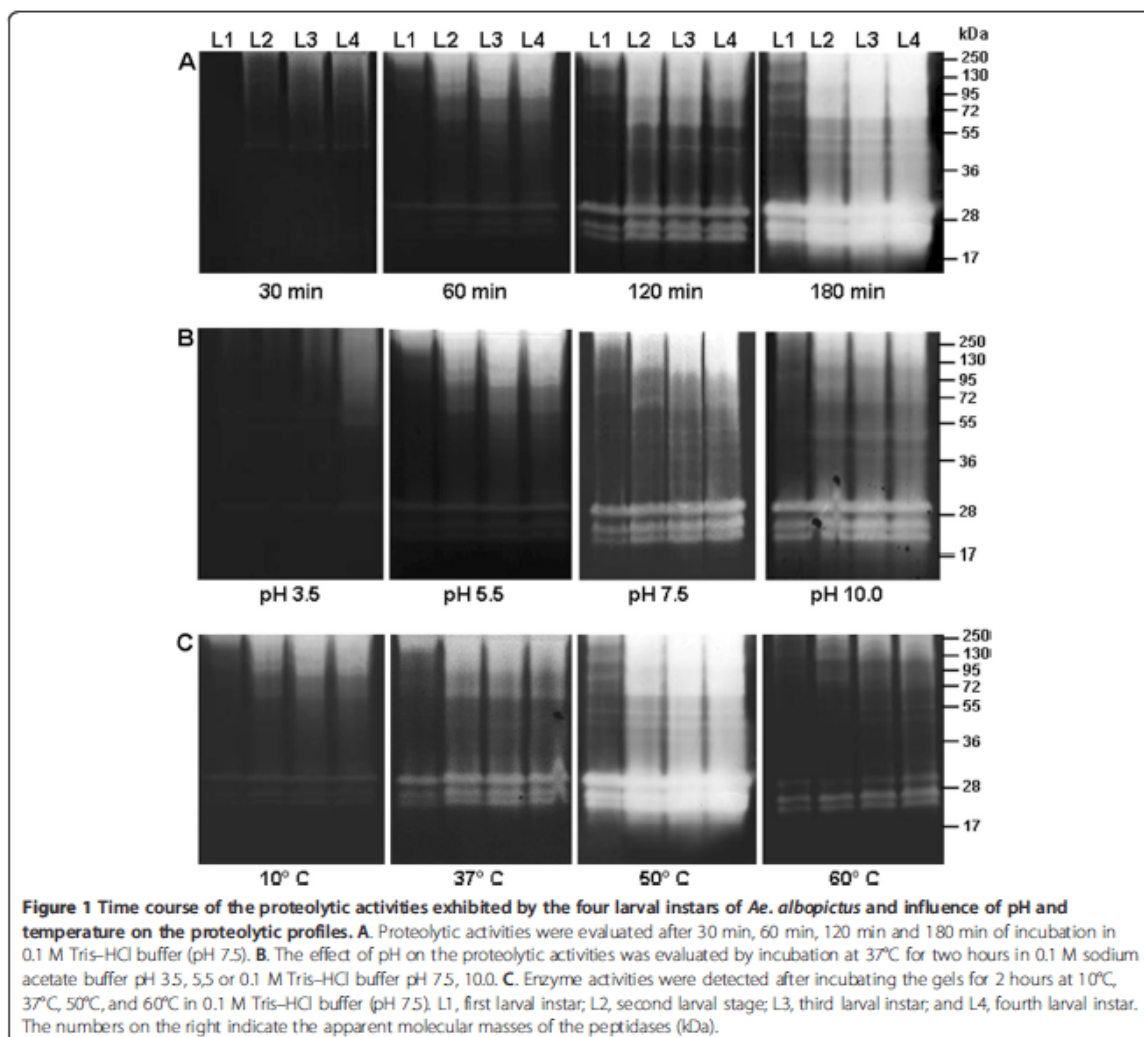
Peptidase activity from larval homogenates was determined by in-solution assays using the fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-AMC in the presence or absence of TLCK. One hundred micromolar of substrate was used as a working solution for each assay. The reactions were initiated by diluting 10  $\mu\text{g}$  of protein from the larvae of each instar in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5). The fluorescence intensity was measured every 5 min during 60 min by spectrophotofluorometry (SpectraMax Gemini XPS, Molecular Devices, CA) using excitation and emission wavelengths of 380 and 460 nm, respectively. All assays were performed at  $37^{\circ}\text{C}$  and pH 7.5. Controls lacking either the enzyme or the substrate were also included. All results are derived from three independent experiments performed in triplicate.

## Results

#### Time course of proteolytic activities from larval instars and influence of pH and temperature on the zymographic profile

The zymographic profile from L1, L2, L3 and L4 larval instars was analyzed after 30, 60, 120 and 180 minutes of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  and pH 7.5 to evaluate the influence of time on their enzymatic activities (Figure 1A). We found that the intensity of proteolytic activities increased progressively from 30 to 180 minutes of incubation. The proteolytic profile was composed of at least eight bands ranging in size from 17 to 130 kDa. The influence of pH on the proteolytic activities of larval instars was evaluated after incubation of the gels for two hours in different reaction buffers ranging from pH 3.5 to 10 (Figure 1B). Although enzymatic activities were detected at all pH condition, the intensity of peptidase activities was reduced at pH 3.5 and 5.5. The thermal sensitivity of peptidases from larval homogenates was measured at pH 7.5 and temperatures of  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $10^{\circ}\text{C}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $50^{\circ}\text{C}$  and  $60^{\circ}\text{C}$ . At  $4^{\circ}\text{C}$  little activity was observed (data not shown) whereas at  $10^{\circ}\text{C}$  the proteolytic activities were less intense compared to those visualized at the standard temperature  $37^{\circ}\text{C}$ . At  $50^{\circ}\text{C}$ , the enzymatic activities were strongly increased to the extent that some of the proteolytic halos overlapped in the L2, L3 and L4 instars. Conversely, some bands between 40 kDa and





130 kDa were more visible at 50°C in the L1 instar. At 60°C, the enzymatic activities were reduced compared to the standard condition (Figure 1C).

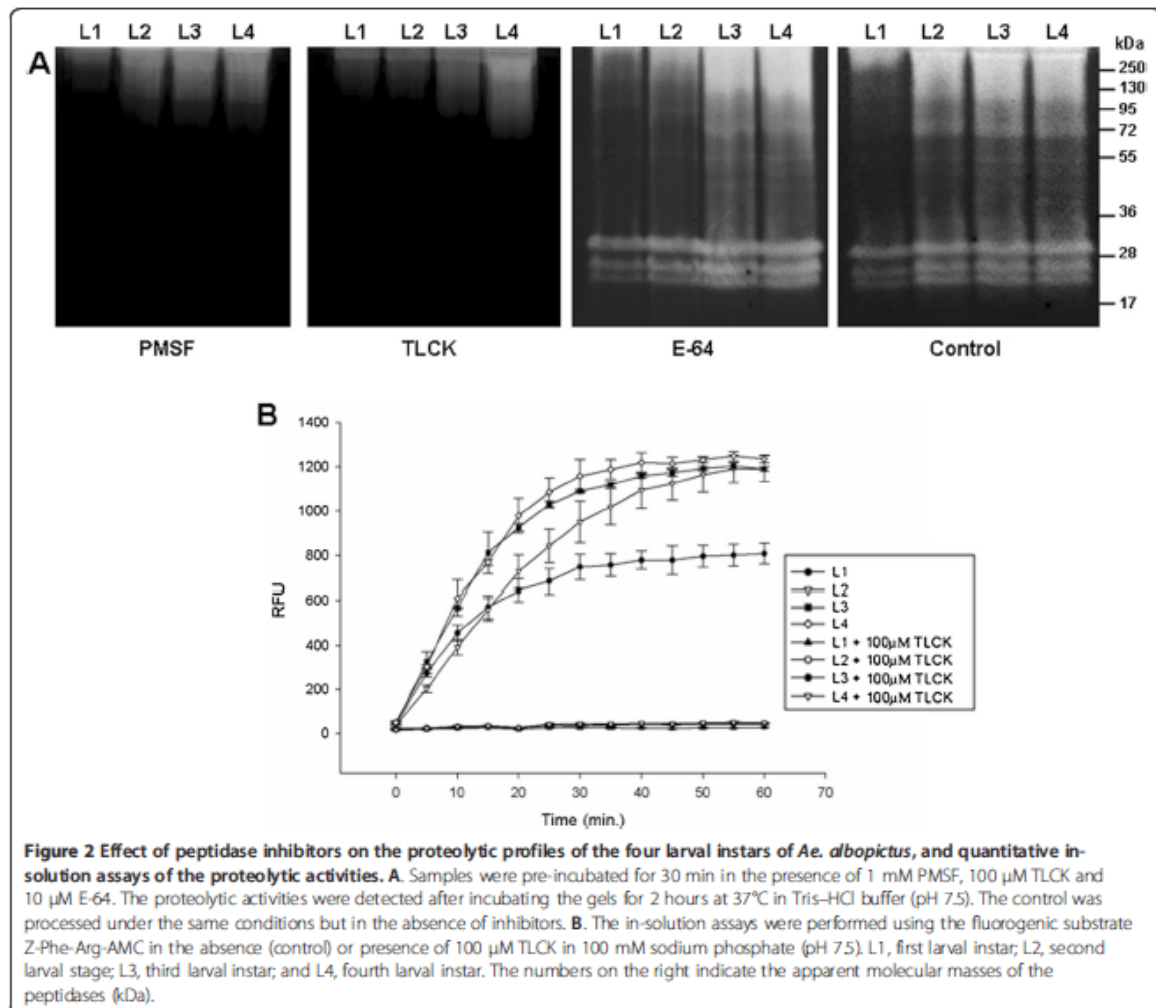
#### Peptidase inhibition assays in larval instars and in-solution detection of proteolytic activity

The proteolytic activities of all larval instars were inhibited by 1 mM PMSF and 100 μM TLCK (Figure 2A). The zymographic profile was not affected by 10 μM E-64 (Figure 2A), 100 μM TPCK, 10 μM pepstatin A or 10 mM 1,10-phenanthroline (data not shown). Protein extracts from larval instars were used to determine in-solution peptidase activities using the fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-AMC in the presence or absence of TLCK, a specific inhibitor of trypsin-like serine

peptidases. The enzymatic activities increased progressively from L1 to L4, and each instar displayed different velocities of substrate degradation. All enzymatic activities were strongly inhibited by TLCK (Figure 2B).

#### Comparative analysis of the peptidase profiles of larvae from eggs collected from the natural environment vs. larvae from eggs collected from a colony maintained for a long period of time

To evaluate the stability of the peptidase activities detected by zymography, the proteolytic profile from larval instars was verified by comparing the enzymatic activities of larvae from eggs collected in the natural environment and larvae obtained from eggs collected



**Figure 2 Effect of peptidase inhibitors on the proteolytic profiles of the four larval instars of *Ae. albopictus*, and quantitative in-solution assays of the proteolytic activities.** **A.** Samples were pre-incubated for 30 min in the presence of 1 mM PMSF, 100 µM TLCK and 10 µM E-64. The proteolytic activities were detected after incubating the gels for 2 hours at 37°C in Tris-HCl buffer (pH 7.5). The control was processed under the same conditions but in the absence of inhibitors. **B.** The in-solution assays were performed using the fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-AMC in the absence (control) or presence of 100 µM TLCK in 100 mM sodium phosphate (pH 7.5). L1, first larval instar; L2, second larval stage; L3, third larval instar; and L4, fourth larval instar. The numbers on the right indicate the apparent molecular masses of the peptidases (kDa).

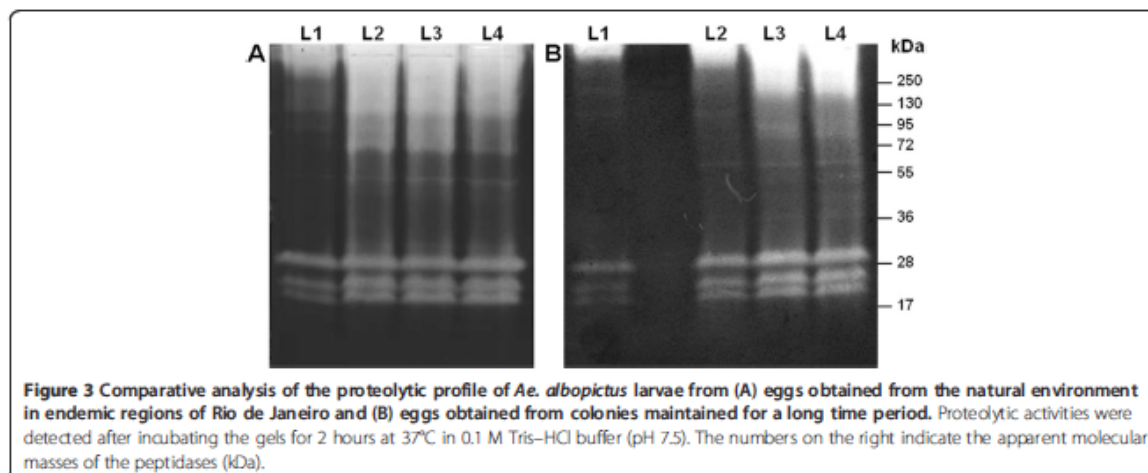
from female mosquitoes maintained in colonies for a long period of time. The larval instars obtained from eggs under both conditions exhibited similar proteolytic profiles (Figure 3).

#### Comparison of peptidase profiles from eggs and larval instars

The proteolytic profile displayed by eggs exhibited bands between 17 and 130 kDa. The intensity of the proteolytic activities from eggs was lower than those from larvae; however, bands ranging from 72 to 130 kDa were better visualized in the egg extracts compared to the larval extracts. The high molecular weight bands were not well resolved in the proteolytic profiles of the larval instars, likely due to the extremely high enzymatic activity in this area (Figure 4).

#### Time course of proteolytic activities from the pupal stage and influence of pH on the zymographic profile

Proteolytic activity from the pupal stage was assessed after 3, 6, 12, 24, 36 and 48 h of incubation at 37°C and pH 7.5. Enzymatic activity was not detected after 3, 6 or 12 h of incubation (data not shown and Figure 5A). In contrast, the intensity of the proteolytic activity increased progressively from 24 to 48 h (Figure 5A). The peptidase profile was well-resolved after 36 h of reaction, with nearly six evident bands of activity detected between 30 and 200 kDa. The proteolytic profile from the pupal stage was analyzed after 36 h of incubation in different buffers at pH 3.5, 5.5, 7.5 and 10 (Figure 5B). No enzymatic activity was observed at pH 3.5, while weak proteolytic activity was detected at pH 5.5. The peptidase profile was best resolved at pH 7.5. At pH 10, the proteolytic halos of gelatin degradation overlapped,



making it impossible to visualize defined bands, except for one band migrating at 30 kDa.

#### Peptidase inhibition assays in the pupal stage

The enzymatic profile exhibited by pupal homogenates was strongly inhibited by 1 mM PMSF and 100  $\mu$ M TLCK (Figure 6). Proteolytic activities were not affected by 10  $\mu$ M E-64, 100  $\mu$ M TPCK, 10  $\mu$ M pepstatin A, or 10 mM 1,10-phenantroline (data not shown).

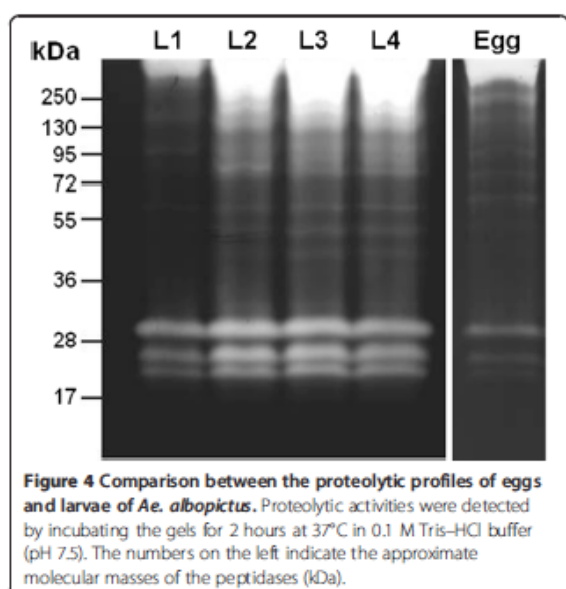
#### Discussion

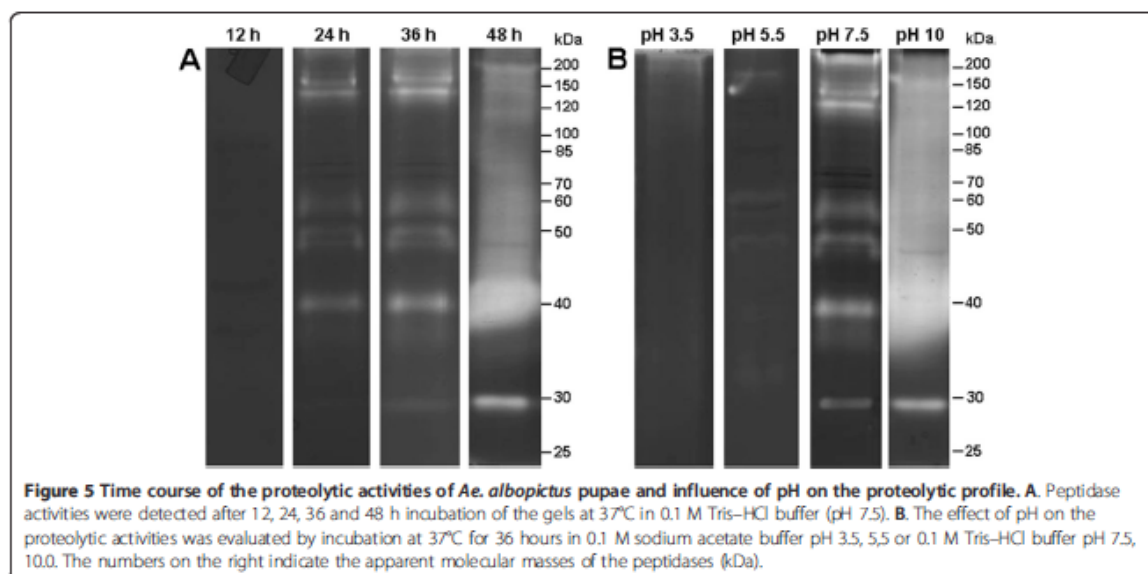
Most of the information on the proteolytic enzymes of mosquitoes is comprised from data collected at the adult stages and is often directed towards the understanding of

blood digestion [38-40]. The aim of this study was to investigate the expression of active peptidases from the preimaginal stages of *Ae. albopictus*. To this end, we characterized the proteolytic profile from whole extracts of eggs, larvae and pupae using SDS-substrate gel. The peptidase activities were dependent on the time, pH and temperature of incubation. The proteolytic profile from all of the analyzed stages was composed primarily of trypsin-like serine peptidases, and each stage exhibited a specific and complex profile of these enzymes. Additionally, a comparison of the peptidase expression between the larvae from eggs collected from a natural environment and larvae obtained from eggs of female mosquitoes maintained in colonies for a long period of time showed that the proteolytic profile is invariable under these conditions.

Although the genome of *Ae. albopictus* has not yet been completely sequenced, the expression of multiples genes coding for trypsin-like serine peptidases has been reported in the genome of different mosquitoes species, such as *Anopheles gambiae*, *Ae. aegypti* and *Culex quinquefasciatus*, accounting for 345, 380 and 403 putative genes, respectively [41-44]. Compared to other diptera species, such as *Drosophila melanogaster*, which has 260 genes encoding trypsin-like serine peptidases, the mosquito genome exhibits a larger genetic repertoire of these genes, likely due to gene expansion events [45,46]. The maintenance of a variety of trypsin-like coding genes may be related to their key role in numerous physiological processes of the insect, such as digestion, immunity, reproduction, development, signal transduction and wound healing [47-52]. However, the characterization of active trypsin-like peptidases is scarce, and little is known about the biochemical nature of these enzymes in the preimaginal stages.

In the present study, we observed that *Ae. albopictus* larval instars displayed a clear proteolytic pattern that



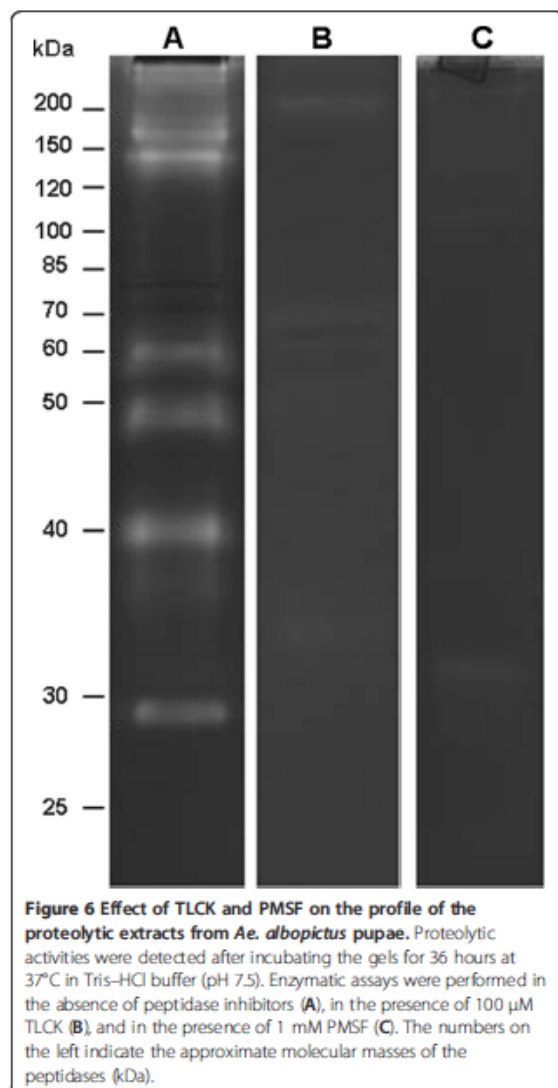


was detected after 2 hours of reaction. In contrast, it has been reported that *Ae. aegypti* exhibits a zymographic profile after only 1 hour of reaction [22]. These results suggest that the larval peptidases in these species present (i) distinct kinetic activities or (ii) differential quantitative expression. Such differences could also be related to species-specific nutritional characteristics of the larvae. In this regard, the larvae of *Ae. albopictus* feed more slowly and eat smaller amounts of nutrients at one time compared to the larvae of *Ae. aegypti* [21]. This slower intake of food could lead to slower or reduced activation/expression of peptidases involved in nutrient digestion. Post-feeding induction of peptidase expression has been observed, particularly in adults of *Ae. aegypti* [53-55]. Here, zymographic analyses revealed that the expression of peptidases increases at each larval instar. This result was corroborated by the quantitative in-solution assays using the fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-AMC. Quantitative differential expression in larval instars has also been observed by other authors, specifically in the intestine, using alternative methods [21,39,56]. In the present study, the proteolytic classes of the enzymes were characterized using different inhibitors, revealing that peptidases from the four larval instars were inhibited by PMSE, an inhibitor of trypsin and chymotrypsin, and TLCK, an inhibitor of trypsin. These results indicate that the enzymes were predominantly trypsin-like serine peptidases in larval instars of *Ae. albopictus*, which is in agreement with previous descriptions that suggest the occurrence of trypsin in other species from diptera [13,21,24,25,57]. Although no other peptidase classes were detected under the conditions used here, we cannot rule out the possibility that

other classes of peptidases could be detected under different experimental conditions.

The four larval instars of *Ae. albopictus* showed proteolytic activity in a broad range of pH values, with optimal activity between pH 7.5 and 10. Accordingly, the larvae of *Ae. aegypti*, *An. stephensi* and *Cx. quinquefasciatus* displayed high enzymatic activities at an alkaline pH [22,23,58]. These strong proteolytic activities may be associated with larval nutrition because these stages are highly detritivorous and need to eat large amounts of food to obtain their basic nutrients. Indeed, the main peptidases expressed by larvae are thought to be involved in the processing of nutrients and have optimal activity at an alkaline pH [13,58]. In addition, we demonstrated that larval instars exhibit a complex profile of active peptidases composed by at least eight bands of trypsin-like serine peptidases. These results are in agreement with a recent transcriptome study showing that 12 serine peptidases-like genes were preferential expressed in the larvae of *Ae. aegypti* [39,59]. The broad spectrum of enzymatic activities detected in the larvae of *Ae. albopictus* could be related to their survival in aquatic environments that are lacking nutrients [13,58].

In addition, the zymographic patterns of larvae from *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* [22] share a band of proteolytic activity with the same intensity at approximately 28 kDa. Additionally, several bands between 36 and 72 kDa observed in the enzymatic profile of *Ae. albopictus* match those of *Ae. aegypti*, although with different intensities. These data could indicate that (i) the expression of genes coding for some active trypsin-like serine peptidases isoforms is conserved among *Aedes*



species and (ii) that other isoforms are species-specific. In fact, this conservation is expected given the importance of these enzymes for the life cycle of these mosquitoes [21,56,59]. On the other hand, bands of proteolytic activities with different intensities within the same stage of development, among distinct stages and between the two species may indicate that some genes coding for trypsin are differentially expressed or that some isoforms with specific catalytic features are differentially regulated during the life cycle of the insect. Complex mechanisms regulating the expression of trypsin in insects have been previously described [39,53-56,60].

We next sought to investigate the stability of the proteolytic profile in larvae obtained from the eggs of

females reared in a colony for long time periods compared with larvae hatched from eggs collected in the natural environment. Our results demonstrate that the enzymatic pattern did not change, suggesting that the qualitative expression of peptidases is stable under the experimental conditions used here. In other words, such stability suggests that the genes coding for these enzymes could be under strong selective pressure so that the proteolytic profile is maintained in both natural and colony conditions. These results indicate that inbreeding during prolonged maintenance of the colony does not alter the expression of the genes coding for the trypsin-like serine peptidases detected in zymographic assays of the larvae. In addition, such observations suggest that trypsin-like serine peptidases of *Ae. albopictus* could be constitutively expressed during all developmental stages.

The proteolytic profile of *Ae. albopictus* eggs was similar to that exhibited by the larval instars, specifically the L1 instar, in the number and intensity of bands. Three bands of enzymatic activity between 17 and 28 kDa were observed in both the eggs and larvae, although they displayed different intensities. The similarity of the active peptidase profile observed between the eggs and L1 may be explained by the fact that the eggs were assayed at the final stage of maturation when the embryo is very similar to the young L1. In addition, the proteolytic activities from the eggs likely had lower intensity because before they hatched, the larvae were lethargic, presenting low metabolism inside the eggs.

The pupal stage exhibited a complex and stage-specific proteolytic profile, composed of six bands of activity. Compared to the larval profile, which showed activities in a wide pH range (3.5 – 10), the pupal stage presented activities exclusively between pH 7.5 and 10. Peptidases from the larval extracts could be observed after 2 hours of incubation, whereas peptidases from the pupal stage were detected only after 24 hours of reaction. These observations indicate a reduction in the expression of active digestive peptidases after the last larval molt [13]. However, although pupae do not feed, serine peptidase activities could be related to the proteolysis of the remaining larval tissue during metamorphosis. In support of this idea, in *Sarcophaga peregrina*, a 26 kDa trypsin protein was isolated from the corpus luteum, an organ that develops temporarily in the pupae and serves to disintegrate the gut of immature stages and reshape it to form the adult insect's gut [50,61-63].

The effect of temperature on trypsin-like serine peptidase activities from larvae was also tested. When compared to the control condition (37°C), the proteolytic activities of all larval instars were susceptible to low temperatures (4°C and 10°C) and highly stimulated at high temperatures (50°C). Although enzymatic activity decayed at 60°C, a clear profile could still be observed at

this temperature. The strong decrease of proteolytic activity could be due to the thermal denaturation of the enzymes. Similar results were described for trypsin and chymotrypsin from the larvae of *Tenebrio molitor* [64,65] and for serine peptidases from *Oestrus ovis* [66] and *Ae. aegypti* [22]. Because temperature is one of the most important environmental conditions for sustaining life on earth, the adaptation of an organism to extreme environments requires the optimization of its enzymatic repertoire. In this sense, the investigation of thermostable proteins, which are highly conserved in phylogenetically related groups of organisms, could help to identify changes in amino acid sequences that could be associated with thermal adaptation [67]. Because *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* are related species that originated from different environments, a detailed study comparing the sequence and structure of the trypsin isoforms could provide important information on the molecular basis of the thermal stability of these enzymes.

## Conclusion

The zymographic profiles of the preimaginal stages of *Ae. albopictus* are composed of a complex combination of trypsin-like serine peptidase activities that exhibit stage-specific characteristics. A comparison of the proteolytic activities during different developmental stages allowed for the detection of both qualitative and quantitative differences in trypsin activities, indicating that the serine peptidases are expressed in a stage-specific manner. In addition, we demonstrate that the proteolytic profile in larval instars is stable because larvae from the natural environment and larvae from a colony exhibited identical trypsin-like peptidase patterns. Such a phenotypic characteristic could be exploited for the characterization of other Culicidae insects.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

JB, LSV and PC designed the study. LSV, ABV, CMR, APB and GDL performed the experimental work. LSV, ABV, CMR, PC and JB analyzed the data and prepared the manuscript, with critical input from CB. All of the authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

This work was supported by FAPEMIG (APQ-02093-09), FIOCRUZ-IOC, CNPq and CAPES. We thank Prof. Dr. Nildimar Honorio (Laboratório de Transmissores de Hematozoários of the Instituto Oswaldo Cruz) for kindly providing the insects.

## Author details

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>2</sup>Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>3</sup>Departamento de Engenharia de Biosistemas, Universidade Federal de São João Del Rey, Minas Gerais, Brazil.

Received: 10 October 2012 Accepted: 18 February 2013

Published: 27 February 2013

## References

- Gilotra SK, Rozeboom LE, Bhattacharya NC: Observations on possible competitive displacement between populations of *Aedes aegypti* Linnaeus and *Aedes albopictus* Skuse in Calcutta. *Bull Org Mond Santé* 1967, **37**:437-446.
- O'Meara CF, Evans LF Jr, Gettman AD, Cuda JP: Spread of *Aedes albopictus* and decline of *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) in Florida. *J Med Entomol* 1995, **32**:554-562.
- Schreiber ET, Cuda JP: Evaluation of public information packets for source reduction in three socioeconomic areas of Tampa, Florida. *J Am Mosq Control Assoc* 1994, **10**:154-162.
- Forattini OP, Marques GR, Kakitani I, de Brito M, Sallum MA: Epidemiologic significance of *Aedes albopictus* breeding places in bromeliads. *Rev Saude Publica* 1998, **32**:186-188.
- Gratz NG: Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol* 2004, **18**:215-227.
- Dieng H, Saifur GMR, Hassan AA, Salmah MRC, Boots M, Satho T, Jaal Z, AbuBakar S: Indoor breeding of *Aedes albopictus* in northern peninsular Malaysia and its potential epidemiological implications. *PLoS One* 2010, **5**:e11790.
- Juliano SA: Species introduction and replacement among mosquitoes: interspecific resource competition or apparent competition. *Ecology* 1998, **79**:255-268.
- Cancrini G, Romi R, Gabrielli S, Toma L, di Paolo M, Scaramozzino P: First finding of *Dirofilaria repens* in a natural population of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol* 2003, **17**:448-451.
- Delatte H, Desvars A, Bouëtard A, Bord S, Gimonneau G, Vourc'h G, Fontenille D: Blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*, a vector of Chikungunya on La Réunion. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010, **10**:249-259.
- Genchi C, Rinaldi L, Mortarino M, Genchi M, Cringoli G: Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Vet Parasitol* 2009, **163**:286-292.
- Samuel PP, Krishnamoorthi R, Hamzakova KK, Aggarwal CS: Entomological investigations on chikungunya outbreak in the Lakshadweep islands, Indian Ocean. *Indian J Med Res* 2009, **129**:442-445.
- Paupy C, Ollomo B, Kamgang B, Moutailler S, Rousset D, Demanou M, Hervé JP, Leiry E, Simard F: Comparative role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the emergence of dengue and chikungunya in central Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010, **10**:259-266.
- Yang YJ, Davies D: Trypsin and chymotrypsin during metamorphosis in *Aedes aegypti* and properties of the chymotrypsin. *J Insect Physiol* 1971, **17**:117-131.
- Volz J, Osta MA, Kafatos FC, Müller HM: The roles of two clip domains serine proteases in innate immune responses of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *J Biol Chem* 2005, **280**:40161-40168.
- Xu W, Huang FS, Hao HX, Duan JH, Qiu ZW: Two serine proteases from *Anopheles dirus* haemocytes exhibit changes in transcript abundance after infection of an incompatible rodent malaria parasite, *Plasmodium yoelii*. *Vet Parasitol* 2006, **139**:93-101.
- Rodrigues J, Agrawal N, Sharma A, Malhotra P, Adak T, Chauhan VS, Bhatnagar RK: Transcriptional analysis of an immune-responsive serine protease from Indian malarial vector, *Anopheles culicifacies*. *BMC Mol Biol* 2007, **8**:33.
- Terra WR, Ferreira C: Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1994, **109**:1-62.
- Blow DM: The tortuous story of Asp...His...Ser: Structural analysis of  $\alpha$ -chymotrypsin. *Trends Biochem Sci* 1997, **22**:405-408.
- Borovsky D: Biosynthesis and control of mosquito gut proteases. *IJBBMB Life* 2003, **55**:435-441.
- Hedstrom L: Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* 2002, **102**:4501-4524.
- Ho BC, Khoo HG, Chew LM, Wong KP, Ewert A: Food ingestion and digestive enzymes in larval *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 1992, **29**:960-964.
- Mesquita-Rodrigues C, Saboia-Vahia L, Cuervo P, D'Ávila-Lewy CM, Honorio NA, Domont GB, de Jesus JB: Expression of trypsin-like serine peptidases in preimaginal stages of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Arch Insect Biochem Physiol* 2011, **76**:223-235.
- Borges-Veloso A, Saboia-Vahia L, Cuervo P, Pires RC, Britto C, Fernandes N, D'Ávila-Lewy CM, De Jesus JB: Proteolytic profiling and comparative analyses of active trypsin-like serine peptidases in preimaginal stages of *Culex quinquefasciatus*. *Parasit Vectors* 2012, **5**:123.

24. Pires FA, Moya-Borja GE, Barreira JD, Pinho RT, Alves CR: The main proteinases in *Dermatobia hominis* second and third instars larvae are serine-proteinases. *Vet Parasitol* 2007, **145**:326-331.
25. Fazito-do-Vale V, Pereira MH, Gontijo NF: Midgut pH profile and protein digestion in the larvae of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Insect Physiol* 2007, **53**:1151-1159.
26. Tamaki FK, Padilha MH, Pimentel AC, Ribeiro AF, Terra WR: Properties and secretory mechanism of *Musca domestica* digestive chymotrypsin and its relation with *Drosophila melanogaster* homologs. *Insect Biochem Mol Biol* 2012, **42**:482-490.
27. Cuervo P, Mesquita-Rodrigues C, D'Ávila-Levy CM, Britto C, Pires FA, Gredilha R, Alves CR, Jesus JB: Serine protease activities in *Oxysarcodexia thomax* (Walker) (Diptera: Sarcophagidae) first instar larva. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008, **103**:504-506.
28. Shahabuddin M, Toyoshima T, Aikawa M, Kaslow DC: Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**:4266-4270.
29. Shahabuddin M, Costero A: Spatial distribution of factors that determine sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 2001, **31**:231-240.
30. Gill SS: Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995, **90**:69-74.
31. Telleria EI, de Araujo AP, Secundino NF, D'Ávila-Levy CM, Traub-Csekö YM: Trypsin-like serine proteases in *Lutzomyia longipalpis*: expression, activity and possible modulation by *Leishmania infantum chagasi*. *PLoS One* 2010, **5**:e10697.
32. Ghosh A, Edwards MJ, Jacobs-Lorena M: The journey of the Malaria Parasite in the Mosquito: Hopes for the New Century. *Parasitol Today* 2000, **16**:5.
33. Ludwig GV, Christensen BM, Yuill TM, Schultz KT: Enzyme processing of La Crosse virus glycoprotein G1: a bunyavirus-vector infection model. *Virology* 1989, **171**:108-113.
34. Mertens PP, Burroughs JN, Walton A, Wellby MP, Fu H, O'Hara RS, Brookes SM, Mellor PS: Enhanced infectivity of modified bluetongue virus particles for two insect cell lines and for two Culicoides vector species. *Virology* 1996, **217**:582-593.
35. Molina-Cruz A, Gupta I, Richardson J, Bennett K, Black W 4th, Barillas-Mury C: Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 2005, **72**:631-637.
36. Honório NA, Silva Wda C, Leite PJ, Gonçalves JM, Lounibos LP, Lourenço-de-Oliveira R: Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003, **98**:191-198.
37. Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R: *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fiocruz: Rio de Janeiro; 1994:225-250.
38. Brackney DE, Isoe J, Black WC IV, Zamora J, Foy BD, Miesfeld RL, Olson KE: Expression profiling and comparative analyses of seven midgut serine proteases from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol* 2010, **56**:736-744.
39. Soares TS, Watanabe RMO, Lemos FJA, Tanaka AS: Molecular characterization of genes encoding trypsin-like enzymes from *Aedes aegypti* larvae and identification of digestive enzymes. *Gene* 2011, **489**:70-75.
40. Isoe J, Rascón AA Jr, Kunz S, Miesfeld RL: Molecular genetic analysis of midgut serine proteases in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 2009, **39**:903-912.
41. Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, Wincker P, Clark AG, Ribeiro JM, Wides R, Salzberg SL, Loftus B, Yandell M, Majoros WH, Rusch DB, Lai Z, Kraft CL, Abril JF, Anthouard V, Arensburg P, Atkinson PW, Baden H, de Berardinis V, Baldwin D, Benes V, Biedler J, Blass C, Bolanos R, Boscus D, Barnstead M, et al: The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 2002, **298**:129-149.
42. Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B, Xi Z, Megy K, Grabherr M, Ren Q, Zdobnov EM, Lobo NF, Campbell KS, Brown SE, Bonaldo MF, Zhu J, Sinkins SP, Hogenkamp DG, Amedeo P, Arensburg P, Atkinson PW, Bidwell S, Biedler J, Bimey E, Bruggner RV, Costas J, Coy MR, Crabtree J, Crawford M, et al: Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* 2007, **316**:1718-1723.
43. Arensburg P, Megy K, Waterhouse RM, Abrudan J, Amedeo P, Antelo B, Bartholomay L, Bidwell S, Caler E, Camara F, Campbell CL, Campbell KS, Casola C, Castro MT, Chandramouliwaran I, Chapman SB, Christley S, Costas J, Eisenstadt E, Feschotte C, Fraser-Liggett C, Guigo R, Haas B, Hammond M, Hansson BS, Hemingway J, Hill SR, Howarth C, Ignell R, Kennedy RC, et al: Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. *Science* 2010, **330**:86-88.
44. Wu DD, Guo-Dong W, Irwin DM, Zhang YP: A profound role for the expansion of trypsin-like serine protease family in the evolution of hematophagy in mosquito. *Mol Biol Evol* 2009, **26**:2333-2341.
45. Zdobnov EM, von Mering C, Letunic I, Torrents D, Suyama M, Copley RR, Christophides GK, Thomasova D, Holt RA, Subramanian GM, Mueller HM, Dimopoulos G, Law JH, Wells MA, Birney E, Charlab R, Halpern AL, Kokoza E, Kraft CL, Lai Z, Lewis S, Louis C, Barillas-Mury C, Nusskern D, Rubin GM, Salzberg SL, Sutton GG, Topalis P, Wides R, Wincker P, et al: Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. *Science* 2002, **298**:149-159.
46. Borovsky D, Schlein Y: Quantitative determination of trypsin-like and chymotrypsin-like enzymes in insects. *Arch Insect Biochem Physiol* 1988, **8**:249-260.
47. Gorman MJ, Paskewitz SM: Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochem Mol Biol* 2001, **31**:257-262.
48. Rawlings ND, Barrett AJ: Families of serine peptidases. *Methods Enzymol* 1994, **244**:19-61.
49. Borovsky D: Trypsin-modulating oostatic factor: a potential new larvicide for mosquito control. *J Exp Biol* 2003, **206**:3869-3875.
50. Nakajima Y, Tsuji Y, Homma K, Natori S: A novel protease in the pupal yellow body of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). Its purification and cDNA cloning. *J Biol Chem* 1997, **272**:23805-23810.
51. Neurath H: Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 1984, **224**:350-357.
52. Hedstrom L: An overview of serine proteases. *Curr Protoc Protein Sci* 2002, **21**:21.10.
53. Felix CR, Betschart B, Billingsley PF, Freyvogel TA: Post-feeding induction of trypsin in the midgut of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) is separable into two cellular phases. *Insect Biochem* 1991, **21**:197-203.
54. Noriega FG, Wells MA: A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol* 1999, **45**:613-620.
55. Noriega FG, Edgar KA, Bechet R, Wells MA: Midgut exopeptidase activities in *Aedes aegypti* are induced by blood feeding. *J Insect Physiol* 2002, **48**:205-212.
56. Borovsky D, Meola SM: Biochemical and cytoimmunological evidence for the control of *Aedes aegypti* larval trypsin with Aea-TMOF. *Arch Insect Biochem Physiol* 2004, **55**:124-139.
57. Tabouret G, Bret-Bennis L, Dorchies P, Jacquiet P: Serine protease activity in excretory-secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. *Vet Parasitol* 2003, **114**:305-314.
58. Dadd RH: Alkalinity within the midgut of mosquito larvae with alkaline-active digestive enzymes. *J Insect Physiol* 1975, **21**:1847-1853.
59. Venancio TM, Cristofaletti PT, Ferreira C, Vejovski-Almeida S, Terra WR: The *Aedes aegypti* larval transcriptome: a comparative perspective with emphasis on trypsins and the domain structure of peritrophins. *Insect Mol Biol* 2009, **18**:33-44.
60. Noriega FG, Wang XY, Pennington JE, Barillas-Mury CV, Wells MA: Early trypsin, a female-specific midgut protease in *Aedes aegypti*: isolation, amino terminal sequence determination, and cloning and sequencing of the gene. *Insect Biochem Mol Biol* 1996, **26**:119-126.
61. Yano T, Takahashi N, Kurata S, Natori S: Regulation of the expression of cathepsin B in *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) at the translational level during metamorphosis. *Eur J Biochem* 1995, **234**:39-43.
62. LeMosy EK: Proteolytic regulatory mechanisms in the formation of extracellular morphogen gradients. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2006, **78**:243-255.
63. Philip JM, Fitches E, Harrison RL, Bonning B, Gatehouse JA: Characterisation of functional and insecticidal properties of a recombinant cathepsin L-like proteinase from flesh fly (*Sarcophaga peregrina*), which plays a role in differentiation of imaginal discs. *Insect Biochem Mol Biol* 2007, **37**:589-600.
64. Elpidina EN, Tsybina TA, Dunaevsky YE, Belozersky MA, Zhuzhikov DP, Oppert B: A chymotrypsin-like proteinase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Biochimie* 2005, **87**:771-779.
65. Tsybina TA, Dunaevsky YE, Belozersky MA, Zhuzhikov DP, Oppert B, Elpidina EN: Digestive proteinases of yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae: purification and characterization of a trypsin-like proteinase. *Biochemistry (Moscow)* 2005, **70**:300-305.

66. Angulo-Valadez CE, Cepeda-Palacios R, Ascencio F, Jacquiet P, Dorchies P, Romero MJ, Khelifa RM: Proteolytic activity in salivary gland products of sheep bot fly (*Destrus ovis*) larvae. *Vet Parasitol* 2007, **149**:117–125.
67. Thomas T, Cavicchioli R: Archaeal cold-adapted proteins: structural and evolutionary analysis of the elongation factor 2 proteins from psychrophilic, mesophilic and thermophilic methanogens. *FEBS Lett* 1998, **439**:281–286.

doi:10.1186/1756-3305-6-50

**Cite this article as:** Saboia-Vahia et al.: Trypsin-like serine peptidase profiles in the egg, larval, and pupal stages of *Aedes albopictus*. *Parasites & Vectors* 2013 **6**:50.



## 5.3 - Artigo 3

Saboia-Vahia et al. *Parasites & Vectors* 2012, **5**:290  
<http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/290>



### RESEARCH

### Open Access

# Protein expression in the midgut of sugar-fed *Aedes albopictus* females

Leonardo Saboia-Vahia<sup>1</sup>, Andre Borges-Veloso<sup>1</sup>, Patricia Cuervo<sup>2</sup>, Magno Junqueira<sup>5</sup>, Camila Mesquita-Rodrigues<sup>1</sup>, Constanca Britto<sup>1</sup>, Gilberto Barbosa Domont<sup>3\*</sup> and Jose Batista De Jesus<sup>1,4\*</sup>

#### Abstract

**Background:** *Aedes albopictus* is a vector for several fatal arboviruses in tropical and sub-tropical regions of the world. The midgut of the mosquito is the first barrier that pathogens must overcome to establish infection and represents one of the main immunologically active sites of the insect. Nevertheless, little is known about the proteins involved in the defense against pathogens, and even in the processing of food, and the detoxification of metabolites. The identification of proteins exclusively expressed in the midgut is the first step in understanding the complex physiology of this tissue and can provide insight into the mechanisms of pathogen-vector interaction. However, identification of the locally expressed proteins presents a challenge because the *Ae. albopictus* genome has not been sequenced.

**Methods:** In this study, two-dimensional electrophoresis (2DE) was combined with liquid chromatography in line with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and data mining to identify the major proteins in the midgut of sugar-fed *Ae. albopictus* females.

**Results:** Fifty-six proteins were identified by sequence similarity to entries from the *Ae. aegypti* genome. In addition, two hypothetical proteins were experimentally confirmed. According to the gene ontology analysis, the identified proteins were classified into 16 clusters of biological processes. Use of the STRING database to investigate protein functional associations revealed five functional networks among the identified proteins, including a network for carbohydrate and amino acid metabolism, a group associated with ATP production and a network of proteins that interact during detoxification of toxic free radicals, among others. This analysis allowed the assignment of a potential role for proteins with unknown function based on their functional association with other characterized proteins.

**Conclusion:** Our findings represent the first proteome map of the *Ae. albopictus* midgut and denotes the first steps towards the description of a comprehensive proteome map of this vector. In addition, the data contributes to the functional annotation of *Aedes* spp. genomes using mass spectrometry-based proteomics data combined with complementary gene prediction methods.

**Keywords:** *Aedes albopictus*, Culicidae, Midgut, Proteomics, Proteome, Two-dimensional electrophoresis, Mass spectrometry

\* Correspondence: gilberto@iq.ufrj.br; jbj@ioc.fiocruz.br

<sup>3</sup>Unidade de Proteômica, Laboratório de Química de Proteínas, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>4</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

## Background

The mosquito *Aedes albopictus* is a vector of fatal arboviruses such as yellow fever, Chikungunya and Dengue, which, according to estimates made by the World Health Organization (WHO) can reach over 50 million cases worldwide each year [1-3]. In Brazil, *Ae. albopictus* has been reported in 21 states with 1,502 municipalities infested [4]. This distribution is consistent with the fact that this species is able to adapt easily to new habitats, particularly those disturbed by man, such as wooded areas occupied by new settlements, and over time, becomes a permanent part of the local fauna [5]. During blood feeding females of *Ae. albopictus* acquire the nutrients necessary for egg maturation and production of yolk proteins [6]. However, during such feeding, females can also be infected with various pathogens, such as Dengue virus, which must cross the midgut epithelial cells to finally reach the salivary glands and ensure their transmission to a new host during the next blood meal. For this reason, many previous studies have focused on the salivary glands with the aim of discovering biomarkers involved in the interaction of tissue cells with the virus or parasite and identifying molecules involved in immune responses at the time of the insect blood meal [7-11]. However, the midgut is the first barrier that pathogens must overcome to establish infection and represents one of the main immunologically active sites of the insect [12]. Thus, many elements including the blood of the vertebrate to be processed, pathogens and the molecules of the vector immune response, among others, converge on the midgut. Nevertheless, little is known about the proteins involved in processing the blood or detoxifying the metabolites from this process. Furthermore, the extent of the proteins involved in defense against pathogens and which are expressed during the mosquito feeding intervals are also unknown. A description of these molecules may help to understand the phenomena that control the development of pathogens and subsequent transmission by the insect. Characterizing the profile of proteins in the midgut of females is one of the first steps to comprehend the complex physiology of this tissue. Proteomic approaches enable the protein profile of a tissue or cell to be fully defined and the proteins expressed under different conditions to be identified. Transcriptomic analyses have made important contributions to understanding the biology of *Aedes* spp., but few proteomic studies have been conducted in this genus. However, proteomic techniques have been used to characterize *Ae. aegypti* subproteomes, such as membrane from larval midgut, adult salivary gland, Malpighian tubules and semen [13-16]. In addition, a proteomic analysis of an *Ae. albopictus* cell line infected by Dengue serotypes 1 and 3 has been reported [17]. In the present study, using an approach

that combines two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry and data mining, we describe the proteomic map of the midgut from *Ae. albopictus* females.

## Methods

### Chemicals

All reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) or Merck (São Paulo, SP, Brazil). MilliQ-purified water (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) was used to make all of the solutions.

### Insects

Experiments were carried out using female adults (2-5 days old) of *Ae. albopictus* caught in the Brazilian state of Rio de Janeiro and reared in a closed colony in the Laboratório de Transmissores de Hematozoários - Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Mosquitoes used in this study had been maintained for near 100 generations in the closed colony. Laboratory maintenance conditions were a temperature of  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , relative humidity  $60 \pm 10\%$  and a light:dark photoperiod of 14:10 h. The mosquitoes were maintained on a 10% sucrose diet.

### Gut dissection

The mosquitoes were cold-anesthetized on ice and decapitated. Dissection was performed in cold, sterilized PBS buffer, pH 7.4 (150 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). The thorax was held with forceps (#5), and the intestine, Malpighian tubules and ovary were dissected by gently pulling at the rectum with another pair of forceps. In order to guarantee the integrity and cleanliness of the midguts, the Malpighian tubules and ovaries were cut out, and the midguts were cut by a longitudinal incision and thoroughly rinsed with PBS to remove the gut contents, including bacteria present as general microbiota. Midguts were then transferred to a microcentrifuge tube. The isolated midguts were digitally imaged using optic microscopy with differential interference contrast.

### Protein extraction

A pool of 50 midguts was lysed in IEF buffer containing 9 M urea, 4% CHAPS, 65 mM dithiothreitol (DTT), and 1% ampholytes (pH 3-10) plus 5 mM PMSF and a cocktail of protease inhibitors. The samples were mechanically lysed using a plastic pestle in combination with 10 cycles of freezing in liquid nitrogen and thawing. The lysate was centrifuged at  $10,000 \times g$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ , and the proteins in the resulting supernatant were precipitated with methanol:chloroform (3:1). Finally, the pellet was resuspended in IEF buffer (9 M urea, 4% CHAPS, 65 mM dithiothreitol (DTT) and 1% ampholytes, pH 3-10) for 1 h at room temperature. The protein concentration was determined using the 2-D Quant Kit (GE Healthcare).

### 2DE electrophoresis, protein visualization and image analysis

For the first dimension, 100  $\mu$ g of the protein was diluted to a final volume of 125  $\mu$ l in a rehydration solution (8 M urea, 2% CHAPS, 65 mM DTT, 1.5% ampholytes, pH 3–10, and 0.001% bromophenol blue). This solution was applied to IEF strips (7 cm, pH 3–10 non-linear; GE Healthcare) and submitted to isoelectric focusing on an Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) at 20°C with a maximum current of 50  $\mu$ A/strip. The focusing parameters were set as previously described [18]. Reduced (10 mg/mL DTT) and alkylated (25 mg/mL iodoacetamide) proteins were separated on 12% SDS-PAGE gels (30% acrylamide, 0.8% bis-acrylamide) using a vertical system (Bio-Rad) and standard Tris/glycine/SDS buffer. The gels were stained with colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 [19]. Images of the gels were acquired using a GS-800™ calibrated imaging densitometer (Bio-Rad), and image analysis was performed using PDQuest™ software (Bio-Rad). Three gels from three independent gut suspensions were compared. To assign experimental *pI* and *Mr* coordinates for each single spot, 2DE gels were calibrated using a select set of reliable identification landmarks distributed throughout the entire gel.

### Protein digestion, peptide extraction and analysis by mass spectrometry

The protein spots were manually excised and digested following previously described protocols [18,20]. Briefly, the gel pieces were washed with 50% (v/v) acetonitrile in 25 mM ammonium bicarbonate, dehydrated in 100% acetonitrile, dried and further rehydrated in 50 mM ammonium bicarbonate with 200 ng of trypsin (Promega). The tryptic digestion was performed overnight at 37°C. The peptides were extracted using 0.1% formic acid in 50% (v/v) acetonitrile, concentrated under vacuum and desalted using C18 tips. The eluted peptides were loaded in a nanoLC (Nano-LC Ultra 2D Plus, Eksigent), running a 50 minute gradient. Peptides were fractionated using a gradient from 95% phase A (95% water, 5% Acetonitrile, 0.1% formic acid added to the total) to 40% phase B (85% Acetonitrile, 15% water, 0.1% formic acid added to the total) for 42 min, 40% to 90% phase B during 4 minutes and sustaining 90% phase B for another 4 minutes (total of 50 min at a flow rate of 200 nl/min). Analytical column consisted of ReproSIL Gold c18 3  $\mu$ m diameter beads (Dr Maisch GmbH, Germany) packed in-house inside a 75  $\mu$ m ID silica tip with metallic coating, 12 cm length. The nanoLC was in-line with a hybrid LTQ XL-Orbitrap mass spectrometer, running a Data Dependent Acquisition method, where MS1 was performed on the FTMS at 60000 resolution, followed by CID fragmentation (35 normalized collisional energy) of the 5 most intense ion analyzed on the ITMS with a dynamic exclusion

of 90 seconds to prevent re-fragmentation of the same ion. The mass spectra were searched against the non-redundant database of the National Center for Biotechnology (NCBI) using the program Mascot MS/MS ion search ([www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html), Matrix Science, Oxford, UK, free online version). The search parameters were lack of taxonomic restrictions; one tryptic miscleavage; carbamidomethylation of cysteine residues as fixed and oxidation of methionine and acetylation as variable modifications; 10 ppm mass tolerance for the MS mode and 0.6 Da tolerance for its corresponding fragments in MS/MS.

### Bioinformatics analyses of identified proteins

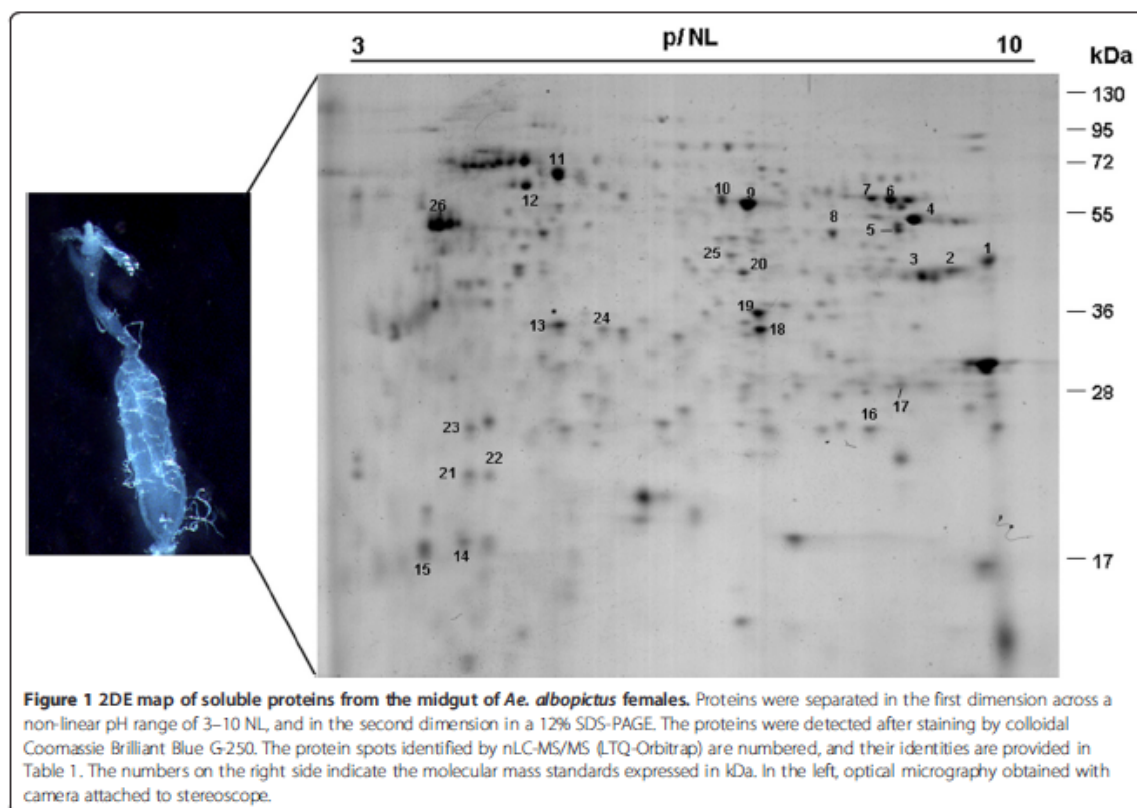
Gene Ontology (GO) annotations of biological process of *Ae. albopictus* proteins were assigned according to those reported in the VectorBase database (<http://www.vectorbase.org/>) and confirmed at the AmiGO database (<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/search.cgi>). The putative function of hypothetical proteins was inferred using the InterProScan Sequence Search (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>). Identified proteins were also analyzed in terms of putative functional association networks according to the STRING 9.0 Server [21,22] (<http://www.string-db.org>).

## Results and discussion

### Two-dimensional gel separation and identification of *Ae. albopictus* gut proteins

The gut proteins were fractionated by 2DE in a non-linear gradient pH 3–10. Image analysis of 2DE gels obtained from three independent experiments showed that the protein spot profiles were highly reproducible in terms of both the total number of protein spots and their relative positions and intensities. Approximately 340 protein spots, distributed in a molecular mass range between ~17 and ~110 kDa and a *pI* range between ~3.5 and ~9.5, were detected in the Coomassie blue G-stained gels (Figure 1). These results agree with previously reported proteomic maps of *Ae. aegypti* midgut where a similar number of spots were resolved [13,14]). In the absence of reported *Ae. albopictus* genome sequences, the proteins were identified based on their similarity with the available *Ae. aegypti* sequences. Automatic search of tandem mass spectra allowed the identification of 56 proteins from 26 protein spots (Table 1, Figure 1). Forty different protein entries were found among the 56 identifications (Tables 1 and 2). The spot numbers in Table 1 correspond to the midgut proteins shown in Figure 1.

By comparing our data to the previously reported protein profiles of the midgut and midgut brush border membrane vesicles 2D maps of *Ae. aegypti* [14,23], we identified approximately 60% (25/40) and 47% (19/40) of the proteins, respectively, for the first time in the midgut



2D map of an *Aedes* spp. The presence of protein disulfide isomerase, chaperonin-60 and enolase among the most abundant proteins was in good agreement with the midgut proteome analysis of *Ae. aegypti* [14,23]. The congruence between the theoretical molecular mass and experimental MW of the identified proteins (Table 1) indicates that primarily full-length proteins were present in the midgut extract.

#### Biological processes of the identified proteins and potential functional associations

*Ae. albopictus* proteins could be classified in 15 categories according to GO annotation of biological processes at the VectorBaseDB (Table 2, Figure 2). The most abundant groups correspond to proteins involved in amino acid metabolism, proteins with unknown biological process and proteins involved in the cell redox homeostasis (Figure 2). Other proteins were clustered into categories of those participating in the response to oxidative stress, (catalase and superoxide dismutase); phosphorylation (pyridoxine kinase); proteolysis (leucine aminopeptidase) and iron transport (transferrin), among others.

Further information about the role of *Ae. albopictus* midgut proteins was obtained analyzing the potential functional associations among the identified proteins using the STRING 9.0 server, a database that provides information about known and predicted protein-protein interactions. This analysis revealed 5 consistent groups of functional associations (Figure 3). The first one is composed of proteins involved in glycolysis (pyruvate kinase, enolase, fructose-bisphosphate aldolase), protein folding (chaperonin-60, ch60), electron carrier (electron transport oxidoreductase), and ketone body catabolism (succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase) (Figure 3, green cluster). The second functional association group includes proteins from carbohydrate and amino acid metabolism such as cystathionine beta-lyase, malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase (Figure 3, red cluster). The repertoire of amino acid metabolism associated proteins identified in the midgut of the insects could be correlated to several factors: (i) constitutive expression of this group of proteins for the maintenance of basal metabolism, including protein turnover of midgut structural proteins; (ii) early after metamorphosis, females are fertilized and start to suffer changes in their metabolic machinery as preparation for the blood feeding; (iii) as



Table 1 Proteins automatically identified using the Mascot software (Continued)

3	d-3-phosphoglycerate dehydrogenase [Aedes aegypti]	g 157109536	AAEL005336	35.7/32.8	8.0/7.5	2(2)	KSLVLCDAVDNDCVKL	3	149	92
							RAGAGVDNIDVAATR.N	3		104
3	Chain A, Crystal Structure Of Aedes Aegypti Alanine Glyoxylate Aminotransferase	g 116667854	AAEL000640	43.4/32.8	7.1/7.5	1(1)	KLLMGGPNSAPQRLV	3	48	48
4	ATP synthase alpha subunit mitochondrial [Aedes aegypti]	g 157131648	AAEL012175	59.5/53.1	9.0/7.4	18(7)	RVLSIGDGIARV	2	215	41
							RVLSIGDGIARV	3		68
							KNIQADEMEFSSGLK.G	5		25
							KNIQADEMEFSSGLK.G	0		18
							KNIQADEMEFSSGLK.G	1		37
							KNIQADEMEFSSGLK.G	3		101
							KAPGIIPRV	2		41
							REPMTGKKA	3		28
							KAVDSLVPGRG	3		57
							R.EIIGDRQ	3		38
							KTALADTIINQQR.F	2		98
							K.RSTVAQVKR	1		38
							K.HALIYDQLSKQ	1		21
							R.EAYPGDVFYLSRL	3		89
							K.GRPAINVGLSVSR.V	2		22
							K.LELAQYRE	1		40
							RLTELLKQ	1		25
							K.ITAFER.E	2		31
4	alanine aminotransferase [Aedes aegypti]	g 157124459	AAEL009872	60.4/53.1	8.6/7.4	2(1)	RLLWINPGNPTGVLSRD	3	49	49
4	ATP synthase alpha subunit mitochondrial [Aedes aegypti]	g 157131648	AAEL012175	59.5/53.1	9.0/7.4	7(5)	R.TTILPQPAKL	3		42
							KNIQADEMEFSSGLK.G	-5	224	25

Table 1 Proteins automatically identified using the Mascot software (Continued)

							K.GMALNLEPDNVGVWFGNDKL	-5		83
							K.GMALNLEPDNVGVWFGNDKL	4		24
							K.GMALNLEPDNVGVWFGNDKL	3		41
							K.GMALNLEPDNVGVWFGNDKL	3		86
							REVA.AFAQFGSD.LDAATQQLNR.G	4		149
							REVA.AFAQFGSD.LDAATQQLNR.G	4		58
5	fructose-bisphosphate aldolase [Aedes aegypti]	g 157111184	AAEL005766	39.9/51.2	8.4/7.2	5(3)	RLQENISGVILFHETLYQKA	4	230	47
							K.GVVDLMGSEGETTQGLDDL.GAR.C	3		78
							K.GVVDLMGSEGETTQGLDDL.GAR.C	4		76
							R.IWPVPEILPDGDHDLERC	4		45
							K.VTETVLAAYKA	4		61
6	catalase [Aedes aegypti]	g 94468602	AAEL013407	48.8/58.4	7.2/7.1	22(14)	K.KTPLAVRF	3	484	30
							R.FSTVGGESGADTAR.D	2		110
							K.FYTDDG.VWDLVGNNTPIFFIRD	2		100
							R.DPILFPSFIHTQKR	2		55
							R.FMNGYGSHTFKL	1		26
							R.FMNGYGSHTFKL	1		29
							R.FMNGYGSHTFKL	3		27
							KLVNADGKPVYCKF	2		37
							KRADEL.AGADPDYSRD	1		36
							KRADEL.AGADPDYSRD	3		61
							RADEL.AGADPDYSRD	2		87
							K.GEYPSWTLKJ	0		31
							K.IQMTFEQAEKL	4		83
							K.IWPQAEPLIPGRM	2		64
							K.NYFAEVEQAFDPSSM.VPGIEASPDKM	3		75
							R.LFAYTDTHRH	4		70
							R.LGANYTQLPVNCPYRV	1		89
							K.HSVSGDIDRF	3		48
							K.HSVSGDIDRFESGDEENFAQASVFYRR	2		33
							R.FESGDEENFAQASVFYRR	5		74

**Table 1** Proteins automatically identified using the Mascot software (Continued)

Protein ID	Accession	Score	Length	Ion Score	Peptides	Protein Name	Sequence	Count	Score
6	catalase [Aedes aegypti]	g 157135803	AAEL013407	57.1/58.4	7.7/7.1	8(4)	R.MISNLVNHMSNASPFQERA	2	60
							K.NFAEVDADFGRQ	1	75
							R.NPAENQLNLFKE	1	196
							K.KTPLAVRF	3	30
							R.FSTVGGESGSADTARD	2	110
							K.FYTDGQWDLVGNNTPIFFIRD	2	100
							R.DPILFSPFHTQKR	2	55
							R.FMNGYGSHTFKL	1	26
							R.FMNGYGSHTFKL	1	29
							R.FMNGYGSHTFKL	3	27
6	ATP synthase alpha subunit mitochondrial [Aedes aegypti]	g 157131648	AAEL012175	59.5/58.4	9.0/7.1	4(4)	K.NIQADEMVEFSSGLK.G	3	146
							K.TALADTIINQQR.F	2	60
							REVAFAAQFGSDLDAATQQLNR.G	1	75
6	catalase [Aedes aegypti]	g 94468602	AAEL013407	48.8/58.4	7.2/7.1	22(14)	REVAFAAQFGSDLDAATQQLNR.G	13	82
							K.KTPLAVRF	3	484
							R.FSTVGGESGSADTARD	2	110
							K.FYTDGQWDLVGNNTPIFFIRD	2	100
							R.DPILFSPFHTQKR	2	55
							R.FMNGYGSHTFKL	1	26
							R.FMNGYGSHTFKL	1	29
							R.FMNGYGSHTFKL	3	27
							K.LVNADGKPVYCKF	2	37
							K.RADELAGADPDYSIRD	1	36
K.RADELAGADPDYSIRD	3	61							
R.ADELAGADPDYSIRD	2	87							
K.GEYPSWTLKJ	0	31							
K.IQMTFEQAELK	4	83							
K.IWPQAEFLIPVGRM	2	64							
K.NYFAEVEQAFDPSSM/PGLIASEPDKM	3	75							
R.LFAYTDTHR.H	4	70							

Sabola-Vahle et al. Parasites & Vectors 2012, 5:290  
<http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/290>

Page 9 of 25

**Table 1** Proteins automatically identified using the Mascot software (Continued)

6	catalase [Aedes aegypti]	g 157135803	AAEL013407	57.1/58.4	7.7/7.1	8(4)	R.LGANYTQLPVNCPYRV	1	89
							K.HSVSGDIDRF	3	48
							K.HSVSGDIDRFESGDEENFAQASVFYR.R	2	33
							R.FESGDEENFAQASVFYR.R	5	74
							R.MISNLVNHMSNASPFQERA	2	60
							K.NFAEVDADFGRQ	1	75
							R.NPAENQLNLFKE	1	196
							K.KTPLAVRF	3	30
							R.FSTVGGESGSADTARD	2	110
							K.FYTDGQWDLVGNNTPIFFIRD	2	100
6	ATP synthase alpha subunit mitochondrial [Aedes aegypti]	g 157131648	AAEL012175	59.5/58.4	9.0/7.1	4(4)	R.DPILFSPFHTQKR	2	55
							R.FMNGYGSHTFKL	1	26
							R.FMNGYGSHTFKL	1	29
							R.FMNGYGSHTFKL	3	27
							K.NIQADEMVEFSSGLK.G	3	146
							K.TALADTIINQQR.F	2	60
							REVAFAAQFGSDLDAATQQLNR.G	1	75
							REVAFAAQFGSDLDAATQQLNR.G	13	82
							R.DSGDYEMITGYRA	0	52
							R.GVHGLDNFIKE	1	27
6	glutamate dehydrogenase [Aedes aegypti]	g 157126232	AAEL010464	61.6/58.4	8.3/7.1	5(2)	R.AGATCGIIEHDGSIINPQGIDPKA	1	21
							K.DIVHSGLDYTMERS	3	24
							K.YNLGLDLRS	2	57
							K.KTPLAVRF	0	461
							R.FSTVGGESGSADTARD	2	99
							K.FYTDGQWDLVGNNTPIFFIRD	1	66
							K.FYTDGQWDLVGNNTPIFFIRD	2	92
							R.DPILFSPFHTQKR	2	25
							R.DPILFSPFHTQKR	2	62
							7	catalase [Aedes aegypti]	g 94468602
R.FSTVGGESGSADTARD	2	99							
K.FYTDGQWDLVGNNTPIFFIRD	1	66							
K.FYTDGQWDLVGNNTPIFFIRD	2	92							
R.DPILFSPFHTQKR	2	25							
R.DPILFSPFHTQKR	2	62							

Sabola-Vahle et al. Parasites & Vectors 2012, 5:290  
<http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/290>

Page 10 of 25

Table 1 Proteins automatically identified using the Mascot software (Continued)

Protein ID	Protein Name	Accession	Score	Length	Modifications	Peptides	Protein Count	Peptide Count	Score		
7	catalase [Aedes aegypti]	gij157135803	AAEL013407	57.1/58.4	7.7/7.0	9(6)		R.FMNGYGSHTFKL	1	26	
								R.FMNGYGSHTFKL	3	38	
								K.LVNADGKPYCKF	0	45	
								K.RADELAGADPDYSRD	-1	56	
								K.RADELAGADPDYSRD	1	40	
								R.ADELAGADPDYSRD	2	86	
								K.IQWMTFEQAEKL	-1	74	
								K.IWQAEFLIPVGRM	2	40	
								K.NYFAEVEQIAFDPSMWPGEASPDKM	3	37	
								R.LFAYTDTHRH	0	70	
								R.LFAYTDTHRH	1	52	
								R.LGANYTQLPVNCPYRV	1	80	
								K.HSVSGDIDRF	2	56	
								R.FESGDEENFAQSVFYRR	1	111	
								R.MISNLVNHMSNASPFQERA	-	28	
K.NFAEVDADFGRQ	2	73									
R.NPAENQLNLFKE	-9	221	59								
7	pyruvate kinase [Aedes aegypti]	gij157107887	AAEL014913	58.0/58.4	7.1/7.0	12(4)		K.KITPLAVRF	0	37	
								R.FSTVGGESGADTARD	2	99	
								K.FYTDGQWDLVGNNTPIFFIRD	1	66	
								K.FYTDGQWDLVGNNTPIFFIRD	2	92	
								R.DPILFSPHITQKR	2	25	
								R.DPILFSPHITQKR	2	62	
								R.FMNGYGSHTFKL	1	26	
								R.FMNGYGSHTFKL	3	38	
								R.LSGICTGPAASVAPEMLEKM	0	139	59
								K.MMATGMNARL	2	18	
								K.IENQQGMQNLDAIAASDGIMVARG	2	67	
								R.AGKPVICATQMLESMIKK	0	16	
								R.AEISDVANAIIDGDCVMSGETAK.G	3	27	
								R.AEISDVANAIIDGDCVMSGETAK.G	3	51	
								K.EAEALWHRN	1	19	

Silboia-Vahia et al. Parasites & Vectors 2012, 5:290  
<http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/290>

Page 11 of 25

Table 1 Proteins automatically identified using the Mascot software (Continued)

7	leucine aminopeptidase [Aedes aegypti]	gij157121025	AAEL001649	56.6/58.4	6.5/7.0	5(3)		R.AAAWVITTSGRS	1	65								
								R.QCHLYRG	1	9								
								R.GILPVYEQQALDNLKLD	1	74								
								R.VQYGMDFGKE	2	18								
								R.GFLKPGNPNWWTGWKQ	3	22								
								R.ECLFASGC AVARA	-1	134	46							
								K.AAADPPALAVLSYEPEGATETVAWVGK.G	3	50								
								K.AAADPPALAVLSYEPEGATETVAWVGK.G	3	13								
								K.VLDMATLTGAQGTGKY	0	113								
								K.YHGAILTNSGSWENKA	-5	42								
								R.FFDMMVEYFFHRA	1	113	43							
								7	glutamate dehydrogenase [Aedes aegypti]	gij157126232	AAEL010464	61.6/58.4	8.3/7.0	12(6)		R.DSGDYEMITGYRA	1	58
																K.GFIGRGIDVPAPDMGTGER.E	3	46
																R.GVFHGLDNFIKE	3	36
																K.EANYMAMIGTTPGWGKCT	-3	32
R.AGATCIGIEHDCSINPQGDPKA	2	23																
K.IIAEAANGPTTPAADKJ	3	83																
K.IPVTPEAFQKR	1	28																
K.DIVHSGLDYTMERS	2	34																
K.YNLGLDLRS	0	44																
R.SAAYNSIEKI	2	35																
K.IFQTYRD	1	21																
R.GNPTVEVDLVTDLGLFRA	2	56	17															
8	enolase [Aedes aegypti]	gij157121051	AAEL001668	46.8/51.2	6.2/6.7	3(2)										K.EALNLIQDAIKA	0	54
																K.DFPMSIEDPFQDQHDWDAAWAKM	β	42
																K.NDTLGGTCLNVGCIPSKA	1	286
								9	dihydroipoamide dehydrogenase [Aedes aegypti]	gij157114623	AAEL006928	54.1/55.0	6.3/6.2	7(5)		R.IJLDLVMQKCT	-6	64
																K.MADGSEEVNAKN	2	118
																K.MADGSEEVNAKN	1	82

Silboia-Vahia et al. Parasites & Vectors 2012, 5:290  
<http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/290>

Page 12 of 25



Table 1 Proteins automatically identified using the Mascot software (Continued)

Protein ID	Protein Name	Accession	Length	Score	Identified	Peptides	Protein Count	Peptide Count	
9	thioredoxin reductase [Aedes aegypti]	g 157132842	AAEL002886	544/55	6.2/6.2	10(8)	KFLLGTVK	1	31
							RAPYTEGLGLENVGMKD	3	100
							R.VCHAHPTCAEALRE	0	39
							KDAHINWAVMKN	0	255
							KDAHINWAVMKN	0	19
							K.GFGYDATVMRS	0	75
							R.GFDQMATMVGDMVEK.G	1	74
							R.GFDQMATMVGDMVEK.G	4	61
							K.LDQAGWTAEGGKS	2	101
							K.RPELTPVAIHAGRL	-3	85
R.YCYLKA	1	19							
K.AVALLEGDQK.V	-1	82							
K.SSGLDPTPATCCS	4	54							
K.AHIADEAGNLFNKS	0	62	62						
9	succinyl-coa3-ketoacid coenzyme a transferase [Aedes aegypti]	g 157128446	AAEL011137	498/55	6.1/6.2	1(1)			
10	thioredoxin reductase [Aedes aegypti]	g 157132842	AAEL002886	544/58.4	6.2/6.0	14(12)	MAPINQENFDYDLVGGGSGGLACAKE	0	389
							MAPINQENFDYDLVGGGSGGLACAKE	3	86
							K.LMHQASLLGEAIDAQPYGWKF	1	40
							K.LMHQASLLGEAIDAQPYGWKF	0	45
							K.LMHQASLLGEAIDAQPYGWKF	2	73
							K.VEVNGLGYFKD	-2	67
							KDAHINWAVMKN	0	29
							KDAHINWAVMKN	2	53
							R.GFDQMATMVGDMVEK.G	-1	98
							R.GFDQMATMVGDMVEK.G	3	25
							K.LDQAGWTAEGGKS	2	103
							K.AVALLEGDQK.V	-1	78
							K.NTVGHPTVAEEFTRL	-2	65
							K.SSGLDPTPATCCS	3	52
10	dihydroipoamide dehydrogenase [Aedes aegypti]	g 157114623	AAEL006928	54.1/58.4	6.3/6.0	7(7)	K.NDTLGGTCLNVGCIPIKA	1	285
								127	

Table 1 Proteins automatically identified using the Mascot software (Continued)

10	thioredoxin reductase [Aedes aegypti]	g 157132842	AAEL002886	544/58.4	6.2/6.0	5(5)	KALLNNSHYHMAHSGDLSRG	-4	51
							KMADGSEEVNAKN	2	95
							KMADGSEEVNAKN	2	89
							RAPYTEGLGLENVGMKD	0	64
							R.VCHAHPTCAEALRE	3	32
							R.VCHAHPTCAEALRE	4	58
							K.TLWGAGYGLECAGFLKG	1	244
							R.SDDGTEGSDVYDTVLFAGRT	3	115
							K.SDKLDVDSFETTINPNFAVGDVLYKR	1	80
							K.LDVDSFETTINPNFAVGDVLYKR	2	43
10	dihydroipoamide dehydrogenase [Aedes aegypti]	g 157114623	AAEL006928	54.1/58.4	6.3/6.0	3(2)	K.VLGHFLGVPVAGEVQGFAAALKS	1	40
							R.LGAEVTAEFLSSIGGAGDQEVSKS	0	56
11	transferrin [Aedes aegypti]	g 157129886	AAEL011641	87.1/66.9	4.9/5.4	16(11)	R.VPNSVFQTMPSIYAGDCIHGPMLAHKA	4	43
							R.VLGVHIGPAAGELINEAVLAMEYGASAEVAVR	0	36
							K.FSEQLQLQRG	-1	411
							R.GNPEWCVTVQDSIECAQRI	0	121
							REWDFRS	1	37
							R.SVWSSQHQGGVDFGLRN	1	77
							K.KFCIPGLHYGR.Q	-4	26
							K.KFCIPGLHYGR.Q	1	46
							K.FCHPGLHYGR.Q	1	35
							K.FCHPGLHYGR.Q	2	30
							R.QLPPSDLCQITSRW	0	98
							R.WCTTSPEEKD	0	31
							R.TAALTGFFPTIECDPTTSRM	1	107
							R.ADFIGIDSNFGYLARH	2	96
K.YSSVWLVRA	0	65							
R.FENLRN	2	26							
R.GFDQHECDYGR.L	-1	31							
R.GFDQHECDYGR.L	0	74							
12		g 157129785	AAEL011584	61.1/61.8	5.4/5.3	10(6)	K.LVQDVANNINNEAGDXTTATVLAARA	-2	204
								69	

**Table 1 Proteins automatically identified using the Mascot software (Continued)**

chaperonin-60kD, ch60 [Aedes aegypti]						KLVQDVANNITNEEAGDGTITATVLARA	0	48		
						KGANPVEIRR	0	24		
						RRGVMLAVDAVK.D	1	40		
						KAPFGDNRK	2	34		
						KLEDVQMSDLGQVGEITTKD	-1	125		
						KJGGSSEVEVNEKK	0	85		
						KTLBNLKG	1	31		
						RALHQPCQIAKN	1	43		
						KNAGVDGQVWAKV	-1	79		
12	chaperonin-60kD, ch60 [Aedes aegypti]	gij157129785	AAEL011584	61.1/61.8	5.4/5.3	16(0)	RALMLQGVDM.LAD.AVA.VTM.GPK.G	0	431	76
						RALMLQGVDM.LAD.AVA.VTM.GPK.G	2	8		
						RALMLQGVDM.LAD.AVA.VTM.GPK.G	2	30		
						RALMLQGVDM.LAD.AVA.VTM.GPK.G	4	34		
						RALMLQGVDM.LAD.AVA.VTM.GPK.G	-4	77		
						RALMLQGVDM.LAD.AVA.VTM.GPK.G	4	103		
						KTLHDELEIEGMKF	-1	21		
						RKPLVIAEDVDG.EAL.STL.WNRL	-6	43		
						RKPLVIAEDVDG.EAL.STL.WNRL	-1	40		
						RKPLVIAEDVDG.EAL.STL.WNRL	2	7		
						RKPLVIAEDVDG.EAL.STL.WNRL	3	111		
						KSTLSDMAI.STGGV.FGDDANLVKL	2	99		
						KSTLSDMAI.STGGV.FGDDANLVKL	5	52		
						KSTLSDMAI.STGGV.FGDDANLVKL	1	104		
						KSTLSDMAI.STGGV.FGDDANLVKL	2	47		
						KLEDVQMSDLGQVGEITTKD	1	114		
12	dihydrolipoamide dehydrogenase [Aedes aegypti]	gij157114623	AAEL006928	54.1/61.8	6.3/5.3	1(1)	RMGLGAGV.GLEL.GSW.GRL	2	103	103
13	anterior fat body protein [Aedes aegypti]	gij157110227	AAEL000757	39.7/34.4	6.1/5.4	2(1)	KFVEQFDKV	3	73	44
						KFYADTGAYDVKV	3	73		

**Table 1 Proteins automatically identified using the Mascot software (Continued)**

14	cytochrome b5, putative [Aedes aegypti]	gij157108002	AAEL014935	11.7/18.1	4.9/5.0	7(4)	KTFSLAEIKA	0	94	25
						KDATEAFEDVGHSTDARE	0	77		
						KDATEAFEDVGHSTDARE	0	38		
						KVGLIESERK	0	62		
						RKQVPWK	1	23		
						KKEPDWSTEQKD	1	35		
						KKEPDWSTEQKD	0	14		
14	electron transport oxidoreductase [Aedes aegypti]	gij157137180	AAEL013739	34.4/18.1	8.4/5.0	2(1)	KSDLTEFVSQELTKS	4	66	66
15	60S acidic ribosomal protein P2 [Aedes aegypti]	gij157105859	AAEL014583	11.3/17.0	4.5/4.8	3(2)	KSDRPSLTAAKJ	-17	12	
						KILSSVGEADSTRV	3	105	87	
						KSVEELIASGRE	4	49		
						KLSSMPAGGAA.PAA.GA.GAAAG.GAAA.APA.EEKK	4	62		
15	hypothetical protein Ael_AAEL005270 [Aedes aegypti]	gij157109287	AAEL005270	15.5/17.0	4.8/4.8	4(3)	KWWWTNAGPYPPNMVSGGQDSDGALLYVGRA	3	103	77
						KELWDSATGGNIPDAWGGNTADGEPYIGRA	4	11		
						RAYHEGSQTIGKV	-19	26		
						RAYHEGSQTIGKV	6	54		
						RSHGCCYIPYGGAEVSPYDVLCEK-	3	46		
15	arp2/3 complex 16 kd subunit (P16-arc) [Aedes aegypti]	gij157120584	AAEL009059	16.9/17.0	4.7/4.8	2(1)	KNTSSSAFRK	4	51	13
16	superoxide dismutase, Mn [Aedes aegypti]	gij157107594	AAEL004823	24.6/25.8	8.3/6.9	5(2)	KVVLQNAPLLCKN	3	51	
						KHTLPDLPYDFGALEPVICRE	5	153	35	
						REIMEVHHQKH	3	45		
						KHHNAYTNLNAEEQLAEAVAKK	3	122		
						RSDPSAELKKL	4	30		

**Table 1 Proteins automatically identified using the Mascot software (Continued)**

16							K.NLRPNYDAWDVWVWVKD	7	83
							phosphatidylethanolaminebinding protein [Aedes aegypti]	gj 94469304	
	AAEL011268	25.1/25.8	5.8/6.9	2(1)	R.		IAFVGSQPPQGSGLHRY	1	85
							K.VNLGELVAGNFYRA	5	85
17	cydohex-1-ene-1-carboxyl-CoA hydratase, putative [Aedes aegypti]	gj 157104013	AAEL003993	31.9/29.6	8.7/7.3	5(4)	K.NVALTLNRPKA	2	142
							K.CITGNFLNNTSVAKA	4	28
							K.ISTFSPVLQLCKE	4	59
							KEAVNTAYETTLNEGLKF	4	108
							K.DRLEGMTAFVEKR	3	38
17	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase [Aedes aegypti]	gj 157137993	AAEL013904	34.1/29.6	8.7/7.3	2(2)	K.GAVTYDNVSELAKA	3	85
							K.VFSDINASTGRS	2	69
18	pyridoxine kinase [Aedes aegypti]	gj 157123752	AAEL009601	34.0/26.9	6.5/6.3	3(3)	R.VLSIQSHWHGVGNKS	6	115
							R.VLSIQSHWHGVGNKS	3	57
							K.FDMCATLERT Oxidation (M)	3	76
19	malate dehydrogenase [Aedes aegypti]	gj 157116681	gj 157116681 AAEL007707	36.4/25.8	6.0/6.3	9(5)	K.GDVFGPNQRL	2	204
							K.VLVGNPANTNALVCSHYAPSPKE	6	33
							K.ENFTAMTRL	1	23
							K.ENFTAMTRL Oxidation (M)	2	41
							K.DGEYSMGWSDGSGYTPKD	4	118
							K.DGEYSMGWSDGSGYTPKD Oxidation (M)	4	97
							K.VQGLSVDDFARG	4	30
							K.ELLEKEEAMSVCASD-	4	42
							K.ELLEKEEAMSVCASD- Oxidation (M)	4	52
19	fructose-bisphosphate aldolase [Aedes aegypti]	gj 157111184	AAEL005766	39.9/25.8	8.4/6.3	4(2)	R.FADIGVENNENR	3	68
							R.LQENISGVLPHETLYQKA	4	53
							K.NTPSYQAILLENANLARY	6	63

**Table 1 Proteins automatically identified using the Mascot software (Continued)**

20	cystathionine beta-lyase [Aedes aegypti]	gj 157104405	AAEL004059	44.3/18.1	6.0/5.1	11(7)	R.IVPVPEILPDGDHDLERC	3	18
							R.AVPPISMSTTFKQ	3	194
							K.QFGPAQHAGYEYGRS	3	21
							K.MNIEVDFVCDLAKV	5	49
							K.MNIEVDFVCDLAKV Oxidation (M)	4	83
							K.VEAAPKPNTKL	5	48
							K.LFWIETPTNLLKV	5	65
							K.FLQNAAGVPSPFDCYLVNR.S	5	66
							K.FLQNAAGVPSPFDCYLVNR.S	6	34
							R.VLHPGLSPHQHELAKK	2	29
							R.VLHPGLSPHQHELAKK	3	18
							R.ISVGLEDADLMDLKQ	6	110
20	hypothetical protein Aae_AAEL015064 [Aedes aegypti]	gj 157108923	AAEL015064	10.9/18.1	5.6/5.1	3(2)	K.GSESEHINKV	2	81
							R.KLMNAYCDRA Oxidation (M)	2	37
							R.KLMNAYCDRA Oxidation (M)	6	77
21	mitochondrial F0 ATP synthase D chain, putative [Aedes aegypti]	gj 157106010	AAEL004423	19.6/22.5	5.2/5.1	3(3)	R.IAQSSVNWAAEAERV	3	133
							R.IADYQSQIALKK	3	90
							K.ALLPFQQMTMEDYRD 2 Oxidation (M)	3	48
21	cystathionine beta-lyase [Aedes aegypti]	gj 157104405	AAEL004059	44.3/22.5	6.0/5.1	1(1)	R.ISVGLEDADLMDLKQ	6	118
22	lactoylglutathione lyase [Aedes aegypti]	gj 157104990	AAEL014393	20.7/22.5	5.3/5.1	4(1)	K.DFLFQQTMYRI	2	90
							K.ATLELTHNWGESDPDQKY	3	35
							R.GYGHGIMVPDVEKA Oxidation (M)	1	37
							K.DPDGYWEIFNASKV	6	90
23	glutathione S-transferase [Aedes aegypti]	gj 157130284	AAEL011741	27.0/25.8	5.2/5.1	7(6)	R.FLLSYGNLPPDDRJ	5	179
							R.EEWPALKPTMPMGQMPVLSVDGKK	4	54
							K.KVHQSVAMSRV Oxidation (M)	3	19
							K.QVGLAGADDWENLMDTWDTINDFRL	8	64

Silbo-Villa et al. *Parasites & Vectors* 2012, **5**:290  
<http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/290>

Page 17 of 25

Silbo-Villa et al. *Parasites & Vectors* 2012, **5**:290  
<http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/290>

Page 18 of 25

Table 1 Proteins automatically identified using the Mascot software (Continued)

							KIAWSYEPDDDDVKEKK	2	49
							KLVTLNSEMPFYLEKL	6	49
							RWDNVTSDSIKA	3	82
23	rho guanine dissociation factor [Aedes aegypti]	gi 157134192	AAEL012996	23.0/25.8	5.0/5.1	1(1)	KEALLGEAQSEKI	3	67 67
24	anterior fat body protein [Aedes aegypti]	gi 157110227	AAEL000757	39.7/35.2	6.1/5.5	2(1)	KFVEQFDKV	1	83 49
25	aliphatic nitrilase, putative [Aedes aegypti]	gi 157125650	AAEL010284	43.9/47.4	6.0/5.9	6(2)	KFYYADTGAYDWKV	5	83
							RHIPPEELRE	6	50 13
							RHIPPEELRE	3	34
							KQYNMVISPIERD Oxidation (M)	7	51
							RKNHPRV	1	36
							KNHPRV	1	36
26	ATP synthase beta subunit [Aedes aegypti]	gi 157132308	AAEL002827	53.8/53.1	5.0/4.9	34(27)	KDFWGFPMQRL Oxidation (M)	4	16
							RLVLEVAQHLGENTVRT	1	693 47
							RTIAMDGTGLVRG	1	65
							RTIAMDGTGLVRG Oxidation (M)	1	88
							RVLDTGSPRI	2	56
							RJPNVGAETLGRJ	0	63
							RJINVGEPIDERG	2	80
							RGPINETLSAPIHAEAEPEFIDMSVEQEILVTGKIV	8	17
							RGPINETLSAPIHAEAEPEFIDMSVEQEILVTGKIV Oxidation (M)	5	51
							KVVDLLAPYAKG	1	36
							KIGLFGGAGVGKT	1	20
							KTVLIMELINNAKA	6	69
							REGNDLYNBMIEGGVSLKD	2	80
							REGNDLYNBMIEGGVSLKD	4	95
							REGNDLYNBMIEGGVSLKD Oxidation (M)	5	100
							KVALVYQGMNEPPGARA Oxidation (M)	3	89
							RVALTGLTVAEYFRD	4	75

Table 1 Proteins automatically identified using the Mascot software (Continued)

							RDQEGQDVLDFIDNFRF	6	60
							RFTQAGSEVALLGRJ	3	90
							RIPSAVGYQPTLATDMGSMQERJ	4	73
							RIPSAVGYQPTLATDMGSMQERJ Oxidation (M)	3	93
							RIPSAVGYQPTLATDMGSMQERJ Oxidation (M)	5	86
							RIPSAVGYQPTLATDMGSMQERJ 2 Oxidation (M)	4	78
							RAIAELGIYPAVDPLDSTSRJ	3	30
							RAIAELGIYPAVDPLDSTSRJ	5	54
							RJMDPNIGAEHYNIARG Oxidation (M)	2	20
							KJLDYKS	0	35
							KSLQDIIAILGMDLSEEDKLI Oxidation (M)	10	75
							KSLQDIIAILGMDLSEEDKLTVARA	6	84
							KSLQDIIAILGMDLSEEDKLTVARA Oxidation (M)	5	89
							KSLQDIIAILGMDLSEEDKLTVARA Oxidation (M)	7	67
							RFLSQPFQVAEFTGHAGKL	3	42
							RFLSQPFQVAEFTGHAGKL	5	94
26	protein disulfide isomerase [Aedes aegypti]	gi 157107430	AAEL000641	56.2/53.1	4.9/4.9	9(4)	KIUNGELDHLPEAFYMMGPIEEVVEKA	6	55
							KEEDGVLVLTKD	2	11
							KAVFDGEYTEALKK	3	66
							KAVFDGEYTEALKKF	4	62
							KNHLLFRISKE	2	32
							KILFVTIDADQEDHQRI	4	75
							KKDEVP-SMRI	1	29
							KKDEVPSMRI Oxidation (M)	3	39
							RHHLEEDMAKY Oxidation (M)	2	22
							KMDATANELEHTKJ	0	28

**Table 2 Biological process categories of the identified proteins**

Categories <sup>a</sup>	Number of identified spots
<b>Amino acid Metabolism</b>	<b>10</b>
Aspartate aminotransferase	1
d-3-phosphoglycerate dehydrogenase	2
Alanine aminotransferase	1
Glutamate dehydrogenase	2
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	1
Cystathionine beta-lyase	2
Chain A, Alanine Glyoxylate aminotransferase	1
<b>Response to oxidative stress</b>	<b>5</b>
Catalase	4
Superoxide dismutase, Mn	1
<b>Cell redox homeostasis</b>	<b>8</b>
Thioredoxin reductase	3
Protein disulfide isomerase	1
Dihydrolipoamide dehydrogenase	4
<b>Glycolysis</b>	<b>6</b>
Fructose-bisphosphate aldolase	4
Pyruvate kinase	1
Enolase	1
<b>Proteolysis</b>	<b>1</b>
Leucine aminopeptidase	1
<b>ATP biosynthetic process</b>	<b>6</b>
ATP synthase alpha subunit mitochondrial	4
Mitochondrial F0 ATP synthase D chain, putative	1
ATP synthase beta subunit	1
<b>Electron carrier activity</b>	<b>2</b>
Cytochrome b5, putative	1
Electron transport oxidoreductase	1
<b>Protein folding/chaperons</b>	<b>2</b>
Chaperonin-60kD, ch60	2
<b>Carbohydrate metabolic process</b>	<b>1</b>
Malate dehydrogenase	1
<b>Nitrogen compound metabolic process</b>	<b>1</b>
Aliphatic nitrilase, putative	1
<b>Actin filament polymerization/ Cytoskeleton associated</b>	<b>1</b>
arp2/3 complex 16 kd subunit (P16-arc)	1
<b>Translational elongation / DNA synthesis</b>	<b>1</b>
60S acidic ribosomal protein P2	1
<b>Ketone body catabolic process</b>	<b>1</b>
Succinyl-coa3-ketoacid-coenzyme a transferase	1

**Table 2 Biological process categories of the identified proteins (Continued)**

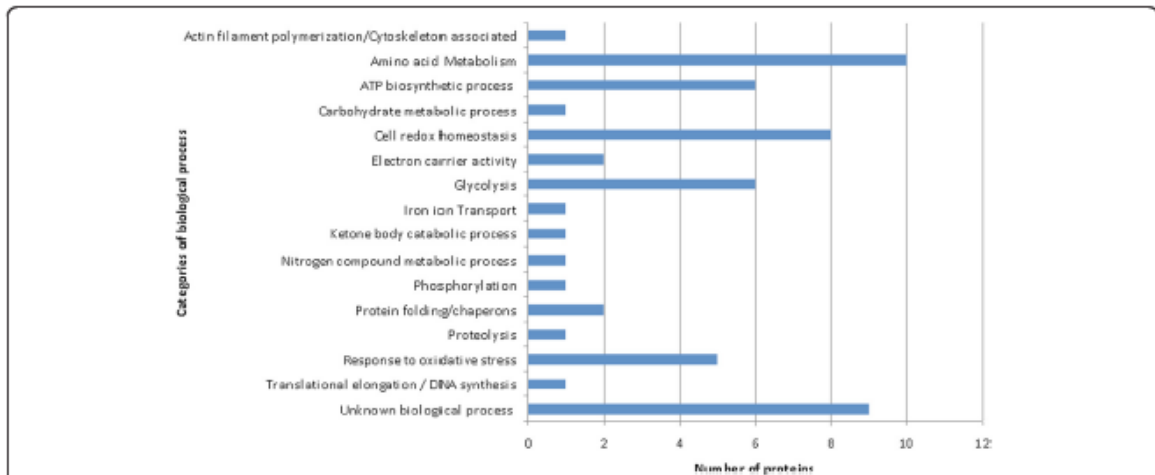
<b>Iron ion Transport</b>	<b>1</b>
Transferrin	1
<b>Phosphorylation</b>	<b>1</b>
Pyridoxine kinase	1
<b>Unknown biological process</b>	<b>9</b>
Anterior fat body protein	2
Conserved hypothetical protein AaeL_AAEL005270 (MF: transferase activity)	1
Phosphatidylethanolamine-binding protein (Immune response)	1
Cyclohex-1-ene-1-carboxyl-CoA hydratase (MF: catalytic activity)	1
Conserved hypothetical protein AaeL_AAEL015064 (MF: protein binding)	1
Lactoylglutathione lyase (MF: Lactoylglutathione lyase activity)	1
rho guanine dissociation factor (MF: Rho GDP-dissociation inhibitor activity)	1
Glutathione s-transferase (MF: protein binding)	1

<sup>a</sup> Categories were taken from Gene Ontology annotations of biological process at VectorBaseDB. MF: Molecular function.

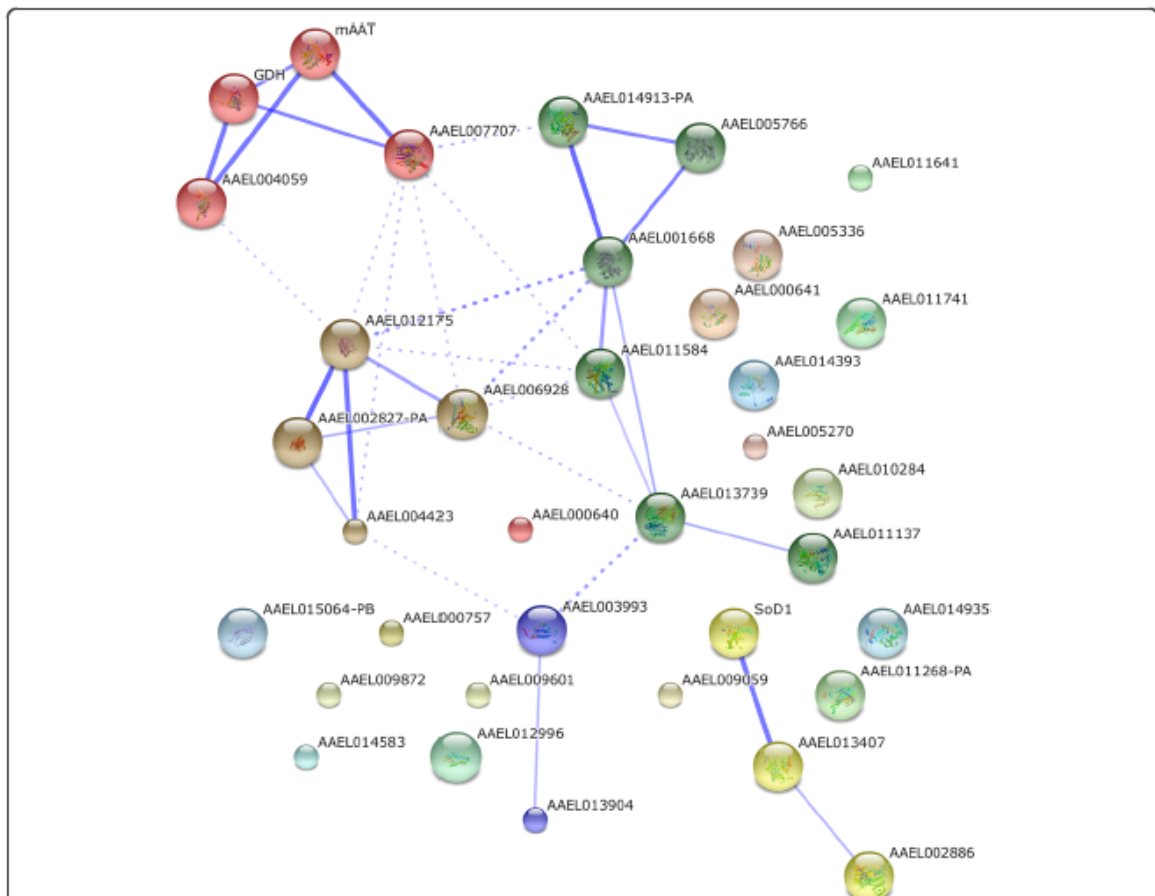
midguts used in this study are from 2–5 day old females, they can present with proteins still remaining from the pupa. Such proteins would serve as substrate for metabolic activities detected, and (iv) given that before midgut dissection the microbiota was present in the midguts, bacteria and proteins produced by them could have induced the activation of insect midgut enzymes involved in amino acid metabolism.

In the third functional association network, the alpha and beta subunits of mitochondrial ATP synthase, dihydrolipoamide dehydrogenase and mitochondrial F0 ATP synthase D chain, which are functionally associated for ATP production, demonstrated consistent interactions (Figure 3, brown cluster). In addition, functional associations among these three groups were observed (Figure 3), revealing the complexity of the interactions required for the energetic metabolism of midgut cells.

The clusters indicated in green and brown both interact independently with a fourth group of functional association that includes the enzymes cyclohex-1-ene-1-carboxyl-CoA hydratase and 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase (Figure 3, blue cluster). Although the VectorBase DB did not assign the biological process in which the cyclohex-1-ene-1-carboxyl-CoA hydratase participates, the STRING analysis indicates that this enzyme could play a role in the interaction between glycolysis and the mitochondrial ATP production pathways. In our work, the enzymes cyclohex-1-ene-1-carboxyl-CoA hydratase



**Figure 2 Classification of the identified proteins in biological processes.** Categories were obtained from the gene ontology annotations of biological process at VectorBase DB.

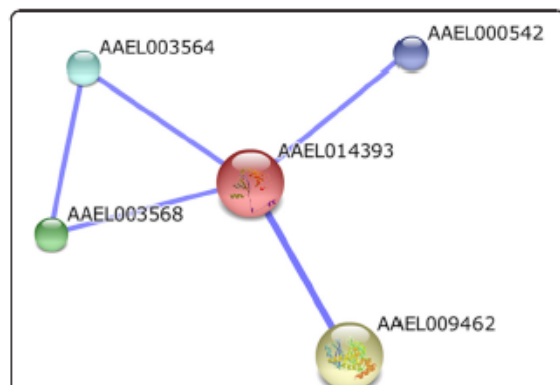


**Figure 3 Predicted functional associations among proteins identified in the midgut of sugar-fed *Ae. albopictus* females.** The proteins were analyzed using the STRING database 9.0. The predicted functional interaction networks are shown in the confidence view where the stronger associations are represented by thicker lines. The numbers correspond to the protein accession numbers in the VectorBase database and are described in Table 1.

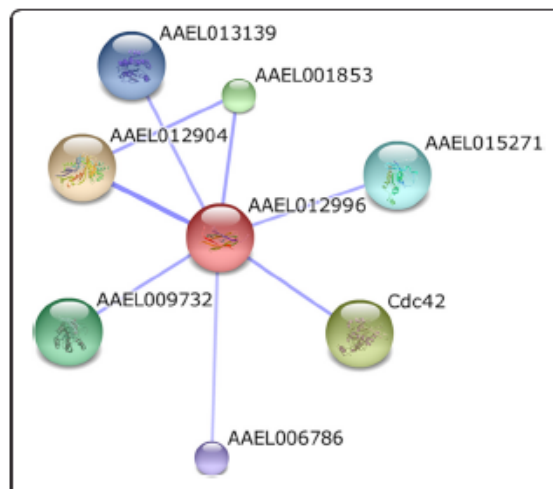


**Figure 4** Predicted functional interactions of the conserved hypothetical protein AAEL015064 as displayed by STRING. The partners in this predicted interaction network potentially participate in the SUMO modification of proteins. The predicted functional interaction networks are shown in the confidence view where the stronger associations are represented by thicker lines. AAEL010641: Ubiquitin-activating enzyme E1; AAEL007858: ran GTPase-activating protein; AAEL000091: sumo-1-activating enzyme E1a; AAEL015099: sumo ligase; AAEL008952: sentrin/sumo-specific protease; PCNA: proliferating cell nuclear antigen; AAEL012584: DNA topoisomerase/gyrase.

and 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase were identified in the same spot (spot 18), and these two enzymes have also been identified together in the proteomic analysis of the midgut brush border membrane vesicles of *Ae. aegypti* [14], supporting the potential functional interaction of



**Figure 5** Predicted functional interactions of the enzyme lactoylglutathione lyase (AAEL014393). The proteins associated in this network participate in pyruvate metabolism. The predicted functional interaction networks are shown in the confidence view where the stronger associations are represented by thicker lines. AAEL009462: hydroxyacylglutathione hydrolase; AAEL003568: threonine dehydratase/deaminase; AAEL000542: conserved hypothetical protein.



**Figure 6** Predicted functional interactions of the rho guanine dissociation factor (AAEL012996). The proteins associated in this network may participate in various signaling pathways. The predicted functional interaction networks are shown in the confidence view where the stronger associations are represented by thicker lines. Cdc42, AAEL009732, AAEL015271: rac GTPases; AAEL012904: rab GDP-dissociation inhibitor; AAEL001853: rac-GTP binding protein; AAEL013139, AAEL006786: GTPase\_rho.

these enzymes. Finally, the enzyme cyclohex-1-ene-1-carboxyl-CoA hydratase has been recently proposed as part of the lipid metabolism pathway in *Ae. albopictus* [24].

The fifth network involves the functional interaction of superoxide dismutase, catalase and thioredoxin reductase, which interact in the detoxification of free radicals (Figure 3, yellow cluster). These enzymes play a key role in detoxification during carbohydrate meals, and it is expected that female midgut constitutively exhibits a substantial repertoire of these enzymes to deal with the intense oxidative stress induced during the digestion and absorption of a blood meal. In fact, it has been demonstrated that the expression of the genes coding for thioredoxin reductase and catalase in *Ae. aegypti* increase after blood feeding [25]. In addition, the expression of thioredoxin reductase and catalase in *Chironomus riparius* during stress by environmental pollutants, such as cadmium chloride, has been proposed as a biomarker of exposition to such contaminants [26,27]. All the other proteins identified in the 2D map appeared as isolated components in the functional association network (Figure 3).

The proteins classified under the "unknown biological process" category were individually submitted to functional association analysis in order to obtain insight into their potential function. No predicted associations were found for AAEL000757, AAEL005270, AAEL011268 and AAEL011741. On the other hand, for the conserved hypo-

thetical protein AAEL015064, STRING predicted confident association with proteins involved in the potential SUMO modification of proteins, such as ubiquitin-activating enzyme E1 (AAEL010641), ran GTPase-activating protein (AAEL007858), sumo-1-activating enzyme E1a (AAEL000091), sumo ligase (AAEL015099), sentrin/sumo-specific protease (AAEL008952), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and DNA topoisomerase/gyrase (AAEL012584) (Figure 4). The SUMO pathway affects several cellular processes such as transport, apoptosis, and transcriptional regulation, among others [28]. Thus, in this work, we have identified a conserved protein that hypothetically plays a role in the SUMOylation pathway.

The enzyme lactoylglutathione lyase (AAEL014393) exhibited predicted functional associations with hydroxyacylglutathione hydrolase (AAEL009462), threonine dehydratase/deaminase (AAEL003568) and with the conserved hypothetical protein (AAEL000542) (Figure 5). According to the KEGG, lactoylglutathione lyase and hydroxyacylglutathione hydrolase participate in the pyruvate metabolism pathway. In addition, lactoylglutathione lyase is involved in the metabolism of threonine.

The rho guanine dissociation factor (AAEL012996) exhibited predicted functional association with rac GTPases (Cdc42, AAEL009732, AAEL015271), rab GDP-dissociation inhibitor (AAEL012904), rac-GTP binding protein (AAEL001853) and GTPase\_rho (AAEL013139, AAEL006786) (Figure 6). The GTPases of the Rho subfamily are involved in various signaling pathways that regulate the cell cycle progression and tissue morphogenesis [29,30]. It has also been demonstrated that rac GTPases participate in the *Drosophila* anti-parasitoid immune response [31].

Finally, although no predicted associations were found for phosphatidylethanolamine-binding protein (AAEL011268), this protein was shown to be associated with a protective effect against bacterial infection in *Drosophila* [32].

## Conclusion

In this study, we used 2DE combined with LC-MS/MS and data mining for mapping and identifying proteins expressed in the midgut of *Ae. albopictus* females fed exclusively on sugar. Analyses of subproteomes such as the one performed here, permit proteins with unknown function to be assigned to specific anatomical locations. In addition, data mining allowed us to assign potential functions to these proteins based on the functional association predictions. Our results also provided, for the first time, evidence on the expression and localization of proteins that were primarily assigned as hypothetical, thereby validating previous genome sequence predictions made in *Ae. aegypti*. This preliminary map of the *Ae. albopictus* midgut proteins will allow future comparisons of gene expression from the midgut of females fed

with blood, making possible the identification of proteins that are exclusively expressed under a specific feeding condition.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

JB, LSV and PC designed the study. LSV, ABV, CMR, and MJ performed the experimental work. LSV, PC and JB analyzed the data and prepared the manuscript with the critical input of MJ, GBD and CB. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

This was supported by FAPEMIG (APQ-02093-09), FIOCRUZ-IOC, CNPq and CAPES. We thank Prof. Dr. Nildimar Honorio (Laboratório de Transmissores de Hematozoários of the Instituto Oswaldo Cruz) for kindly providing the insects.

## Author details

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>2</sup>Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>3</sup>Unidade de Proteômica, Laboratório de Química de Proteínas, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>4</sup>Departamento de Engenharia de Biosistemas, Universidade Federal de São João Del Rey, Minas Gerais, Brazil. <sup>5</sup>Laboratório de Bioquímica e Química Proteínas, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil.

Received: 30 September 2012 Accepted: 30 November 2012

Published: 11 December 2012

## References

- WHO: *Yellow fever factsheet*. Geneva: World Health Organization; 2001.
- Hsieh YH, Chen CW: Turning points, reproduction number, and impact of climatological events for multi-wave dengue outbreaks. *Top Med Int Health* 2009, **14**:628–638.
- Angelini R, Finarelli AC, Angelini P, Po C, Petropulacos K, Macini P, Fiorentini C, Fortuna C, Venturi G, Romi R, Majoři G, Nicoletti L, Rezza G, Cassone A: An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna. *Italy. Euro Surveill* 2007, **12**:E070906.1.
- Gomes Ade C, Bitencourt MD, Natal D, Pinto PL, Mucci LF, de Paula MB, Urbanati PR, Barata JM: *Aedes albopictus* in rural zone of Brazil and its implication in the wild yellow fever transmission. *Rev Saude Publica* 1999, **33**:95–97.
- Rai KS: Genetics of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 1986, **2**:429–436.
- Raikhel AS, Dhadialla TS: Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu Rev Entomol* 1992, **37**:217–251.
- Ribeiro JM: Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 1995, **4**:143–152.
- Ribeiro JM, Francischetti IM: Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol* 2003, **48**:73–88.
- Wasinpiyamongkol L, Patramool S, Luplettlop N, Surasombattapanna P, Doucoure S, Mouchet F, Séveno M, Remoue F, Demetree E, Brizard JP, Jouin P, Biron DG, Thomas F, Missé D: Blood-feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins. *Proteomics* 2010, **10**:1906–1916.
- Fontaine A, Pascual A, Diouf I, Bakkali N, Bourdon S, Fusai T, Rogier C, Almeras L: Mosquito salivary gland protein preservation in the field for immunological and biochemical analysis. *Parasit Vectors* 2011, **4**:33.
- Juhn J, Naeem-Ullah U, Guedes B, Majid A, Coleman J, Pimenta P, Akram W, James A, Marinotti O: Spatial mapping of gene expression in the salivary glands of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Parasit Vectors* 2011, **4**:1.
- Sánchez-Vargas I, Scott JC, Poole-Smith BK, Franz AW, Barbosa-Solomieu V, Wilusz J, Olson KE, Blair CD: Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000299.
- Bayareddy K, Andacht TM, Abdullah MA, Adang M: Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect Biochem Mol Biol* 2009, **39**:279–286.



14. Popova-Butler A, Dean DH: Proteomic analysis of the mosquito *Aedes aegypti* midgut brush border membrane vesicles. *J Insect Physiol* 2009, **55**:264–272.
15. Beyenbach KW, Baumgart S, Lau K, Pierrarini FM, Zhang S: Signaling to the apical membrane and to the paracellular pathway: changes in the cytosolic proteome of *Aedes* Malpighian tubules. *J Exp Biol* 2009, **212**:329–340.
16. Sirot LK, Hardstone MC, Helinski ME, Ribeiro JM, Kimura M, Deewatthanawong P, Wollner MF, Harrington LC: Towards a semen proteome of the dengue vector mosquito: protein identification and potential functions. *PLoS Negl Trop Dis* 2011, **5**:e989.
17. Patramool S, Surasombattana P, Luplertlop N, Séveno M, Choumet V, Thomas F, Missé D: Proteomic analysis of an *Aedes albopictus* cell line infected with Dengue serotypes 1 and 3 viruses. *Parasit Vectors* 2011, **4**:138.
18. Cuervo P, De Jesus JB, Saboia-Vahia I, Mendonça-Lima L, Domont GB, Cupolillo E: Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *J Proteomics* 2009, **73**:79–92.
19. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W: Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988, **9**:255–262.
20. De Jesus JB, Cuervo P, Junqueira M, Britto C, Silva-Filho FC, Soares MJ, Cupolillo E, Fernandes O, Domont GB: A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics* 2007, **7**:1961–1972.
21. Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Müller J, Doerks T, Julien P, Roth A, Simonovic M, Bork P, von Mering C: STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res* 2009, **37**:D412–D416.
22. Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguéz P, Doerks T, Stark M, Müller J, Bork P, Jensen LJ, von Mering C: The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res* 2011, **39**:D561–D568.
23. Tchankouo-Nguetchou S, Khun H, Pincet L, Roux P, Bahut M, Huere M, Guette C, Choumet V: Differential protein modulation in midguts of *Aedes aegypti* infected with chikungunya and dengue 2 viruses. *PLoS One* 2010, **5**:e13149.
24. Reynolds J, Poelchau MF, Rahman Z, Armbruster PA, Denlinger DL: Transcript profiling reveals mechanisms for lipid conservation during diapause in the mosquito, *Aedes albopictus*. *J Insect Physiol* 2012, **58**:966–973.
25. Sanders HR, Evans AM, Ross LS, Gill SS: Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 2003, **33**:1105–1122.
26. Nair PM, Park SY, Choi J: Expression of catalase and glutathione S-transferase genes in *Chironomus riparius* on exposure to cadmium and nonylphenol. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2011, **154**:399–408.
27. Nair PM, Choi J: Characterization and transcriptional regulation of thioredoxin reductase 1 on exposure to oxidative stress inducing environmental pollutants in *Chironomus riparius*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2012, **161**:134–139.
28. Hay RT: SUMO: A history of modification. *Mol Cell* 2005, **18**:1–12.
29. Settleman J: Rac 'n Rho: the music that shapes a developing embryo. *Dev Cell* 2001, **1**:321–331.
30. Pirraglia C, Myat MM: Genetic regulation of salivary gland development in *Drosophila melanogaster*. *Front Oral Biol* 2010, **14**:32–47.
31. Xavier MJ, Williams MJ: The Rho-family GTPase Rac1 regulates integrin localization in *Drosophila* immunosurveillance cells. *PLoS One* 2011, **6**:e19504.
32. Reumer A, Bogaerts A, Van Loy T, Hussen SJ, Temmerman L, Choi C, Clynen E, Hassan B, Schoofs L: Unraveling the protective effect of a *Drosophila* phosphatidylethanolamine-binding protein upon bacterial infection by means of proteomics. *Dev Comp Immunol* 2009, **33**:1186–1195.

doi:10.1186/1756-3305-5-290

Cite this article as: Saboia-Vahia et al.: Protein expression in the midgut of sugar-fed *Aedes albopictus* females. *Parasites & Vectors* 2012 **5**:290.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit

## **5.4 - Artigo 4**

Dear Dr De Jesus,

The files for your manuscript have been received by Parasites & Vectors. You will shortly receive a further e-mail that will provide you with links to the PDF that is now being generated and will be used for assessing it. At any time, you may log in to My BioMed Central (<http://www.biomedcentral.com/my/manuscripts>) to view the status of the manuscript, or you can bookmark the URL of your manuscript:

[http://www.parasitesandvectors.com/manuscript/login/man.asp?txt\\_nav=man&txt\\_man\\_id=1068786931065399](http://www.parasitesandvectors.com/manuscript/login/man.asp?txt_nav=man&txt_man_id=1068786931065399)

If you have any questions, please visit the BioMed Central Support Center (<http://www.biomedcentral.com/support/>) or e-mail us at [chris.arme@gmail.com](mailto:chris.arme@gmail.com).

Questionnaire

Thank you for submitting your research to Parasites & Vectors. To help us understand what is important to our authors, please take a minute to complete our simple online questionnaire by following this link:

[http://www.biomedcentral.com/survey/login/1189590391711938/1068786931065399/AS1](http://www.biomedcentral.com/survey/login/1189590391711938/1068786931065399/AS1/)  
/

You may be prompted to log on when you follow this link.

Regards

The Parasites & Vectors Editorial Team

e-mail: [chris.arme@gmail.com](mailto:chris.arme@gmail.com)

Web: <http://www.parasitesandvectors.com/>

**The midgut of *Aedes albopictus* females expresses active trypsin-like serine peptidases**

Leonardo Saboia-Vahia<sup>1</sup>; Patricia Cuervo<sup>2\*</sup>; Andre Borges-Veloso<sup>1</sup>; Nathalia Pinho de Souza<sup>2</sup>; Constança Britto<sup>1</sup>; Geovane Dias-Lopes<sup>1</sup>; Jose Batista De Jesus<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas – Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose – Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>3</sup> Departamento de Engenharia de Biosistemas – Universidade Federal de São João Del Rey, Minas Gerais, Brazil.

**\*Correspondence to:**

Dr. Jose B. De Jesus and Dr. Patricia Cuervo

JB. Departamento de Engenharia de Biosistemas, Universidade Federal de São João del Rei, São João del Rei, MG, Brazil. Phone: +55-32-3379-2483. E-mail: [jbj@ioc.fiocruz.br](mailto:jbj@ioc.fiocruz.br)

PC. Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. Av. Brasil 4365, Manguinhos, Pav. 26, Sala 509. Phone: +55-21-3865-8224.

E-mail: [pcuervo@fiocruz.br](mailto:pcuervo@fiocruz.br)

**E mail addresses:**

Leonardo Saboia-Vahia: [leovahia@ioc.fiocruz.br](mailto:leovahia@ioc.fiocruz.br)

Patricia Cuervo: [pcuervo@fiocruz.br](mailto:pcuervo@fiocruz.br)

Andre Borges-Veloso: [abv@ioc.fiocruz.br](mailto:abv@ioc.fiocruz.br)

Nathalia Pinho de Souza: [nathps11@gmail.com](mailto:nathps11@gmail.com)

Constança Britto: [cbritto@ioc.fiocruz.br](mailto:cbritto@ioc.fiocruz.br)

Geovane Dias-Lopes: [geovane.dl@gmail.com](mailto:geovane.dl@gmail.com)

Jose B De Jesus: [jbj@ioc.fiocruz.br](mailto:jbj@ioc.fiocruz.br)

**Keywords:** *Aedes albopictus*; culicidae; midgut; zymography; proteomics; two-dimensional electrophoresis; mass spectrometry.

## Abstract

**Background:** *Aedes albopictus* is widely distributed across tropical and sub-tropical regions and is associated with the transmission of several arboviruses. Although this species is increasingly relevant to public health due its ability to successfully colonize both urban and rural habitats, favoring the dispersion of viral infections, little is known about its biochemical traits, with all assumptions made based on studies of *A. aegypti*. In previous studies we characterized the peptidase profile of pre-imaginal stages of *A. albopictus* and we reported the first proteomic analysis of the midgut from sugar-fed females of this insect species.

**Methods:** In the present work, we further analyzed peptidase expression in the midgut of sugar-fed females using 1DE-substrate gel zymography, two-dimensional electrophoresis (2DE), mass spectrometry, and protein identification based on similarity.

**Results:** This multi-methodological approach allowed us to identify the active serine peptidase “fingerprint” in the midgut of *A. albopictus* females. The proteolytic profile is composed of at least 10 bands of trypsin-like serine peptidases ranging ~25 to 130 kDa. In addition, trypsin-like serine peptidases and chymotrypsin were identified in the 2DE map of the *A. albopictus* female midgut by similarity to the *A. aegypti* sequences.

**Conclusion:** These results allowed us to detect, identify and characterize the expression of active trypsin-like serine peptidases in the midgut of sugar-fed *A. albopictus* females. In addition, proteomic analysis allowed us to confidently assign the expression of two trypsin genes and one chymotrypsin gene to the midgut of this mosquito. These results contribute to the gene annotation in this species of unknown genome and represent a small but important step toward the protein-level functional and localization assignment of trypsin-like serine peptidase genes in the *Aedes* genus.

## Background

*Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) has a wide geographic distribution, covering all tropical and subtropical regions of the world, and is a vector for the viruses responsible for yellow fever and dengue. The World Health Organization estimates that more than 50-100 million cases of these two diseases can occur per year throughout the world (1-3). In Brazil, *A. albopictus* has been reported in 21 states and 1,502 municipalities (4). In recent years, the relevance of this species to public health has increased because it is able to successfully colonize both urban and rural habitats, favoring the dispersion and interchange of the virus from one area to another, and thereby enabling the emergence of new areas of disease in small and large cities.

The hydrolysis of proteins to amino acid residues by proteolytic enzymes is an important step in food digestion, protein turnover and proteostasis in eukaryotes (5, 6). Proteolytic enzymes are divided into endopeptidases and exopeptidases. Endopeptidases are relatively small molecules (~25-30 kDa) that can pass through peritrophic membrane pores and endoperitrophic spaces in insects, where they cleave large protein complexes. Exopeptidases are large enzymes (>100 kDa) that are usually linked to the plasma membrane of the epithelium and hydrolyze the ends of small proteins and peptides (N-terminus or C-terminus) (7). Among endopeptidases, trypsin-like and chymotrypsin-like serine peptidases are the most important enzymes for most insects, except for some species of coleoptera and hemiptera (8-13).

Serine peptidases are divided into families and subfamilies. The subfamily S1 consists of trypsins, chymotrypsins and elastases, and some serine collagenases were also recently included. The catalytic triad of serine peptidases is typically characterized by serine, histidine and aspartic acid residues (14, 15). This triad hydrolyzes peptide bonds at the carboxylic ends of basic amino acids, with a 2-10-fold preference for Arg over Lys

(16-18). The *A. aegypti* genome contains 369 genes coding for serine peptidases, among which 66 are putative trypsins (19), but only 5 (three trypsins and two chymotrypsins) are well characterized in the midgut of females of this insect (10-13, 20). The expansion of trypsin-like serine peptidase genes in mosquitoes has been shown to coincide with the development of the hematophagous trait (21). Trypsin-like serine peptidases in these insects play pivotal roles in oogenesis, immunity, metamorphosis, modulation of embryonic development and nutrition (22, 23). These enzymes are mostly located in the insect midgut so that they can provide energy and essential amino acids for development (17, 24). Furthermore, secretion of trypsin-like serine peptidases into the lumen of the midgut is involved in defense against pathogens (25, 26). However, in the insect vector *Anopheles gambiae*, trypsin-like enzymes are exploited by pathogens such as *Plasmodium* sp. to activate their own peptidases, thus allowing the parasite to cross the peritrophic membrane and continue its developmental life cycle (27).

The plasticity exhibited by trypsin-like serine peptidases enables these enzymes to modulate various biological processes in vector insects. Because of this characteristic, serine peptidases have been proposed as potential targets for insect control approaches. The biochemical characterization of these enzymes may thus support the development of new control strategies, enabling their appropriate use as targets and suggesting ways to interfere with the production of these enzymes or with the metabolic pathways in which they participate (28, 29).

In previous studies, we characterized the peptidase profile of the pre-imaginal stages of *A. albopictus* (30) and reported the first proteomic analysis of the midgut of sugar-fed females of this insect species (30). In the present work, we further analyze the peptidase expression in the midgut of sugar-fed females using two-dimensional electrophoresis (2DE), mass spectrometry, 1DE-substrate gel, and data mining. This multi-

methodological approach allowed us to identify the active serine peptidase “fingerprint” in the midgut of *A. albopictus* females.

## Methods

### Chemicals

To prepare the phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) stock solution, 250 mM of the reagent was diluted in isopropanol. N $\alpha$ -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride (TLCK) and N-p-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) were dissolved in methanol, both at 100 mM. Stock solutions of 1,10-phenanthroline (200 mM) and pepstatin A (1 mg/ml) were prepared in ethanol, and trans-epoxysuccinyl L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64, 10 mM) was prepared in water. Stock and working solutions were maintained at  $-20$  °C. All chemicals were purchased from Sigma Chem. Co. (USA), unless otherwise specified.

### Insect rearing and gut dissection

*Aedes albopictus* specimens reared in a closed colony (Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro) were kindly provided by Dr. Nildimar A. Honorio. Mosquitoes were maintained on a 10% sucrose diet at  $25\pm 1$  °C, with a relative humidity of  $60\pm 10\%$  and a light:dark photoperiod of 14:10 h. For each experiment, 50 female adults (2-5 days old) were cold-anesthetized on ice and decapitated. Midgut dissection was performed as previously described (30).



### Zymography and peptidase inhibition assays

For proteolytic assessment, midguts were washed twice with PBS pH 7.2 and lysed as previously described (30). Briefly, midguts were lysed with a cell disruption motor drive and pestle in a tube containing 10% glycerol, 0.6% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl pH 6.8 and 150 mM NaCl (31). The concentration of the resulting extracts was determined using the Pierce 660 nm Protein assay (Thermo Scientific). For protein separation, 30  $\mu$ g of protein were loaded in 12% polyacrylamide gels copolymerized with 0.1% porcine gelatin as the substrate. Electrophoreses were performed at 4 °C with a constant voltage of 110 V. Peptidase activity was detected as previously reported (30) with few modifications. The gels were incubated at 37 °C for 2, 4, 6, 12 or 24 h in reaction buffer containing 100 mM sodium acetate (at pH 3.5 or 5.5) or 100 mM Tris-HCl (pH 7.5 or 10.0). Substrate degradation was visualized as clear bands after staining the gels with 0.2% Coomassie blue R-250 in methanol/acetic acid (40:10) and destaining in 10% acetic acid. The relative molecular masses of the activity bands were estimated by comparison with the mobility of a commercial molecular mass standard (PageRuler™ Protein Ladder, Fermentas). To determine the classes of peptidases detected by zymography, peptidase inhibition assays were conducted. Midgut homogenates were pre-incubated (before electrophoresis) for 30 min at 4 °C with one of the following peptidase inhibitors: 20  $\mu$ M E-64, 5 mM PMSF, 100  $\mu$ M TLCK, 100  $\mu$ M TPCK, 10  $\mu$ M pepstatin-A or 10 mM 1,10-phenanthroline. After electrophoresis, inhibitors were added to the reaction buffer at the same concentration, and the peptidases were resolved as described above. The results were derived from three independent experiments carried out in triplicate.

### **In-solution enzymatic assays**

The effects of pH and peptidase inhibitors on the proteolytic activities of midgut homogenates were also evaluated by in-solution assays using the fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-AMC. For both assays, 100  $\mu$ M of substrate was used. The reactions were initiated by diluting 10  $\mu$ g of protein from the midgut in 100 mM sodium acetate (at pH 3.5 or 5.5) or 100 mM Tris-HCl (pH 7.5 or 10.0) for pH evaluation or 100 mM Tris-HCl pH 7.5 with or without 100  $\mu$ M TLCK, 100  $\mu$ M TPCK, 20  $\mu$ M E-64 or 5 mM PMSF. The fluorescence intensity was measured by spectrofluorometry every 5 min for a 60 min period (SpectraMax Gemini XPS, Molecular Devices, CA) using excitation and emission wavelengths of 380 and 460 nm, respectively. All assays were performed at 37 °C. The results were derived from three independent experiments performed in triplicate.

### **2DE electrophoresis and protein identification**

Protein extraction, separation and identification were performed as previously described (30). Briefly, 50 pooled midguts were mechanically disrupted with a pestle and a motor drive in a tube containing lysis buffer (9 M urea, 4% CHAPS, 65 mM dithiothreitol, DTT, and 1% ampholytes, pH 3-10, with 5 mM PMSF and a protease inhibitor cocktail). Proteins were precipitated and resuspended in 9 M urea, 4% CHAPS, 65 mM DTT and 1% ampholytes, pH 3-10 NL. The protein concentration was determined using the 2D Quant Kit (GE Healthcare), and 100  $\mu$ g were subjected to isoelectric focusing over a nonlinear pH gradient of 3-10 on a 7 cm strip (GE Healthcare) on an Ettan IPGphor 3 instrument (GE Healthcare). The focusing parameters were set as previously described (30). After reduction and alkylation, proteins were separated vertically across 12% SDS-PAGE gels using standard Tris/glycine/SDS buffer. Gels were stained with colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250, documented using a GS-800™ calibrated imaging densitometer

(Bio-Rad) and analyzed using PDQuest™ software (Bio-Rad). Experimental *pI* and *Mr* were calibrated using a select set of reliable identification landmarks distributed throughout the entire gel.

Protein digestion, peptide extraction and analysis by mass spectrometry were performed as previously described (30). Raw MS files were converted to MGF format using Mass Matrix MS Data File converter V. 3.9 <http://www.massmatrix.net/mm-cgi/downloads.py>. To maximize search sensitivity and peptidase identification, the data were searched using OMSSA (32) within the Proteomatic platform 1.2.1 (33) <http://www.proteomatic.org/download.html> and the Mascot MS/MS ion search engine ([www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html), Matrix Science, Oxford, UK, free online version). As the genome sequences of *A. albopictus* are not available, mass spectra were searched in OMSSA against an *A. aegypti* database downloaded (May 2013) from UniRef100 (34) <http://www.uniprot.org/>, and in MASCOT against the non-redundant database of the National Center for Biotechnology (NCBI). Searches were performed with one missed cleavage, with carbamidomethylation of cysteine residues as a fixed modification, methionine oxidation as a variable modification and mass tolerances of 2.0 and 0.8 Da in OMSSA and 10 ppm and 0.4 Da in MASCOT for precursor and fragment ions, respectively. The Vectorbase database ([www.vectorbase.org](http://www.vectorbase.org)) was used to search for sequence information about the identified peptidases.

## Results and discussion

### The *A. albopictus* female midgut exhibits a complex profile of active peptidases

To evaluate the influence of time on the peptidase activities of the midguts of sugar-fed females, we evaluated the proteolytic profiles after 2, 4, 6 12 and 24 h of incubation at 37 °C in pH 7.5 using 1D zymography (Figure 1). The proteolytic profile is composed of at

least 10 bands displaying progressive increases in intensity from 2 to 24 h of incubation. However, the proteolytic bands overlapped at 24 h, and for this reason, 12 h was chosen for subsequent analyses. The band size range from ~25 to 130 kDa. Zymography of the *A. albopictus* midgut allowed for the visualization of active proteolytic enzymes and for the characterization of their relative electrophoretic mobility. The proteolytic activities of this mosquito have received little study, focusing mainly on larval activities and on comparisons with *A. aegypti* (35). Comparisons between the previously reported peptidase profiles from the larval and pupal stages of *A. albopictus* (30) with the profile from the adult midgut obtained here reveals a similar banding pattern of enzymatic activity, suggesting that the peptidases expressed as part of the adult proteolytic machinery are already expressed in the pre-imaginal stages, where they mainly seem to play roles in digestion. Given that this work studied sugar-fed females, the proteolytic profile detected here is likely constitutively expressed by the mosquito throughout its life cycle. The enzymatic activity profile of the adult midgut was more complex after 12 h of reaction compared with the profile previously described for larvae (30) detected after 2 h of reaction, suggesting that these enzymes are expressed at lower levels in the adult stage of this insect. In fact, a reduction in the expression of active peptidases involved in digestion after the last larval ecdysis has been reported for *A. aegypti* and *A. albopictus* using in-solution assays and total protein extracts (36, 37). In sugar-fed females of *A. aegypti*, the expression of trypsin-like serine peptidases at the transcriptional level (“early trypsin”) has been associated with the activation of other digestive enzymes or other trypsin isoforms that will only be expressed after the ingestion of a blood meal (20, 24, 38). In addition, although transcriptomic analysis of *A. aegypti* revealed that adults exclusively express 15 trypsin genes while larvae express 12, both stages share the expression of 39 trypsin coding genes, and the genes expressed by larvae should be more active than those of adults

because larvae are constantly feeding (19). Given the taxonomic proximity between *A. albopictus* and *A. aegypti*, trypsin expression in adults of *A. albopictus* is likely similar to the expression pattern in larvae.

### **Peptidases from the *A. albopictus* female midgut have optimal activities between pH 7.5 and 10.0**

We observed that the proteolytic activities of the midgut are modulated by the pH of the reaction buffer. While peptidase activities were detected as low as pH 5.5, the intensity of these activities was increased at alkaline pH between 7.5 and 10.0. Little activity was detected at pH 3.5 (Figure 2A). Although the activities seem to be optimal at pH 10.0, several bands overlap, preventing accurate analysis. For this reason, all subsequent assays were conducted at pH 7.5. The effect of pH on peptidase activity was corroborated by in-solution assays using fluorogenic substrates (Figure 2B). Similar to data obtained previously for larvae instars and pupae (30), peptidases from the *A. albopictus* adult midgut exhibited optimal activities at alkaline pH. This characteristic has also been observed for other Diptera such as *Culex quinquefasciatus* (5) and *L. longipalpis* (39) using both in-gel and in-solution assays. According to previous reports, the activities of enzymes involved in digestion processes are optimal at alkaline pH (35, 36, 37). Therefore, the data obtained here suggest that the proteolytic activities observed in the midgut are mainly involved in nutrient processing.

### **Proteolytic activities in the *A. albopictus* female midgut mainly arise from trypsin-like serine peptidases**

Inhibition assays were conducted using specific peptidase inhibitors to ascertain the classes of peptidase activities detected in the midgut of *A. albopictus* females. The proteolytic

activities were inhibited by 1 mM PMSF and 100  $\mu$ M TLCK (Figure 3A). The zymographic profile was not affected by 100  $\mu$ M TPCK, 10  $\mu$ M E-64 (Figure 3A), 10  $\mu$ M pepstatin A or 10 mM 1,10-phenanthroline (data not shown). As PMSF and TLCK are inhibitors of serine peptidases and trypsin-like serine peptidases, respectively, these results indicate that the main peptidases detected by zymography in the female midgut are trypsin-like serine peptidases. Protein extracts from the female midgut were also reacted with the fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-AMC in the presence or absence of 5 mM PMSF, 100  $\mu$ M TLCK, 100  $\mu$ M TPCK or 20  $\mu$ M E-64. These activities were again strongly inhibited by PMSF and TLCK, but not by TPCK, (Figure 3B) corroborating the in-gel results. A slight but insignificant inhibition by E-64 was also observed (Figure 3C). The occurrence of trypsin-like serine peptidases has been described in the larvae of *A. aegypti* and *A. albopictus* using both in-solution assays (35, 36) and zymographic analysis (30, 40). The main peptidases detected in other Diptera species also belong to the serine peptidase class (39, 41, 42).

#### **Trypsin-like serine peptidases and chymotrypsin were identified in the 2DE map of the *A. albopictus* female midgut**

With the aim of identifying the peptidases detected in the zymographic assays, several protein spots resolved in the alkaline region of 2D gels from the *A. albopictus* female midgut were excised and analyzed by MS. Two protein spots corresponding to trypsin alpha (AAEL008079) and trypsin (AAEL006425), respectively, and one spot corresponding to chymotrypsin (AAEL009680) were identified by their similarity to the *A. aegypti* sequences through the two search engines used for protein identification (Figure 4, Table 1). When the protein spots identified in the 2DE gel were compared to the proteolytic profile by 1D zymography, we observed that the molecular masses of

peptidases identified by 2DE correspond to the apparent molecular masses of some of the proteolytic bands. The sequence alignment of both trypsin genes demonstrates very little similarity among the sequences. In addition, the peptide sequences identified by MS/MS for each gene are also different (Figure 5). Interestingly, while a chymotrypsin gene was identified by MS/MS in the midgut 2DE map, we did not observe this peptidase activity in the zymographic assays. This result may indicate that (i) this enzyme is expressed in the midgut of sugar-fed females but is not active under these conditions, or (ii) that the experimental conditions used in the zymographic assays such as the substrate, time, pH, and co-factors, are not appropriate for the detection of chymotrypsin activity. Therefore, new experimental conditions should be tested for the detection of the activity of this enzyme.

Although the *A. aegypti* genome has been reported to code for 380 trypsin-like serine peptidases, constituting one of the largest gene families in mosquitoes (21), the interrogation of the Vectorbase database using the words “trypsin” or “chymotrypsin” reveals only 80 coding genes for trypsin and 5 coding genes for chymotrypsin in the *A. aegypti* genome, among which are the genes identified here. As these peptidases are members of large gene families, it is difficult to ascertain which protein is expressed and active in a specific life cycle stage, in a specific tissue, under a specific condition. Our study shows the potential value of proteomic approaches combined with zymographic analysis for the identification and localization assignment of specific gene products.

## Conclusion

The results obtained in this work allowed us to detect, identify and characterize the expression of active trypsin-like serine peptidases in the midgut of sugar-fed *A. albopictus* females. In addition, proteomic analysis allowed us to confidently assign the expression of

two trypsin genes and one chymotrypsin gene to the midgut of this mosquito. These results contribute to the gene annotation in this species of an unknown genome and represent a small but important step toward the protein-level functional assignment of trypsin-like serine peptidase genes in the *Aedes* genus. As peptidases exert crucial roles during host-pathogen interactions and the midgut is the main setting for these interactions in blood feeding vector mosquitoes, the mapping and identification of the constitutively expressed peptidase profile in this tissue may allow for the comparison of the regulation of such enzymes in infected insects and/or mosquitoes fed on blood. Such approaches may produce valuable information on the roles of peptidases during host-pathogen interactions.



### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Authors' contributions**

JBj, LSV and PC designed the study. LSV, ABV, NPS and GDL performed the experimental work. LSV, PC and JBj analyzed the data and prepared the manuscript with the critical input of CB. All authors read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgements**

This work was supported by FAPEMIG (Edital Universal Process No. APQ-01070-12), FIOCRUZ-IOC, CNPq and CAPES. We thank Prof. Dr. Nildimar Honorio (Laboratório de Transmissores de Hematozoários of the Instituto Oswaldo Cruz) for kindly providing the insects.

## References

- 1 - WHO. *Yellow fever factsheet*, Geneva: World Health Organization; 2001
- 2 - Hsieh YH, Chen CW: **Turning points, reproduction number, and impact of climatological events for multi-wave dengue outbreaks.** *Trop Med Int Health.* 2009, **14**:628-38.
- 3 - Angelini R, Finarelli AC, Angelini P, Po C, Petropulacos K, Macini P, Fiorentini C, Fortuna C, Venturi G, Romi R, Majori G, Nicoletti L, Rezza G, Cassone A: **An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy** *Euro Surveill.* 2007, **12**:E070906.1.
- 4 - Gomes Ade C, Bitencourt MD, Natal D, Pinto PL, Mucci LF, de Paula MB, Urbinatti PR, Barata JM: ***Aedes albopictus* in rural zone of Brazil and its implication in the wild yellow fever transmission.** *Rev Saude Publica.* 1999, **33**:95-97.
- 5 - Borges-Veloso A, Saboia-Vahia L, Cuervo P, Pires RC, Britto C, Fernandes N, d'Avila-Levy CM, De Jesus JB: **Proteolytic profiling and comparative analyses of active trypsin-like serine peptidases in preimaginal stages of *Culex quinquefasciatus*.** *Parasit Vectors.* 2012, **5**:123.
- 6 - Bartoszewska M, Williams C, Kikhney A, Opaliński Ł, van Roermund CW, de Boer R, Veenhuis M, van der Klei IJ: **Peroxisomal proteostasis involves a Lon family protein that functions as protease and chaperone.** *J Biol Chem.* 2012, **287**:27380-95.

- 7 - Weidlich S, Huster J, Hoffmann KH, Woodring J: **Environmental control of trypsin secretion in the midgut of the two-spotted field cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.* 2012, **58**:1477-84.**
- 8 - Wolfson, JL, Murdock, LL: **Diversity in digestive proteinase activity among insects. *J. Chem. Ecol.* 1990, **16**: 1089–1102**
- 9 - Felix CR, Betschart B, Billingsley PF, Freyvogel TA: **Post -feeding induction of trypsin in the midgut of *Aedes aegypti* is separable into two cellular phases. *Insect Bioch* 1991, **21**:197–203.**
- 10 - Barillas-Mury C, Wells MA: **Cloning and sequencing of the blood meal-induced late trypsin gene from the mosquito *Aedes aegypti* and characterization of the upstream regulatory region. *Insect Mol Biol* 1993, **2**:7–12.**
- 11 - Kalhok SE, Tabak LM, Prosser DE, Brook W, Downe AE, White BN: **Isolation, sequencing and characterization of two cDNA clones coding for trypsin-like enzymes from the midgut of *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 1993, **2**:71–79.**
- 12 - Jiang Q, Hall M, Noriega FG, Wells M: **cDNA cloning and pattern of expression of an adult, femalespecific chymotrypsin from *Aedes aegypti* midgut. *Insect Biochem Mol Biol* 1997, **27**:283–289.**

- 13 - Bian G, Raikhel AS, Zhu J: **Characterization of a juvenile hormone-regulated chymotrypsin-like serine protease gene in *Aedes aegypti* mosquito.** *Insect Biochem Mol Biol* 2008, **38**:190–200.
- 14 - Polgár L: **The catalytic triad of serine peptidases.** *Cell Mol Life Sci* 2005, **62**:2161–2172.
- 15 - Rawlings ND, Barrett AJ: **Families of serine peptidases.** *Meth Enzymol* 1994, **244**:19–61.
- 16 - Craik CS, Largman C, Fletcher T, Rocznik S, Barr PJ, Fletterick R, Rutter WJ: **Redesigning trypsin: alteration of substrate specificity.** *Science*. 1985, **228**: 291-297.
- 17 - Terra WR & Ferreira C: **Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function.** *Comp Biochem Physiol*. 1994, **109**: 1-62.
- 18 - Barrett AJ: **Bioinformatics of proteases in the MEROPS database.** *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2004, **7**:334-341.
- 19 - Venancio TM, Cristofolletti PT, Ferreira C, Verjovski-Almeida S, Terra WR: **The *Aedes aegypti* larval transcriptome: a comparative perspective with emphasis on trypsins and the domain structure of peritrophins.** *Insect Mol. Biol.* 2009, **18**:33-44.

- 20 - Noriega FG, Pennington JE, Barillas-Mury C, Wang XY, Wells MA: ***Aedes aegypti* midgut early trypsin is post-transcriptionally regulated by blood feeding.** *Insect Mol Biol.* 1996, **5**:25-29.
- 21 - Wu DD, Guo-Dong W, Irwin DM, Zhang YP: **A profound role for the expansion of trypsin-like serine protease family in the evolution of hematophagy in mosquito.** *Mol Biol Evol* 2009, **26**:2333–2341.
- 22 - Borovsky D, Schlein Y: **Quantitative determination of trypsin-like and chymotrypsin like enzymes in insects.** *Arch Insect Biochem Physiol* 1988, **8**:249–260.
- 23 - Gorman MJ, Paskewitz SM: **Serine proteases as mediators of mosquito immune responses.** *Insect Biochem Mol Biol* 2001, **31**:257–262.
- 24 - Noriega F. G. & Wells MA: **A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*.** *J Insect Physiol* 1999, **45**: 613–620.
- 25 - Shahabuddin M, Kaslow DC: **Biology of the development of Plasmodium in the mosquito midgut: a molecular and cellular view.** *Bull Inst Pasteur* 1994, **92**:119–132.
- 26 - Telleria EL, Araújo APOd, Secundino NF, d'Avila-Levy CM, Traub-Csekö YM: **Trypsin-Like Serine Proteases in Lutzomyia longipalpis – Expression, Activity and Possible Modulation by Leishmania infantum chagasi.** *PLoS One* 2010, **5**:e10697.

- 27 - Shahabuddin M, Lemos FJ, Kaslow DC, Jacobs-Lorena M: **Antibody-Mediated Inhibition of *Aedes Aegypti* Midgut Trypsins Blocks Sporogonic Development of *Plasmodium gallinaceum*.** *Infect Immun.* 1996, **64**:739–743
- 28 - Broadwell AH, Baumann P: **Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin.** *Appl Environ Microbiol* 1987, **53**:1333–1337.
- 29 - Lau YS, Sulaiman S, Othman H: **The effectiveness of Trypsin Modulating Oostatic Factor (TMOF) and combinations of TMOF with *Bacillus thuringiensis* against *Aedes aegypti* larvae in the laboratory.** *Iran J Arthropod-Borne Dis* 2011, **5**:13–19.
- 30 - Saboia-Vahia L, Borges-Veloso A, Cuervo P, Junqueira M, Mesquita-Rodrigues C, Britto C, Domont GB, De Jesus JB: **Protein expression in the midgut of sugar-fed *Aedes albopictus* females.** *Parasit Vectors.* 2012, **5**:290.
- 31 - Galán JE, Pace J, Hayman MJ: **Involvement of the epidermal growth factor receptor in the mammalian cells by *Salmonella typhimurium*.** *Nature* 1992, **357**:588-589.
- 32 - Geer LY, Markey SP, Kowalak JA, Wagner L, Xu M, Maynard DM, Yang X, Shi W, Bryant SH: **Open Mass Spectrometry Search Algorithm.** *J Proteome Res.* 2004, **3**:958-64.

- 33 - Specht M, Kuhlert S, Fufezan C, Hippler M: **Proteomics to go: Proteomatic enables the user-friendly creation of versatile MS/MS data evaluation workflows.** *Bioinformatics*. 2011, **27**:1183-4.
- 34 - Suzek BE, Huang H, McGarvey P, Mazumder R, Wu CH: **UniRef: comprehensive and non-redundant UniProt reference clusters.** *Bioinformatics*. 2007, **23**:1282-8.
- 35 - Ho B.C., Khoo H.G., Chew L.M., Wong K.P., Ewert A: **Food ingestion and digestive enzymes in larval *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae).** *J Med Entomol*. 1992, **29**: 960-964.
- 36 - Yang YJ & Davies D: **Trypsin and chymotrypsin during metamorphosis in *Aedes aegypti* and properties of the chymotrypsin.** *J Insect Physiol*. 1971, **17**:117–131.
- 37 - Borovsky D & Meola SM: **Biochemical and cytoimmunological evidence for the control of *Aedes aegypti* larval trypsin with Aea-TMOF.** *Arch Insect Biochem Physiol*. 2004, **55**:124-139.
- 38 - Muhlia-Almazán, A; Sánchez-Paz, A; García-Carreño, F: **Invertebrate trypsins: a review.** *J Comp Physiol B*. 2008, **178**: 655–672.
- 39 - Fazito-do-Vale V, Pereira MH, Gontijo NF: **Midgut pH profile and protein digestion in the larvae of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae)** *J Insect Physiol*. 2007, **53**:1151–1159.

40 - Mesquita-Rodrigues C, Saboia-Vahia L, Cuervo P, Masini d'Avila Levy C, Alves-Honório N, Domont GB, De Jesus JB: **Expression of Trypsin-like serine peptidases in préimaginal stages of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** *Arch Insect Biochem Physiol* 2011, **76**:223–235.

41 - Tabouret G, Bret-Bennis L, Dorchies P, Jacquiet P: **Serine protease activity in excretory-secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae.** *Vet Parasitol* 2003, **114**: 305-314

42 - Pires FA, Moya-Borja GE, Barreira JD, Pinho RT, Alves CR: **The main proteinases in *Dermatobia hominis* second and third instars larvae are serine-proteinases.** *Vet Parasitol.* 2007, **145**:326–331.



### Figure Legends

Figure 1. Time course of the proteolytic activities exhibited by the *A. albopictus* midgut. Proteolytic activities were evaluated after 2, 4, 6 12 and 24 h of incubation in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5). The numbers on the left indicate the apparent molecular masses of the peptidases (kDa).

Figure 2. Influence of pH and temperature on the proteolytic profiles of the *A. albopictus* midgut. The effect of pH on the proteolytic activities was evaluated by the incubation of protein extracts in 0.1 M sodium acetate buffer pH 3.5 or 5.5 or 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.5 or 10.0. (A) Zymographic gels incubated at 37 °C for 12 h. The numbers on the left indicate the apparent molecular masses of the peptidases (kDa). (B) In-solution assays performed using the fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-AMC.

Figure 3. Effects of peptidase inhibitors on the proteolytic profiles of the *A. albopictus* midgut and quantitative in-solution assays for the proteolytic activities. (A) Samples were pre-incubated for 30 min in the presence of 1 mM PMSF, 100 µM TLCK, 100 µM TPCK and 10 µM E-64. The proteolytic activities were detected after incubating the gels for 12 h at 37 °C in Tris-HCl buffer, pH 7.5. The control samples were processed in the same way but in the absence of inhibitors. The numbers on the left indicate the apparent molecular masses of the peptidases (kDa). (B) The in-solution assays were performed using the fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-AMC in the absence (control) or presence of 5 mM PMSF, 100 µM TLCK, 100 µM TPCK and 20 µM E-64 in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. (C) Percentage inhibition exerted by each inhibitor on the proteolytic activities.

Figure 4. Alkaline region of a 2DE map of soluble proteins from the midgut of *Ae. albopictus* females. Proteins were separated in the first dimension across a non-linear pH range of 3-10 NL, and in the second dimension by 12% SDS-PAGE. Protein spot numbers correspond to: (2) trypsin-alpha, (17) trypsin, and (27) chymotrypsin. Details of the identification are provided in Table 1. The numbers on the right side indicate the molecular mass standards in kDa.

Figure 5. Sequence alignment of trypsin-alpha and trypsin genes detected in the midgut of *A. albopictus*. Identical residues are marked with an asterisk; residues with strongly similar properties are marked with a colon; residues with slightly similar properties are indicated with a period. Peptides identified in each protein by mass spectrometry are highlighted in gray.

Table 1. *Aedes albopictus* midgut peptidases automatically identified using the Mascot software.

Spot Code	Protein Name	NCBI Accession No.	VectorBase DB No.	Theor/Exp MW	Theor/Exp pI	Matching pep./Pep. identified by MS/MS	Peptide Sequence	Error $\pm$ ppm	Protein Score	Ion Score
27	chymotrypsin, putative [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gii157123854	AAEL009680	26.5/25.8	9.0/9.3	1(1)	R.SNELQTLVQK.T	3	64	64
2	trypsin-alpha, putative [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gii157117906	AAEL008079	32.1/40.8	8.0/8.8	1(1)	K.GACNGDLGGPLVCBAR.L	3	78	78
17	trypsin [ <i>Aedes aegypti</i> ]	gii157113343	AAEL006425	29.6/29.6	8.6/8.2	1(1)	R.IVGGFEIDTDAPHQVLSQSR.G	4	106	106

Spot codes correspond to spot numbers in figure 4. MW: molecular weight. pI: isoelectric point. ppm: parts per million.

**Figura 1**

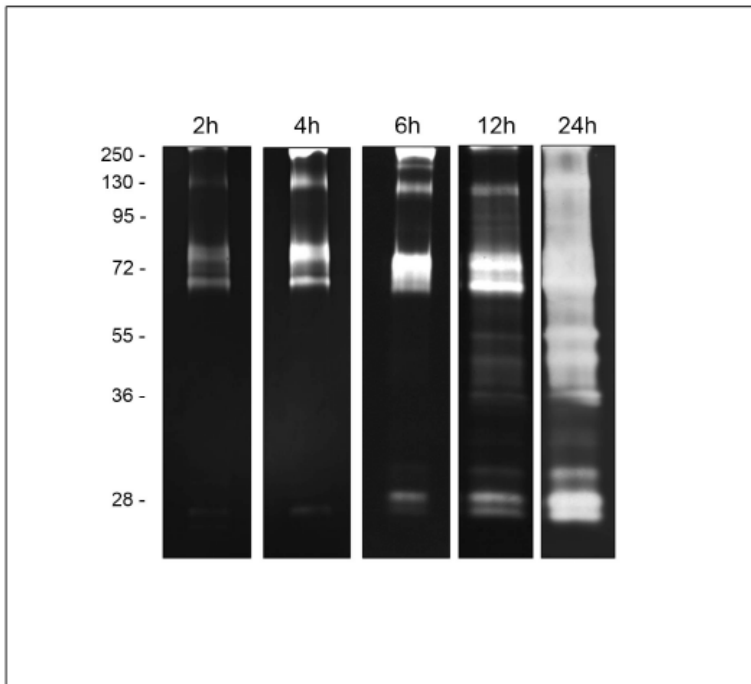


Figure 1

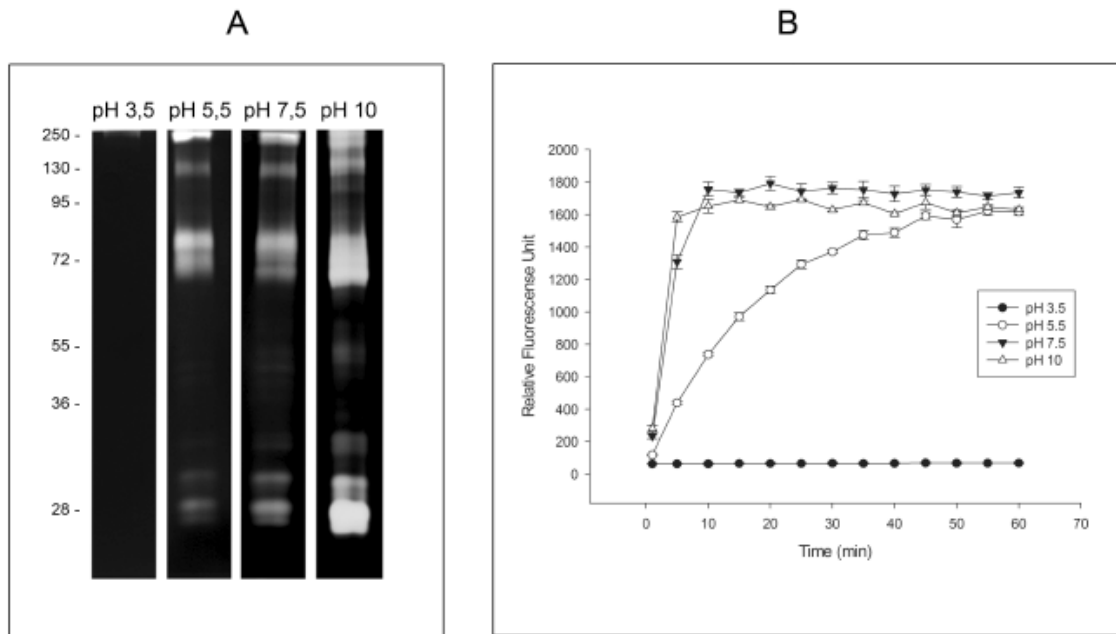
**Figura 2**

Figure 2

**Figura 3**

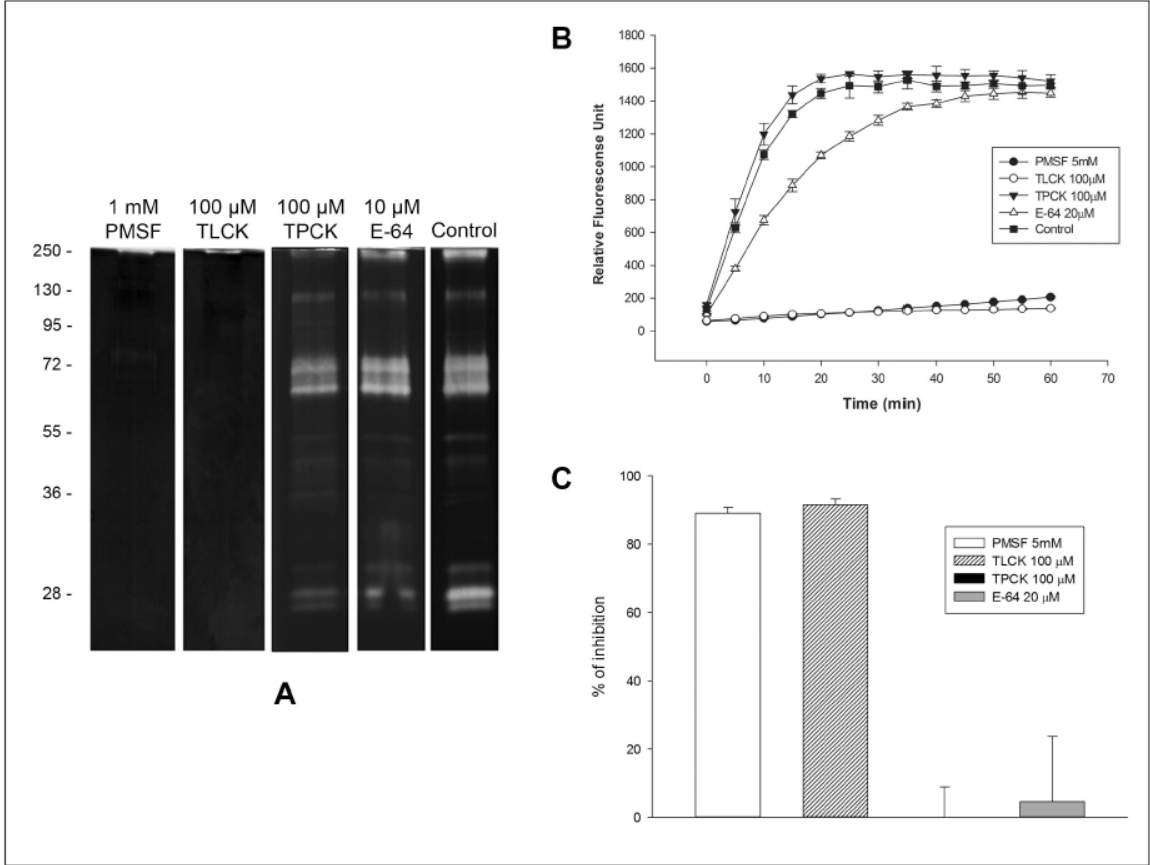


Figure 3

**Figura 4**

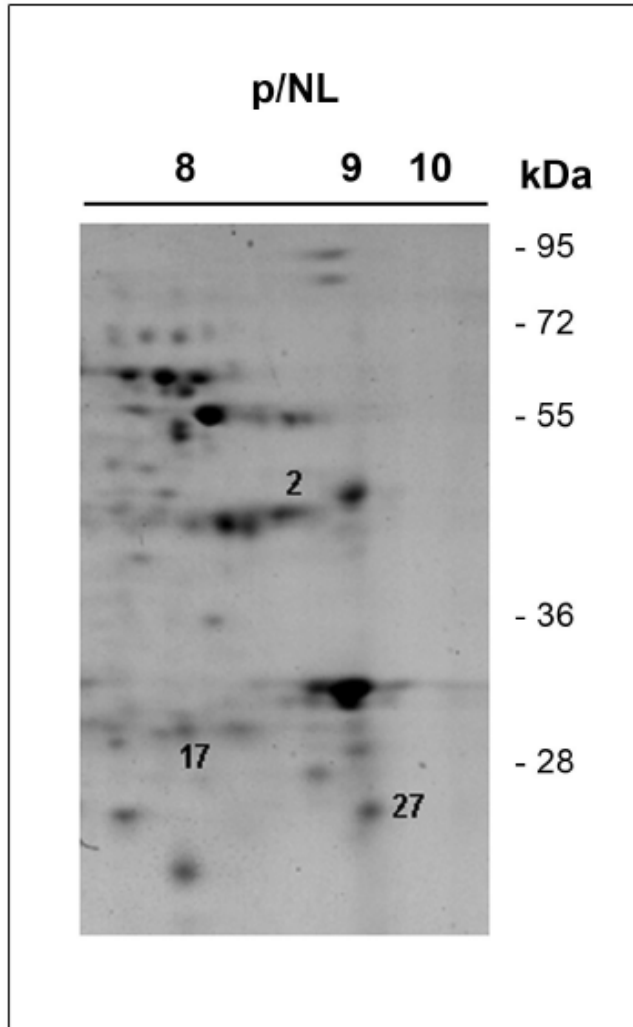


Figure 4

**Figura 5**

```

CLUSTAL O(1.1.0) multiple sequence alignment

gi|157117906|trypsin-alpha      NPWSIECSTVIAFVVCLLVAA-----P-----IEASEWQORI
gi|157113343|trypsin           -----MLRLCVLISVLLVSAAYGNVLPESDVLPTLPRPRYGQYSAPVPSLRGNR
                                :!*:***.                *      *      :**

gi|157117906|trypsin-alpha      VGGSNATGNACPHAVAIRLVGRDFHCNGALITTQDVLTAQCQVYNGVVRNASEFQLVLG
gi|157113343|trypsin           VGGSEIDITDAPHQVSLQSRG-SHICGGSIIISPEWVLTAAHCTDGASA----SNLRVRVG
*** : . . ** *::: * . . * *::: : *****: . . . *::: : *

gi|157117906|trypsin-alpha      SLASSNSSGGTIRNVTAVWPHPSYLANTRLNDVAVLRLSATVQSSASLTFVQLST--ANP
gi|157113343|trypsin           --STKHASGGAVVSI SRIVQHPQFSYSTIDYDYSLLKLAKKVTLGNSSQVIALPEQDEPV
  : : : ***: : . : : ** : . * * : : * : * : . * . * : *

gi|157117906|trypsin-alpha      VVNRCTCLCGWGANSTTGKPLATLQRLDLTVQPSNATYCTLTN-GNVALPTGQICAGVLA
gi|157113343|trypsin           PDGTLCEVSGWNTQSIITQSRDKLRAAYV--PSYNQAQCNKAYSNYGGVTDRLMICAGFQQ
  * : . *** . : : . * : : * : * : . : : ****.

gi|157117906|trypsin-alpha      AGKSACNGDLGGPLVCDARLQGI LTVVGGCGALNETSIFVNTVTHRDWINNRTLQTPGG
gi|157113343|trypsin           GGDACQGDGGGPLVANGKLVGI VSWGLGCAQPNYPGVYSRVAAARDWIRSNSGV-----
. ** ** : * * * * * . : : * * : : ** . * : : : : * * * . . . .

gi|157117906|trypsin-alpha      GGGTGGGGGGTGGSGGGGGAAQVMQIWMVMFVLVLLALL
gi|157113343|trypsin           -----

```

Figure 5





## 6 – DISCUSSÃO

Nessa seção serão discutidos, em dois blocos, os resultados apresentados nos artigos 1 e 2 e aqueles apresentados nos artigos 3 e 4.

- **Artigos 1 e 2**

1- Expression of trypsin-like serine peptidases in pre-imaginal stages of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).

2 - Trypsin-like serine peptidase profiles in the egg, larval, and pupal stages of *Aedes albopictus*.

Nestes artigos reporta-se a caracterização das atividades proteolíticas detectadas em extratos totais das formas larvais de *A. aegypti* e *A. albopictus*, por enzimografia em uma dimensão. A estabilidade da expressão de peptidases nessas espécies foi avaliada pela comparação do perfil proteolítico de formas larvais obtidas de ovos de insetos recém coletados no ambiente com ovos de insetos mantidos em colônia por longo período. Foram também comparados os perfis proteolíticos das pupas com seus respectivos imagos. Finalmente, as possíveis funções dessas enzimas nestes insetos são aqui discutidas.

Apesar da existência de trabalhos abordando a presença de peptidases em tecidos específicos de *A. aegypti* (Yang & Davies 1971, Graf & Briegel 1982, Graf *et al.*, 1986, Noriega & Wells, 1999; Noriega *et al.*, 2002, Borovsky & Meola 2004), a maioria deles refere-se à forma adulta dos mosquitos e pouco enfoque tem sido dado à caracterização bioquímica de peptidases ativas em larvas. Com relação ao estudo dessas enzimas em *A. albopictus*, até onde se sabe, apenas um trabalho reporta a presença destas proteases no inseto (Ho *et al.*, 1992). No presente trabalho, foi observado que extratos totais de todos os instars larvais de *A. aegypti* e *A. albopictus* apresentam altos níveis de atividade proteolítica, identificados pela intensidade das bandas. Estas atividades foram influenciadas pelo tempo de reação, sendo que ambas mostraram atividades a partir de 30 minutos de reação. No entanto, *A. aegypti* exigiu um menor tempo de reação para o estabelecimento do seu perfil enzimático (1 hora), ao passo que *A. albopictus* exibe um perfil claro a partir de duas horas de reação. Tais resultados sugerem que as peptidases larvais dessas espécies apresentariam (i) distintas cinéticas de atividade, ou (ii) expressão

quantitativa diferencial. Não pode ser descartada a hipótese de que essas diferenças no curso temporal de atividade proteolítica possam estar relacionadas às características nutricionais e de obtenção de alimento por parte das larvas dessas duas espécies. A propósito disso, foi observado que larvas de *A. albopictus* se alimentam mais lentamente e ingerem menos quantidade de alimento por vez do que as larvas de *A. aegypti* (Ho *et al.*, 1992). Essa ingestão mais lenta poderia levar a uma também lenta ou menor expressão/ativação das peptidases envolvidas na digestão de nutrientes. Indução da expressão de peptidases pós-alimentação tem sido observada particularmente em adultos de *A. aegypti* (Felix *et al.*, 1991; Noriega *et al.*, 1996; Noriega & Wells, 1999; Noriega *et al.*, 2002). Foi observado aqui também que a expressão de peptidases em larvas de ambas as espécies parece aumentar a cada instar. Esta expressão quantitativa diferencial nos diferentes instars também tem sido observada por outros autores, especificamente no intestino, utilizando metodologias diferentes da enzimografia em SDS-PAGE (Ho *et al.*, 1992; Borowsky & Meola, 2004).

Quanto à sensibilidade ao pH do meio de reação, as atividades proteolíticas larvais de ambas as espécies foram ótimas a pH alcalino (entre pH 7,5 e 10). Larvas de *A. aegypti*, *An. Stephensi* e *Culex pipiens* demonstram alta atividade proteolítica a pH alcalino (Dadd, 1975). Adicionalmente, no díptero *L. longipalpis*, atividades proteolíticas em intestino de L4 tem sido detectadas numa ampla faixa de pH alcalino, usando tanto substrato em solução como SDS-PAGE co-polimerizada com gelatina (Fazito-do-Vale *et al.*, 2007). O amplo espectro de atividade proteolítica aqui detectado nas larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* poderia estar relacionado à sobrevivência dessas formas evolutivas em distintos ambientes aquáticos pobres em nutrientes. As fortes atividades proteolíticas podem estar associadas à nutrição larval, visto que estes estágios são altamente detritívoros e necessitam ingerir uma grande quantidade de alimentos para obter os nutrientes básicos. De fato, tem sido indicado que as principais peptidases expressas pelas larvas estão envolvidas no processamento de nutrientes e apresentam atividade ótima em pH alcalino (Yang & Davies, 1971). Esta hipótese também pode ser suportada pela observação de alta atividade proteolítica no intestino de larvas de ambas as espécies, não obstante essas atividades terem sido detectadas usando substrato em solução (Yang & Davies, 1971; Ho *et al.*, 1992; Borovsky & Meola 2004).

Com respeito à sensibilidade a inibidores, as peptidases dos quatro estágios larvais de ambas as espécies foram inibidas por PMSF, um inibidor de tripsina e quimiotripsina (enzimas que pertencem à classe das serino proteases) e por TLCK, um inibidor específico de tripsina e de enzimas tripsina-similares. Estes resultados indicam uma expressão predominante destas enzimas nos estágios larvais, os quais estão de acordo com descrições prévias que relatam (usando outros métodos bioquímicos) a sua ocorrência em larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* (Yang & Davies, 1971; Ho *et al.*, 1992). As principais peptidases detectadas em outras espécies da ordem Diptera também pertencem à classe das serino proteases (Tabouret *et al.*, 2003; Fazito-do-Vale *et al.*, 2007; Pires *et al.*, 2007).

Comparações entre as peptidases de larvas e pupas, das duas espécies, demonstraram que ambos os estágios de desenvolvimento exibem serino proteases do tipo tripsina com atividade ótima em pH alcalino. No entanto, as peptidases larvais apresentaram uma faixa de pH ótimo mais ampla (variando desde 3,5 até 10) do que aquelas exibidas pelas peptidases de pupa de *A. aegypti* (entre 5,5 e 10) e de *A. albopictus* (entre 7,5 e 10). As bandas de atividade proteolítica do estágio pupal de *A. aegypti* apresentaram maior resolução em pH 10, enquanto que nos estágios larvais as atividades enzimáticas foram melhor visualizadas pH 7,5. Para *A. albopictus*, tanto pupa quanto larvas apresentaram melhor resolução a pH 7,5, apesar de apresentarem maior atividade a pH 10. Os estágios pupais expressaram um perfil proteolítico complexo, com bandas de atividade de diferentes intensidades distribuídas em uma ampla faixa de massas moleculares. Enquanto a pupa de *A. aegypti* apresentou pelo menos onze bandas de atividade enzimática em pH 10, as larvas desta espécie exibiram apenas oito bandas no mesmo pH. Por sua vez, a pupa de *A. albopictus* apresentou oito bandas de atividade e as larvas nove bandas. Visto que a pupa é um estágio evolutivo intermediário entre larvas e adultos, as diferenças no perfil proteolítico entre larvas e pupa sugerem uma regulação da expressão de peptidases entre esses estágios evolutivos, que acarretaria a diminuição e/ou repressão da expressão de peptidases, como, por exemplo, aquelas envolvidas em alimentação larval, e aumento e/ou indução da expressão de peptidases que teriam funções para o adulto ou para a própria pupa, como pode ser deduzido a partir da observação de bandas compartilhadas entre pupa e adultos (fêmea). Comparando o tempo de incubação para a detecção das atividades proteolíticas entre larvas e pupas, observou-se que as peptidases das larvas foram visualizadas depois de uma e duas horas de reação, para *A. aegypti* e *A. albopictus*,

respectivamente, ao passo que as peptidases do estágio pupal foram visualizadas somente após 24 e 36 horas de incubação para *A. aegypti* e *A. albopictus*, respectivamente. Estas observações poderiam indicar redução na expressão de peptidases digestivas ativas em larvas após a última ecdise larval. Serino proteases fortemente ativas em larvas podem ser necessárias para maximizar a digestão de partículas de nutrientes, como microorganismos e leveduras, nas baixas temperaturas do ambiente aquático (Yang & Davies, 1971). A expressão destas peptidases é reduzida quando não há mais digestão ativa, ou seja, quando a ecdise larval-pupal está completa (Yang & Davies, 1971). Embora a pupa não se alimente, foi demonstrado que a pupa apresenta atividades de serino proteases (Borowsky & Meola, 2004). A tripsina em pupas pode estar relacionada à proteólise dos tecidos larvais remanescentes durante a metamorfose. Em *Sarcophaga peregrina*, uma tripsina de 26 kDa foi isolada do corpo amarelo, um órgão que se desenvolve temporariamente nas pupas e envolve o intestino larval enquanto o desintegra e o remodela para formar o intestino do inseto adulto (Nakajima *et al.*, 1997). Embora existam diferenças notáveis entre os perfis proteolíticos de larvas e pupas (de ambas as espécies), eles compartilham uma banda de atividade enzimática de aproximadamente 40 kDa, a qual também parece estar presente em fêmea e macho de *A. aegypti*. Esta observação sugere que os distintos estágios de desenvolvimento expressam isoformas da tripsina, que podem exercer funções similares em cada forma evolutiva durante o ciclo de vida dos insetos. Além disso, em fêmeas, a tripsina pode estar associada à ativação de outras enzimas digestivas ou à ativação de suas isoformas (Noriega *et al.*, 1996; Noriega & Wells, 1999; Muhlia-Almazán *et al.*, 2008). Na comparação do perfil proteolítico de pupa com a fêmea alimentada com açúcar observam-se também outras bandas compartilhadas em ambas as espécies enquanto que os machos apresentam baixa ou nenhuma atividade enzimática nas mesmas condições experimentais que fêmeas e pupas. O perfil proteolítico mais complexo observado para as fêmeas, quando comparado ao perfil do macho, pode indicar que algumas peptidases envolvidas no processamento de proteínas do sangue sejam expressas constitutivamente de forma basal ao passo que os machos, que não fazem repasto sanguíneo, não expressam tais enzimas. Regulação pós-transcricional e pós-traducional da expressão de peptidases tem sido bem descrita em fêmeas adultas após ingestão de sangue (Felix *et al.*, 1991; Noriega *et al.*, 1996; Noriega & Wells, 1999). A síntese e secreção de tripsina em adultos podem ser afetadas por fatores externos, como alimentação, ou por fatores internos, como liberação de hormônios (Borovsky & Schlein, 1988). Foi demonstrado em *A. aegypti* que

(i) hormônios secretados pelos ovários aumentam a secreção de peptidases e que (ii) células neurosecretoras contêm fatores que aumentam a secreção de tripsina (Briegel & Lea, 1977). A decapitação e/ou retirada dos ovários reduz pela metade a síntese de tripsina, comprovando a influência dos hormônios sobre a taxa de síntese dessa enzima (Graf *et al.*, 1998). Adicionalmente, foi observado que o hormônio juvenil (HJ) regula a síntese de uma tripsina expressa em adultos denominada “early trypsin” (Noriega *et al.*, 1996, 1997; Noriega & Wells, 1999). “Early trypsin” é uma das formas de tripsina sintetizada pelo intestino de fêmeas de *A. aegypti* (Noriega & Wells, 1999). Esta enzima é sintetizada em baixa quantidade, aparece no intestino após uma hora de ingestão de sangue e desaparece 6-8 horas após. A “late trypsin” é produzida em grandes quantidades, começa a aparecer 8-10 horas após a ingestão de sangue e responde pela atividade proteolítica presente no intestino durante a digestão do sangue ingerido (Graf *et al.*, 1988; Barillas-Mury *et al.*, 1991). A transcrição do gene da “early trypsin” faz parte da maturação normal do intestino da fêmea adulta pós-emergência, *i.e.*, após a metamorfose, e é controlada pelo HJ (Noriega & Wells, 1999). Foi demonstrado que a expressão de “early trypsin” pode ser induzida em pupa, na presença de análogos do HJ (Noriega & Wells, 1999), muito embora a pupa não se alimente, como já foi comentado. Expressão de “early trypsin” não tem sido detectada em machos, pupa nem larvas de *A. aegypti* (Noriega *et al.*, 1996). Quanto à atividade proteolítica no macho, não pode ser descartado aqui que um perfil de peptidases mais complexo poderia ser observado se outras condições experimentais, que não as avaliadas neste trabalho, como por exemplo, outras condições de pH, tempo de incubação, fossem testadas. Quanto à banda de 40 kDa observada também no macho de *A. aegypti*, mencionada acima, poderia ter outras funções que não o processamento de nutrientes. Evidências sobre a expressão estágio-específica de tripsinas com distintas funções durante o ciclo evolutivo de *A. aegypti*, foram recentemente relatadas (Venancio *et al.*, 2009). Análise do transcrito de *A. aegypti* revelou que há expressão preferencial de 12 genes codificantes para tripsina em larva e 15 em adultos, ao passo que 39 genes são expressos tanto em larva como em adultos. Análise filogenética desses 66 genes mostra que *A. aegypti* tem pelo menos três grupos principais de tripsinas: o primeiro grupo contém peptidases exclusivas de larvas e algumas peptidases que são compartilhadas por larvas e adultos, (as peptidases de larvas provavelmente adaptadas ao lúmen do intestino ou outro ambiente proteolítico); o segundo grupo inclui tripsinas exclusivas de adultos, algumas exclusivas de larvas e umas poucas compartilhadas por larvas e adultos (grupo apresentado

homologia com tripsinas histolíticas, *i.e.*, tripsinas envolvidas na degradação de tecidos), e por fim, o terceiro grupo inclui tripsinas induzidas por alimentação com sangue (Venancio *et al.*, 2009).

Com relação à expressão de peptidases em ovos, foi observado que o perfil proteolítico do ovo de *A. aegypti* é composto por duas bandas principais migrando entre 36 e 55 kDa, as quais correspondem àquelas observadas nos quatro instars larvais. A intensidade dessas bandas é bastante semelhante ao observado para L1. Não foram observadas atividades abaixo de 36 kDa e nenhuma banda pôde ser resolvida na faixa acima de 55 kDa. Em contraste, em ovos de *A. albopictus*, três bandas entre 17 e 28 kDa, com diferentes intensidades, são observadas e parecem corresponder àquelas dos quatro instars larvais. Bandas de alto peso molecular, entre 55 e 250 kDa, são também observadas. Esses achados são esperados visto que os ovos usados nesses ensaios estavam em fase final de desenvolvimento, maduros, e, portanto, as peptidases expressas corresponderiam ao perfil de peptidases de L1. A menor intensidade na atividade poderia ser devida à expressão diminuída da larva no interior do ovo dado que ela encontra-se em estado letárgico e com metabolismo reduzido. Até o presente, descrição de atividades proteolíticas em ovos de *A. aegypti* e *A. albopictus* não tem sido relatada.

Para verificar a estabilidade da expressão do perfil proteolítico, larvas provenientes de ovos de fêmeas mantidas em colônia por longo período foram comparadas com larvas provenientes de ovos recém coletados no ambiente natural do inseto. Foi observada que em ambas as espécies o perfil proteolítico não é alterado, sugerindo que a expressão qualitativa de peptidases nessas duas espécies de mosquitos é estável, *i.e.*, que os genes que codificam para essas enzimas parecem estar sob forte pressão de seleção, sendo conservados dentro de uma mesma espécie e, portanto, apresentando sempre o mesmo perfil proteolítico quando são submetidos a uma mesma condição de análise. Desta forma, a análise desses ensaios indica que o endocruzamento ocorrido durante a manutenção continuada da colônia (visto que a colônia se origina a partir de poucos indivíduos de uma população) não altera, aparentemente, os genes que codificam as serino proteases que compõem o perfil proteolítico dos mosquitos, pelo menos durante o período de um ano em que se desenvolveu este estudo. O mesmo aconteceria com populações naturais, nas quais o grupo de genes codificantes para serino proteases seria conservado, apesar de sofrer

maior intercambio gênico. Adicionalmente, quando se comparam os perfis de atividades de larvas de *A. aegypti* com *A. albopictus* nota-se que eles compartilham uma banda, com a mesma intensidade de atividade, em torno de 28 kDa e compartilham outras bandas entre 36 e 72 kDa, porém detectadas com maior intensidade em *A. aegypti* do que em *A. albopictus*. Também, pelo menos uma banda de baixo peso molecular (abaixo de 28 kDa) é tenuamente observada em *A. aegypti* e parece ser semelhante àquela observada em *A. albopictus*. Estes últimos resultados (i) reforçam a idéia anterior sobre a conservação gênica; (ii) sugerem que algumas isoformas das enzimas são mais expressas em uma ou outra espécie e, por fim (iii) indicam que o perfil proteolítico é espécie-específico. Assim, as diferenças observadas na intensidade das bandas proteolíticas dentro do mesmo estágio, em estágios diferentes e entre as duas espécies, podem indicar que alguns genes codificando para tripsinas são expressos diferencialmente ou que isoformas com características catalíticas específicas são reguladas diferencialmente durante o ciclo evolutivo do inseto e de forma interespecífica. A existência de complexos mecanismos de regulação da expressão das tripsinas em insetos poderia suportar estes dados (Kalhok *et al.*, 1993; Barrillas-Mury *et al.*, 1991; Noriega *et al.*, 1996; Venancio *et al.*, 2009). Adicionalmente, a expressão diferencial de peptidases desses insetos nas distintas formas evolutivas pode estar relacionada à participação dessas enzimas em processos funcionais distintos tais como nutrição, desenvolvimento e defesa (Ho *et al.*, 1992; Yano *et al.*, 1995; Nakajima *et al.*, 1997; Borovsky & Meola, 2004; Philip *et al.*, 2007).

Neste trabalho foi testada também a termoestabilidade das serino proteases das larvas de ambas as espécies. Quando comparadas à condição controle (37 °C), foi observado que as atividades proteolíticas de todos os estágios larvais de *A. aegypti* e *A. albopictus* são susceptíveis à baixas temperaturas (4 °C e 10 °C), enquanto são altamente estimuladas em altas temperaturas (entre 50-60 °C). Não obstante a observação de que as atividades enzimáticas decaem a 85 °C, um claro perfil ainda pode ser observado nesta temperatura. Por outro lado, a baixas temperaturas ainda se pode verificar um delineamento do perfil proteolítico, ainda que bastante reduzido. Resultados similares têm sido descritos para serino proteases de larvas do díptero *Oestrus ovis*, (Angulo-Valadez *et al.*, 2007), para quimiotripsinas e tripsina de larvas do coleóptero *Tenebrio molitor* (Tsybina *et al.*, 2005; Elpidina *et al.*, 2005). Visto que a temperatura é uma das condições ambientais mais importantes para a sustentação da vida na terra, a adaptação de organismos a ambientes



extremos exigiria a otimização do seu repertório enzimático. Nesse sentido, a investigação de proteínas termoestáveis, altamente conservadas em grupos de organismos filogeneticamente relacionados, auxiliaria na identificação de mudanças na sequência de aminoácidos, as quais estariam associadas à adaptação térmica (Thomas & Cavicchioli, 1998). Apesar de não existirem estudos a esse respeito em insetos, um interessante exemplo é o de salmão atlântico, o qual apresenta duas isoformas de tripsina, uma aniônica psicrófila (pAST, “psychrophilic Atlantic salmon trypsin”) (Smalas *et al.*, 1994) e outra catiônica mesófila (mAST, “mesophilic Atlantic salmon trypsin”) (Schroder *et al.*, 1998). Visto que pAST e mAST tem alta similaridade de sequências e pertencem ao mesmo organismo, estas enzimas seriam um bom modelo para estudar a adaptação ao frio (Papaleo *et al.*, 2009). Assim, dado que *A. aegypti* e *A. albopictus* são espécies relacionadas e originárias de ambientes distintos (continente africano e continente asiático, respectivamente), um estudo aprofundado, com relação às sequências e estrutura das suas isoformas de tripsinas, poderia fornecer importante informação sobre as bases moleculares da estabilidade térmica dessas enzimas. Os estudos aqui iniciados podem ser o primeiro para iniciar tais investigações. Finalmente, por apresentarem propriedades únicas, as enzimas adaptadas a condições extremas de temperatura oferecem a possibilidade de novas aplicações industriais (Antranikian *et al.*, 2005).

Ainda que as serino proteases tripsina e quimiotripsina tenham sido descritas em órgãos isolados de alguns estágios de desenvolvimento de *A. aegypti* e *A. albopictus* (Yang & Davies, 1971, 1972; Ho *et al.*, 1992; Terra & Ferreira, 1994; Noriega *et al.*, 1996; Noriega & Wells, 1999), a enzimografia não foi aplicada para a caracterização bioquímica e estudo comparativo da expressão de peptidases do extrato total destas espécies. O estudo de peptidases por enzimografia em SDS-PAGE, uma técnica simples e de fácil aplicação, permite: (i) avaliar a massa molecular aparente das peptidases expressas; (ii) detectar presença de distintas enzimas e de suas isoformas; (iii) analisar a expressão diferencial de peptidases entre espécies ou estágios evolutivos; (iv) fazer análise quantitativa relativa do perfil proteolítico; (v) verificar a estabilidade do perfil proteolítico, *i. e.*, verificar se a expressão do perfil de peptidases de uma espécie é constitutiva independente das condições ambientais; e (vi) observar a expressão de peptidases ativas, *i. e.*, o que está sendo realmente expresso e provavelmente funcional (Zhao & Russell, 2003; Cuervo *et al.*, 2008; De Jesus *et al.*, 2009). Desta forma, a partir da padronização de protocolos para

análise enzimográfica e demonstração que o perfil de uma determinada espécie é estável, como demonstrado neste estudo, essa técnica poderia então ser utilizada para discriminar grupos taxonômicos indiferenciáveis por outras técnicas. Finalmente, em conjunto com outras técnicas de identificação de proteínas, como espectrometria de massas, a enzimografia oferece uma boa alternativa para a análise de formas ativas de peptidases, quando comparada com métodos bioquímicos mais tradicionais (Zhao *et al.*, 2004; De Jesus *et al.*, 2009).

- **Artigos 3 e 4**

3 - Protein expression in the midgut of sugar-fed *Aedes albopictus* females.

4 - Midgut of *Aedes albopictus* females expresses active trypsin-like serine peptidases

Nestes artigos reporta-se a caracterização das atividades proteolíticas detectadas no intestino médio de fêmeas de *A. albopictus* alimentadas com açúcar, bem como o primeiro mapa proteômico e a identificação de peptidases por 2DE e MS/MS neste órgão. São discutidas aqui as estratégias usadas para analisar as proteases expressas nesse tecido. As proteínas expressas no intestino de *A. albopictus* foram identificadas por similaridade com as sequências de genoma de *A. aegypti*. Distintas ferramentas de bioinformática foram usadas para obter informação funcional de muitas dessas sequências, em virtude da pobre anotação do genoma dessa espécie.

O mapa proteômico parcial do intestino médio de fêmeas de *A. albopictus* alimentadas com açúcar foi obtido de forma paralela à caracterização do perfil proteolítico desse órgão. Para o mapa proteômico, as proteínas do intestino médio foram fracionadas por eletroforese bidimensional e identificadas por espectrometria de massas por similaridade com as sequências de genoma de *A. aegypti*. A análise dos géis obtidos, a partir de três experimentos independentes, mostrou que os perfis de proteínas eram reproduzíveis em termos de número de proteínas e de sua posição relativa e intensidade. Uma média de 340 “spots” foi detectada nos géis, resultado que está de acordo com mapas proteômicos de intestino de *A. aegypti* previamente publicados (Bayyareddy *et al.*, 2009;

Popova-Butler *et al*, 2009). A análise dos espectros de massa mediante distintos softwares (MASCOT e OMSSA) resultou na identificação de 59 proteínas provenientes de 26 “spots”; o restante dos “spots” extraídos (~100) não puderam ser identificados. Dentre as 59 proteínas identificadas, três serino-peptidases foram detectadas, sendo duas tripsinas e uma quimiotripsina.

A propósito dos “spots” não identificados, a dificuldade na identificação pode ter origem nas diferenças intrínsecas entre as espécies *A. albopictus* e *A. aegypti*. Diferenças na seqüência de aminoácidos, mesmo que seja em apenas um resíduo, podem impedir a identificação da proteína, visto que os programas usados utilizam algoritmos muito exigentes para realizar a correspondência (“match”) entre as massas teóricas obtidas a partir dos dados de genoma e as massas experimentais obtidas no MS. Esta dificuldade também revela que os estudos com uma espécie não necessariamente refletem o que sucede com a outra, sendo, portanto, reducionista continuar assumindo que os achados em *A. aegypti* são representativos dos outros membros do gênero. Contudo, frente a carência de dados específicos para *A. albopictus*, os resultados obtidos neste trabalho foram sempre comparados àqueles reportados para *A. aegypti*, como ponto de referência. Neste sentido, foram aqui identificadas pela primeira vez ~25 proteínas expressas no intestino deste gênero, quando se compara com trabalhos prévios de proteoma do intestino de *A. aegypti*. As proteínas mais abundantes, as quais sempre foram identificadas nos trabalhos prévios (enolase, chaperonina 60 e disulfeto isomerase) (Popova-Butler *et al*, 2009; Tchankouo-Nguetcheu *et al*, 2010), também foram detectadas no presente estudo, indicando que os procedimentos experimentais aqui usados foram apropriados e confiáveis. Da mesma forma, a congruência entre as massas teóricas e experimentais das proteínas identificadas indica que o extrato de intestino continha, principalmente, proteínas íntegras que não sofreram proteólise artificial durante a manipulação experimental. Isto também é relevante pois garante resultados fidedignos durante a identificação.

As proteínas identificadas foram classificadas em grupos funcionais de acordo com as anotações de ontologia gênica disponíveis para o genoma de *A. aegypti*. As categorias mais abundantes foram aquelas que agrupam proteínas do metabolismo de aminoácidos e a de proteínas envolvidas na homeostase redox. As proteínas classificadas como proteínas de função desconhecida também foram altamente representadas no mapa proteômico de

intestino de *A. albopictus*. As duas primeiras categorias eram esperadas devido aos processos fisiológicos desenvolvidos no intestino. A última categoria tampouco surpreende, visto a escassa anotação do genoma de *A. aegypti* (Nene *et al.*, 2007). Outras proteínas identificadas foram classificadas em categorias de resposta ao estresse oxidativo, fosforilação, proteólise e transporte de ferro. Todas estas categorias também condizem com as funções do órgão analisado.

Com o intuito de se obter mais informações sobre as proteínas identificadas, as mesmas foram analisadas com o programa STRING, o qual revela as potenciais redes de associação funcional entre as proteínas. Este programa usa uma base de dados de interações conhecidas e preditas entre proteínas. As interações incluem associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais) derivadas de distintas fontes de evidências, tais como: (i) contexto genômico, (ii) experimentos de alta vazão, (iii) co-expressão e (iv) conhecimento prévio (descrições na literatura) (Jensen *et al.*, 2009; Szklarczyk *et al.*, 2010). Esta análise revelou 5 grupos consistentes de proteínas com interação funcional, sendo, o primeiro, composto por proteínas envolvidas na glicólise, enovelamento de proteínas, transporte de elétrons, e catabolismo de corpos cetônicos, todas pertencentes a vias metabólicas ubíquas e centrais na fisiologia das células e, portanto, era esperada a sua expressão no intestino do inseto. A segunda interação clara reuniu proteínas do metabolismo de carboidratos e de aminoácidos, vias também cruciais para a homeostase celular. A expressão destas proteínas pode estar relacionada a distintos fatores: (i) deve ser constitutiva para a reciclagem de proteínas estruturais no intestino e, por consequência, para a manutenção do metabolismo basal do órgão; (ii) logo após a metamorfose, as fêmeas são fertilizadas e começam a sofrer mudanças na sua maquinaria metabólica como preparação para o repasto sanguíneo; (iii) já que os intestinos usados neste estudo provêm de fêmeas de 2-5 dias de idade, eles podem apresentar ainda proteínas remanescentes da pupa, as quais serviriam como substrato para as atividades metabólicas detectadas; e, finalmente, (iv) dado que antes da dissecação dos intestinos, a microbiota estava presente neles, bactérias e proteínas produzidas por estas poderiam ter induzido a ativação de enzimas do intestino do inseto envolvidas no metabolismo de aminoácidos. Na terceira rede de associação funcional, foram encontradas proteínas mitocondriais envolvidas na produção de ATP. Esta rede se conecta também às duas anteriores, revelando a complexidade das interações requeridas para o metabolismo energético das células intestinais. Ainda, ela está interconectada com uma quarta rede

funcional que inclui as enzimas ciclohex-1-ene-1-carboxil-CoA hidratase e a 3-hidroxi-isobutirato desidrogenase. Embora o Vectorbase não especifique a função da primeira enzima, sendo classificada então como enzima de função desconhecida, a análise do STRING indica que esta pode ter um papel na interação entre as vias da glicólise e da produção de ATP mitocondrial. Interessantemente, no presente trabalho estas enzimas foram identificadas juntas, no mesmo “spot”, e essas mesmas enzimas foram também identificadas num unico “spot” no mapa proteômico de vesículas de membrana de borda em escova do intestino de *A. aegypti* (Popova-Butler *et al*, 2009), o que apóia a provável interação funcional entre essas enzimas. Recentemente, a enzima ciclohex-1-ene-1-carboxil-CoA hidratase foi proposta como parte da via do metabolismo de lipídeos em *A. albopictus* (Reynolds *et al*, 2012). A quinta rede de interação funcional engloba proteínas envolvidas na detoxificação de radicais livres, como a superóxido dismutase, catalase e tioredoxina reductase. Estas enzimas têm um papel principal na detoxificação durante a ingestão de carboidratos e, além disso, é esperado que o intestino das fêmeas expresse constitutivamente esse repertório de enzimas para lidar com o intenso estresse oxidativo gerado durante a digestão e absorção do bolo sanguíneo. De fato, em *A. aegypti* tem sido demonstrado que a expressão de genes que codificam para a tioredoxina reductase e para a catalase incrementam após o repasto sanguíneo (Sanders *et al*, 2003). Ademais, a expressão destas enzimas em *Chironomus riparius* durante estresse por poluentes ambientais tais como cloreto de cádmio, tem sido proposta como um biomarcador de exposição para estes contaminantes (Nair *et al*, 2011; 2012). O restante das proteínas identificadas no mapa de 2DE, incluindo as serino-peptidases, aparece como componentes isolados na rede de associação funcional.

As proteínas classificadas na categoria de “processo biológico desconhecido” foram submetidas individualmente à análise de associação funcional na tentativa de obter mais informação sobre a sua função potencial. Contudo, não se obtiveram associações preditas para quatro (AAEL000757, AAEL005270, AAEL011268 e AAEL011741) das nove proteínas classificadas nessa categoria. Já para a proteína hipotética AAEL015064, STRING prediz associações confiáveis com proteínas da via SUMO (pela sigla em inglês correspondente a “small ubiquitin-related modifier”), uma modificação pós-traducional que regula diversos processos celulares, tais como transporte núcleo-citosol, apoptose, transcrição, localização subcelular, progressão do ciclo celular e diferenciação (Hay 2005).

Então, neste trabalho, identificamos uma proteína conservada que tem um papel na via da SUMOilação.

A proteína lactoilglutaciona liase (AAEL014393) exibiu interações funcionais com proteínas que participam do metabolismo do piruvato e com proteínas do metabolismo da treonina. Por sua vez, o fator de dissociação de guanina rho (AAEL012996) exibiu associações funcionais com GTPases da subfamília Rho, as quais estão envolvidas em varias vias de sinalização que regulam a progressão do ciclo celular e a morfogênese dos tecidos (Settleman, 2001; Pirraglia *et al*, 2010). Também tem sido demonstrado que GTPases rac participam na resposta imune antiparasitária de *Drosophila* sp (Xavier *et al*, 2011). Finalmente, embora não tenha sido possível predizer associações para a proteína de união a fosfatidil-etanolamina (AAEL011268), esta proteína tem sido relacionada com um efeito protetor contra infecções bacterianas em *Drosophila* sp (Reumer *et al*, 2011).

Em conjunto, os resultados obtidos aqui mostram que a análise de subproteomas permite que se atribua localizações anatômicas específicas a proteínas de função desconhecida. Além disso, a mineração dos dados permitiu que se atribuísse potenciais funções a essas proteínas, com base nas predições de interação funcional. Estes resultados provêm, pela primeira vez, evidencia sobre a expressão e a localização de proteínas que foram em principio categorizadas como hipotéticas, validando, portanto, as predições feitas previamente para as seqüências de genoma de *A. aegypti*. O mapa preliminar de proteínas de intestino de *A. albopictus* permitirá futuras comparações da expressão gênica do intestino de fêmeas alimentadas com sangue, tornando possível a identificação de proteínas que são exclusivamente expressas sob uma condição específica de alimentação.

Nossos achados representam o primeiro mapa proteômico do intestino médio de *A. albopictus* e representa o primeiro passo para a completa descrição proteômica deste órgão. Além disso, nossos dados contribuíram para a anotação funcional dos genomas do gênero *Aedes* usando dados proteômicos baseados em espectrometria de massas em combinação com métodos complementares de predição gênica.

Com relação à análise do perfil proteolítico desse órgão, o ensaio de enzimografia permitiu a visualização das peptidases ativas e a caracterização da sua relativa mobilidade

eletroforética. Estes experimentos mostraram que o intestino apresenta um complexo perfil de peptidases ativas composto por mais de 11 bandas de atividade proteolítica. Uma comparação entre o perfil de peptidases de intestino de adulto, obtido neste trabalho e aquele de larvas e pupa de *A. albopictus* (Saboia-Vahia *et al*, 2012), revela um padrão similar de bandas de atividade enzimática. Esses achados sugerem que as peptidases expressas como parte da maquinaria proteolítica dos adultos são já expressas nos estádios pré-imaginais, onde desenvolvem um papel primordial na digestão. Dado que neste trabalho foram usadas fêmeas alimentadas com açúcar, é possível sugerir que o perfil proteolítico detectado aqui é constitutivamente expresso pelo mosquito durante seu ciclo de vida. Contudo, as peptidases larvais foram detectadas após 2h de reação, indicando que essas enzimas são mais ativas que àquelas detectadas na fêmea adulta. Uma redução na expressão de peptidases ativas envolvidas na digestão após a última ecdise larval tem sido reportada para *A. aegypti* e *A. albopictus* (Yang *et al*, 1971; Borovsky *et al*, 2004).

Em fêmeas, de *A. aegypti* alimentadas com açúcar, a expressão ao nível transcricional de serino-peptidases do tipo tripsina (“early tripsina”) tem sido associada à ativação de outras enzimas digestivas ou outras isoformas de tripsina que seriam somente expressas após a ingestão de sangue (Noriega *et al*, 1996; Noriega *et al*, 1999; Muhlia-Almazán *et al*, 2008). Análise transcriptômica de *A. aegypti* revelou que adultos expressam exclusivamente 15 genes de tripsina, quando comparados com larvas, e compartilham a expressão de 39 genes codificantes para tripsina com aqueles expressos pelas formas pré-imaginais (Venancio *et al*, 2009).

Foi aqui observado que as atividades proteolíticas do intestino médio são moduladas pelo pH do tampão de reação. Pouca ou nenhuma atividade foi detectada em pH ácido, de 3.5. Por outro lado, apesar das atividades terem sido detectadas a partir de pH 5.5, a intensidade destas atividades foi aumentando a pH alcalino, especificamente entre 7.5 e 10.0. Embora as atividades ótimas sejam observadas a pH 10.0, varias bandas estão sobrepostas nesta faixa, impedindo a correta análise do perfil proteolítico. Por essa razão, todos os ensaios subseqüentes foram realizados a pH 7.5. O efeito do pH sobre as atividades de peptidases foi corroborado em ensaios em solução usando substrato fluorescente, observando-se que o intestino de fêmea adulta tem atividades ótimas a pH alcalino, similar ao resultado obtido previamente para larvas e pupa (Saboia-Vahia *et al*,

2012). Esta característica também tem sido reportada para outros Díptera, tais como *Culex quinquefasciatus* (Borges-Veloso *et al*, 2012) e *L. longipalpis* (Fazito-do-Vale *et al*, 2007), tanto em ensaios em gel quanto em ensaios usando substrato em solução. De acordo com reportes prévios, as atividades enzimáticas envolvidas em processos de digestão apresentam ótimas atividades a pH alcalino (Ho *et al*, 1992; Yang *et al*, 1971; Borovsky *et al*, 2004).

Os ensaios de inibição usando inibidores específicos para distintas classes de peptidases mostraram que as atividades proteolíticas detectadas no intestino de fêmeas de *A. albopictus* foram principalmente inibidas por PMSF e TLCK. PMSF inibe serino peptidases em geral, ao passo que TLCK inibe exclusivamente as serino-peptidases do tipo tripsina. Então, estes resultados mostram que as peptidases observadas são principalmente devidas a serino-peptidases do tipo tripsina. Extratos protéicos de intestino foram também submetidos a ensaios de degradação proteolítica em solução usando inibidores específicos de peptidases. Estes ensaios corroboraram os resultados obtidos em gel, mas observou-se uma ligeira inibição pelo inibidor de cisteíno peptidases E-64, a qual não foi significativa. A ocorrência de serino-peptidases do tipo tripsina tem sido descrita em larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus* usando tanto ensaios em solução (Ho *et al*, 1992; Yang *et al*, 1971) como análises enzimográficas (Saboia-Vahia *et al*, 2012; Mesquita-Rodrigues *et al*, 2011). As principais peptidases detectadas em outras espécies da ordem Díptera também pertencem à classe das serino-peptidases (Fazito-do-Vale *et al*, 2007, Tabouret *et al*, 2003; Pires *et al*, 2007).

Três “spots” contendo serino-peptidases do tipo tripsina e quimiotripsina foram identificados por similaridade com as seqüências de *A. aegypti* no mapa 2DE de intestino medio de *A. albopictus*. Estas identificações foram feitas usando dois motores de busca distintos, MASCOT e OMSSA, e ambos coincidiram nas identificações. Uma tripsina (AAEL006425), uma tripsina alfa (AAEL008079) e uma quimiotripsina (AAEL009680) foram identificadas. Quando foram comparadas as massas moleculares das proteínas identificadas por 2DE com as massas das peptidases observadas na enzimografia, vemos que correspondem com bandas proteolíticas específicas. Contudo, não foi observada atividade proteolítica de quimiotripsina nos géis enzimográficos, nem nos ensaios em solução, sugerindo que a quimiotripsina identificada nos géis 2DE pode: (i) ser expressa



neste órgão, mas ter uma baixa atividade que não é detectada pelos ensaios aqui usados; (ii) não estar ativa na condição estudada (alimentação com açúcar); (iii) não apresentar afinidade pelos substratos usados nos ensaios; (iv) ser expressa em baixa abundância nesse órgão, o que dificultaria a detecção de sua atividade na enzimografia.

O alinhamento das sequências dos dois genes de tripsina identificados revela que os genes apresentam pouquíssima similaridade entre eles. Tem sido reportado que o genoma de *A. aegypti* codifica para 380 serino-peptidases do tipo tripsina, constituindo uma das maiores famílias gênicas em mosquitos (Wu *et al*, 2009). Não obstante, a interrogação da base de dados VectorBase usando as palavras “trypsin” ou “chymotrypsin” revela 80 genes codificantes para tripsina e cinco codificantes para quimiotripsina em *A. aegypti*, entre os quais se encontram listados os genes identificados nesta tese.

Os resultados obtidos nos permitiram atribuir de maneira confiável um local de expressão para os genes de tripsina (AAEL006425), tripsina alfa (AAEL008079) e quimiotripsina (AAEL009680). Em outras palavras, pode-se afirmar que os genes acima mencionados são expressos no intestino de fêmeas adultas de *A. albopictus* alimentadas com açúcar. Este achado representa um pequeno, mas importante passo, para a atribuição funcional, ao nível de proteína, de genes codificantes para serino-peptidases do tipo tripsina e quimiotripsina no gênero *Aedes*.

## 6 – CONCLUSÕES

6.1 – Os perfis de atividades proteolíticas dos quatro estádios larvais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, detectados por enzimografia em SDS-PAGE co-polimerizado com gelatina, são compostos por pelo menos oito bandas de atividade que apresentam distintas cinéticas de reação, sendo detectadas após uma hora de reação para *A. aegypti* e após duas horas para *A. albopictus*.

6.2 – As peptidases dos estágios larvais de ambas as espécies são ativas em uma ampla faixa de pH, de 3,5 a 10, apresentando ótimas atividades a pH alcalino.

6.3 – Há diferenças qualitativas e quantitativas entre os perfis proteolíticos das larvas de *A. aegypti* e *A. albopictus*, as quais provavelmente se originam a partir da expressão diferencial de isoformas das peptidases.

6.4 – O perfil proteolítico dos quatro estádios larvais de *A. aegypti* e *A. albopictus* é estável e provavelmente está, em grande parte, relacionado à alta atividade digestiva do estágio larval.

6.5 – As peptidases dos quatro estádios larvais de *A. aegypti* e *A. albopictus* apresentam ampla estabilidade térmica, sendo ativas entre 10 °C – 85 °C, com atividade ótima entre 50 °C – 60 °C.

6.6 – A atividade proteolítica em pupas de ambas as espécies diminui drasticamente quando comparada, sob mesmas condições de reação, às atividades proteolíticas de larvas.

6.7 – Os perfis proteolíticos de pupa de *A. aegypti* e *A. albopictus* (i) apresentam cerca 11 e oito bandas de atividade, respectivamente; (ii) exibem distintas cinéticas de reação, sendo detectadas após 24 e 36 horas, respectivamente; (iii) apresentam diferenças qualitativas e quantitativas; e (iv) estão relacionados a processos distintos à nutrição, provavelmente a funções histolíticas.

6.8 - As atividades proteolíticas dos quatro estádios larvais e pupas de *A. aegypti* e *A. albopictus* são devidas, principalmente, a serino proteases do tipo tripsina.

6.9 – A presença de bandas proteolíticas compartilhadas nos distintos estágios evolutivos de cada espécie sugere a expressão de isoformas de peptidases com funções similares durante o ciclo evolutivo dos mosquitos.

6.10 - A expressão diferencial de isoformas de peptidases em larvas, pupas de *A. aegypti* e *A. albopictus* permite distinguir fenotípicamente estas duas espécies, sugerindo que a enzimografia é uma técnica que pode ser usada como ferramenta para análise taxonômica, pelo menos na família Culicidae.

6.11 – Os ovos de ambas as espécies expressam um perfil proteolítico com similaridade qualitativa e quantitativa àquele exibido pelas larvas das respectivas espécies.

6.12 – O mapa proteico parcial do intestino médio de fêmeas de *A. albopictus* alimentadas com açúcar, obtido por 2DE em 7 cm e pH 3-10 não linear, contém aproximadamente 340 “spots” proteicos.

6.13 - 59 proteínas foram identificadas por similaridade com as sequencias de genoma de *A. aegypti*, incluindo três serino-peptidases.

6.14 – As categorias mais abundantes de proteínas identificadas no intestino médio foram aquelas que agrupam proteínas do metabolismo de aminoácidos, e proteínas envolvidas na homeostase redox.

6.15 – Os três “spots” contendo serino-peptidases correspondem ao gene AAEL006425 de tripsina, o gene AAEL008079 de tripsina alfa e o gene AAEL009680 de quimotripsina. O local de expressão destes genes pôde ser atribuído ao intestino médio.

6.16 - O perfil de atividade proteolítica do intestino médio de *Aedes albopictus*, detectado por enzimografia, é composto por pelo menos onze bandas de atividade com um cinética própria de reação, sendo detectadas após duas horas.

6.17 - As massas moleculares das serino-peptidases identificadas por 2DE correspondem com as massas de algumas das bandas de atividade proteolítica observadas na enzimografia, sugerindo que pode se tratar das mesmas enzimas.

## 7 - BIBLIOGRAFIA

- Angulo-Valadez CE, Cepeda-Palacios R, Ascencio F, Jacquiet P, Dorchies P, Romero MJ, Khelifa RM. 2007. Proteolytic activity in salivary gland products of sheep bot fly (*Oestrus ovis*) larvae. *Vet Parasitol.* 149:117-125.
- Antranikian, G., Vorgias, C.E. and Bertoldo, C. 2005. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 96, 219–262.
- Arnon R, Neurath H 1969. An immunological approach to the study of evolution of trypsins. *Proc Natl Acad Sci USA*; 64:1623–1628.
- Ashton, P.D., Curwen, R.S., Wilson, R.A. 2001. Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins. *Trends Parasitol.*, 17: 198-202.
- Attardo GM, Hansen IA, Raikhel AS. 2005. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. *Insect Biochem and Mol Biology.* 35: 661-675.
- Barillas-Mury C, Graf R, Hagedorn HH, Wells MA. 1991. cDNA and deduced amino acid sequence of a blood meal induced trypsin from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem.* 21: 825-831.
- Barret A, Rawlings N, Woessner J 1998. *Handbook of proteolytic enzymes.* Academic Press, San Diego.
- Barrett AJ. 2004. Bioinformatics of proteases in the MEROPS database. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 7:334-341.
- Bayyareddy K, Andacht TM, Abdullah MA, Adang MJ. 2009. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes aegypti* Linnaeus (*Stegomyia*) (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect Biochem Mol Biol.* 39:279–286.
- Becnel JJ, Garcia J, Johnson M. 1996. Effects of three larvicides on the production of *Aedes albopictus* based on removal of pupal exuviae. *J Am Mosq Control Assoc*; 12: 499-502.
- Beyenbach KW, Baumgart S, Lau K, Piermarini PM, Zhang S. 2009. Signaling to the apical membrane and to the paracellular pathway: changes in the cytosolic proteome of *Aedes* Malpighian tubules. *J Exp Biol*, 212:329–340.

- Borges-Veloso A, Saboia-Vahia L, Cuervo P, Pires RC, Britto C, Fernandes N, d'Avila-Levy CM, De Jesus JB. 2012. Proteolytic profiling and comparative analyses of active trypsin-like serine peptidases in preimaginal stages of *Culex quinquefasciatus*. *Parasit Vectors*: 20;5:123.
- Borovsky D & Mahmood F. 1995. Feeding the mosquito *Aedes aegypti* with TMOF and its analogs; effect on trypsin biosynthesis and egg development. *Regul Pept.* 57: 273-281.
- Borovsky D & Meola SM. 2004. Biochemical and cytoimmunological evidence for the control of *Aedes aegypti* larval trypsin with Aea-TMOF. *Arch Insect Biochem Physiol.* 55:124-139.
- Borovsky D e Mahmood F 1995. Feeding the mosquito *Aedes aegypti* with TMOF and its analogs; effect on trypsin biosynthesis and egg development. *Regul Pept.* 57: 273-281.
- Borovsky D, Janssen I, Vanden Broeck J, Huybrechts R, Verhaert P, De Bondt H, Bylemans D, De Loof A 1996. Molecular sequencing and modeling of *Neobellieria bullata* trypsin. Evidence for translational control by *Neobellieria* trypsin-modulating oostatic factor. *Eur J Biochem.* 237: 279-287.
- Borovsky D, Song Q, Ma MC, Carlson DA 1994. Biosynthesis, secretion, and immunocytochemistry of trypsin modulating oostatic factor of *Aedes aegypti*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 27:27-38.
- Borovsky, D. & Schlein, Y., 1988. Quantitative determination of trypsinlike and chymotrypsinlike enzymes in insects, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 8: 249-260.
- Borror, D. J. & White R. E., 1970. Peterson Field Guides – Insects. Houghton Mifflin, New York.
- Briegel H. 1990. Metabolic relationship between female body size, reserves and fecundity of *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol.* 36: 165-172.
- Briegel H., Lea A. O. 1977. Ecdysone, the ovarian hormone and intestinal proteases in mosquitoes. *Experientia*; 33: 813.
- Cardoso Junior RP, Scandar SAS, Mello NV, Ernandes S, Botti MV, Nascimento EMM. 1997. Detecção de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, na zona urbana do município de Catanduva-SP, após controle de epidemia de dengue. *Rev Soc Bras Med Trop*; 30: 37-40.

- CDC. 2009. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/index.htm>. Acesso em: 22 maio.
- Cho WL, Tsao SM, Hays AR, Walter R, Chen JS, Snigirevskaya ES, Raikhel AS. 1999. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *J Biol Chem*. 274: 13311-13321.
- Clements AN 2000. *The Biology of mosquitoes*. Volume 1. Development, nutrition and reproduction. Chapman and Hall, London.
- Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz
- Craik CS, Largman C, Fletcher T, Rocznik S, Barr PJ, Fletterick R, Rutter WJ. 1985. Redesigning trypsin: alteration of substrate specificity.1: *Science*. 19; 228: 291-297.
- Cuervo P, Mesquita-Rodrigues C, D'avila Levy CM, Britto C, Pires FA, Gredilha R, Alves CR, Jesus JB. 2008. Serine protease activities in *Oxysarcodexia thornax* (Walker) (Diptera: Sarcophagidae) first instar larva. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 103: 504-506
- Dadd RH. 1975. Alkalinity within the midgut of mosquito larvae with alkaline-active digestive enzymes. *J. Insect. Physiol*. 21: 1847-1853.
- Davie EW, Neurath H 1955. Identification of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen. *J Biol Chem*; 212: 515– 529.
- DE Albuquerque C, Muhlia-Almazán A, Hernández-Cortes P, Garcia-Carreño FL 2001. Proteinases from marine organisms. In: Fingerman M, Nagabhushanam R (eds) *Recent advances in marine biotechnology*. Science Publishers, Plymouth, 209–238.
- DE Jesus JB; Cuervo P; Britto C; Sabóia-Vahia L; Silva-Filho FC; Borges-Veloso A; Petrópolis DB; Cupolillo E; Domont GB. 2009. Cysteine peptidase expression in *Trichomonas vaginalis* isolates displaying high and low virulence phenotypes. *J Proteome Res*. 8: 1555-1564.
- de Lima-Camara TN, Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R. 2006. Frequency and spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) in Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica*. 22: 2079-2084.
- de Souza RP, Rocco IM, Maeda AY, Spenassatto C, Bisordi I, Suzuki A, Silveira VR, Silva SJ, Azevedo RM, Tolentino FM, Assis JC, Bassi MG, Dambrós BP, Tumiotto GL, Gregianini TS, Souza LT, Timenetsky Mdo C, Santos CL. Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: looking beyond the veil. 2011. *PLoS Negl Trop Dis*. 5(12):e1439.

- Elpidina EN, Tsybina TA, Dunaevsky YE, Belozersky MA, Zhuzhikov DP, Oppert B. 2005. A chymotrypsin-like proteinase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Biochimie*; 87: 771-779.
- Estrada-Franco J.G, Craig Jr GB. 1995. Biology, disease relationships and control of *Aedes albopictus* Organização Panamericana de Saúde. Washington, (Publicação Técnica n° 42).
- Fazito-do-Vale V, Pereira MH, Gontijo NF. 2007. Midgut pH profile and protein digestion in the larvae of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Insect Physiol.* 53: 1151-1159.
- Felix CR, Betschart B, Billingsley PF, Freyvogel TA. 1991. Post-feeding induction of trypsin in the midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) is separable into to cellular phases. *Insect Biochem*, 21: 197-203.
- Fontaine A, Pascual A, Diouf I, Bakkali N, Bourdon S, Fusai T, Rogier C, Almeras L. 2011. Mosquito salivary gland protein preservation in the field for immunological and biochemical analysis. *Parasit Vectors*, 4:33.
- Forattini OP, Marques GR, Kakitani I, de Brito M, Sallum MA. 1998. Epidemiologic significance of *Aedes albopictus* breeding places in bromeliads. *Rev Saude Publica.* 32: 186-188.
- Forattini OP. 1986. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. *Rev Saúde Pública*; 20:244-5.
- Forattini OP., Marques GRAM, Brito M, Sallum MAM. 1998a. Brief communication an unusual ground larval habitat of *Aedes albopictus*. *Rev Saúde Pública*; 40: 121-122.
- Forratini O P. 1965. *Entomologia Médica* 2° volume. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Forratini OP. 1962. *Entomologia Médica* 1° volume. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Galán, J E, Pace, J, Hayman, M J. 1992. Involvement of the epidermal growth factor receptor in the mammalian cells by *Salmonella typhimurium*. *Nature.* 357: 588-589.
- Gibson R & Barker P. L. 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev*; 17: 285–346.
- Gilotra SK, Rozeboom LE, Bhattacharya. 1967. Observations on possible competitive displacement between populatins of *Aedes aegypti* Linnaeus and *Aedes albopictus* Skuse in Calcutta. *Bull Org Mond Santé*; 37: 437-446.



- Glasheen BM, Aashish TK, Page-McCaw A. 2009. Distinct functions for the catalytic and hemopexin domains of a *Drosophila* matrix metalloproteinase. PNAS. 106: 2659-2664.
- Golberg L & De Meillon B. 1948. The nutrition of the larva of *Aedes aegypti* Linnaeus: 3 – Lipid requirements. Biochem Jour. 43: 372-379.
- Gomes AC, Bitencourt MD, Natal D, Pinto PLS, Mucci LF, Paula M.B., Urbinatti PR, Barata JMS. 1999. *Aedes albopictus* em área rural do Brasil e implicações na transmissão de febre amarela silvestre. Rev Saúde Públ.; 33: 95-97.
- Gomes, A. C., Torres, M. A. N., Gutierrez, M. F. C., Lemos, F. L., Lima, M. L. N., Martins, J. F., Costa, Z. G. A. 2008. Registro de *Aedes albopictus* em áreas epizoóticas de febre amarela das Regiões Sudeste e Sul do Brasil (Diptera: Culicidae). Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, 17: 71-76.
- Gooding R. H. 1975. Digestive enzymes and their control in haematophagus arthropods. Acta Trop; 32: 96–111.
- Görg A, Weiss W, Dunn MJ. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics. 4: 3665-3685.
- Graf R, Raikhel AS, Brown MR, Lea AO, Briegel H. 1986. Mosquito trypsin: immunocytochemical localization in the midgut of blood-fed *Aedes aegypti* (L.). Cell Tissue Res. 245: 19-27.
- Graf R., Lea A. O., Briegel H. 1998. A temporal profile of the endocrine control of trypsin synthesis in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. J Insect Physiol; 44: 451–454.
- Graf, R. and Briegel, H., 1989. The synthetic pathway of trypsin in the mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera:Culicidae) and in vitro stimulation in isolated midguts. Insect Biochemistry 19: 129–137.
- Gubler DJ. Dengue. In Monath, T. P., 1988. The arboviruses: epidemiology and ecology, Boca Raton, CRC Press, Vol. II: 223-80.
- Gubler, D. J. 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. Trends Microbiol. 10: 100–103.
- Gubler, D. J. 2012. The Economic Burden of Dengue. Am J Trop Med Hyg. 1; 86: 743–744.
- Gunther J, Martinez-Munoz JP, Perez-Ishiwara DG, Salas-Benito J. 2007. Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico. Intervirology. 50: 347–352.

- Gwadz, RW & Spielman, A. 1973. Corpus allatum control of ovarian development in *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 19: 1441–1448.
- Hay RT: SUMO. 2005. A history of modification. *Mol Cell*, 18:1–12.
- Ho B.C., Khoo H.G., Chew L.M., Wong K.P., Ewert A. 1992. Food ingestion and digestive enzymes in larval *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.*; 29: 960-964.
- Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R. 2001. Frequência de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas, Brasil. *Rev Saúde Pública.* 35: 385-391.
- Honório NA, Silva WC, Leite PJ, Gonçalves JM, Lounibos LP, Lourenço-de-Oliveira R. 2003. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic área in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem do Inst Oswaldo Cruz.* 98: 191-198.
- Hu G & Leger RJ. 2004. A phylogenomic approach to reconstructing the diversification of serine proteases in fungi. *J Evol Biol.* 17:1204-1214.
- Hughes JH & Porter JE. 1956. Dispersal of mosquitoes through transportation with particular reference to immature stages. *Mosq News*; 16: 106-111.
- Jacobs-Lorena M, Oo MM 1996. The peritrophic matrix of insects, In: the biology of Disease Vectors, 1st edition. Edited by Beaty BJ, Marquardt WC. Colorado: University Press of Colorado. 318-332.
- Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J, Doerks T, Julien P, Roth A, Simonovic M, Bork P, von Mering C. 2009 STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res.* 37:D412–D416.
- Jordão BP, Lehane MJ, Terra WR, Ribeiro AF, Ferreira C. 1996. An immunocytochemical investigation of trypsin secretion in the midgut of the stablefly, *Stomoxys calcitrans*. *Insect Biochem Mol Biol.* May;26(5):445-53
- Juhn J, Naeem-Ullah U, Guedes B, Majid A, Coleman J, Pimenta P, Akram W, James A, Marinotti O. 2011. Spatial mapping of gene expression in the salivary glands of the dengue vector mosquito. *Aedes aegypti*. *Parasit Vectors*, 4:1.
- Kalhok SE, Tabak LM, Prosser DE, Brook W, Downe AE, White BN. 1993. Isolation, sequencing and characterization of two cDNA clones coding for trypsin-like enzymes from the midgut of *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* 2:71-79.

- Kawada H, Takemura S, Arikawa K, Takagi M. 2005. Comparative study on nocturnal behavior of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. J. Med. Entomol. 42: 312-318.
- Keil B, Dlouha V, Holeysovsky V, Sorm F 1968. Hypothesis of threedimensional arrangement of polypeptide chain in trypsin. Coll Czch Chem Comm; 33: 2307–2315.
- Killick-Kendrick, R. 1985. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vector. Bull. Soc. Pathol. Exot. 78: 747-755
- Knudsen AB. 1995. Global distribution and continuing spread of *Aedes albopictus*. Parassitologia Roma; 37: 91-97.
- Lehane MJ, Allingham PG, Weglicki P 1996. Composition of the peritrophic matrix of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. Cell Tissue Res. 283(3): 375-384.
- Lindenbach BD & Rice CM. 2001. In Fields Virology. Eds Knipe, D. M. & Howley, P. M. 991–1041, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Lockwood BC, North MJ, Scott KI, Bremner AF, Coombs GH. 1987. The use of a highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of trichomonads. Mol Biochem Parasitol. 24: 89-95.
- Lourenço-de-Oliveira, R. 2006. Principais Insetos Vetores e Mecanismos de Transmissão das Doenças Infecciosas e Parasitárias. In: Coura, J. R. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan. Cap. 7: 75-97.
- Lutz, A. & Neiva, A. 1912. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. Mem. Inst. O. Cruz, 4:84-95,
- Mahmood F & Borovsky D. 1993. Biosynthesis of serine proteases in *Lutzomyia anthophora* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 30: 683-688.
- Maidana NA & Yang HM. 2008. Describing the geographic spread of dengue disease by traveling waves: Math Biosci. 215: 64-77.
- Martin MM, Martin JS, Kukor JJ, Merritt RW. 1980. The digestion of protein and carbohydrate by the stream detritivore, *Tipula abdominalis* (Diptera: Tipulidae). Oecologia. 46: 360–364.
- Melo FL, Romano CM, Zanotto PMA. 2009. Introduction of Dengue Vírus 4 (DENV-4) Genotype I into Brazil from Asia? Plos Negl Trop Dis 3(4): e390.
- Mesquita-Rodrigues C, Saboia-Vahia L, Cuervo P, Masini d'Avila Levy C, Alves-Honório N, Domont GB, De Jesus JB. 2011. Expression of Trypsin-like serine peptidases in

- préimaginal stages of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Arch Insect Biochem Physiol, 76:223–235.
- Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde MS/SVS. 2011. Balanço Dengue. Informe Técnico 1: 1–12.
- Moore CG. 1999. *Aedes albopictus* in the United States: current status and prospects for further spread. J Am Mosq Control Assoc; 15: 221-227.
- MS. 1996. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Departamento de Operações. Coordenação de Controle de Doenças Transmitidas por Vetores. Manual de dengue: Vigilância Epidemiológica e Atenção ao Doente, 2ª edição, Brasília (DF).
- Muhlia-Almazán, A; Sánchez-Paz, A; García-Carreño, F, 2008. Invertebrate trypsins: a review. J Comp Physiol B. 178: 655–672.
- Nair PM, Choi J. 2012. Characterization and transcriptional regulation of thioredoxin reductase 1 on exposure to oxidative stress inducing environmental pollutants in *Chironomus riparius*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 161:134–139.
- Nair PM, Park SY, Choi J. 2011. Expression of catalase and glutathione S-transferase genes in *Chironomus riparius* on exposure to cadmium and nonylphenol. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 154:399–408.
- Nakajima Y, Tsuji Y, Homma K, Natori S. 1997. A novel protease in the pupal yellow body of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). Its purification and cDNA cloning. J Biol Chem 272: 23805-23810.
- Natal D, Urbinatti PR, Taipés-Lagos CB, Cereti-Júnior W, Diederichsen ATB, Souza RG, Souza SP. 1997. Encontro de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) em Bromeliaceae na periferia de São Paulo, SP, Brasil. Rev Saúde Pública. 31: 517-518.
- Nauen R, Sorge D, Sterner A, Borovsky D. 2001. TMOF-like factor controls the biosynthesis of serine proteases in the larval gut of *Heliothis virescens*. Arch Insect Biochem Physiol. Aug;47(4):169-80
- Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B, Xi Z, Megy K, Grabherr M, Ren Q, Zdobnov EM, Lobo NF, Campbell KS, Brown SE, Bonaldo MF, Zhu J, Sinkins SP, Hogenkamp DG, Amedeo P, Arensburger P, Atkinson PW, Bidwell S, Biedler J, Birney E, Bruggner RV, Costas J, Coy MR, Crabtree J, Crawford M, Debruyne B, Decaprio D, Eiglmeier K, Eisenstadt E, El-Dorry H, Gelbart WM, Gomes SL, Hammond M, Hannick LI, Hogan JR, Holmes MH, Jaffe D, Johnston JS, Kennedy RC, Koo H, Kravitz S, Kriventseva EV, Kulp D, Labutti K,

- Lee E, Li S, Lovin DD, Mao C, Mauceli E, Menck CF, Miller JR, Montgomery P, Mori A, Nascimento AL, Naveira HF, Nusbaum C, O'leary S, Orvis J, Pertea M, Quesneville H, Reidenbach KR, Rogers YH, Roth CW, Schneider JR, Schatz M, Shumway M, Stanke M, Stinson EO, Tubio JM, Vanzee JP, Verjovski-Almeida S, Werner D, White O, Wyder S, Zeng Q, Zhao Q, Zhao Y, Hill CA, Raikhel AS, Soares MB, Knudson DL, Lee NH, Galagan J, Salzberg SL, Paulsen IT, Dimopoulos G, Collins FH, Birren B, Fraser-Liggett CM, Severson DW. 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*. 22;316 (5832):1718-23
- Nogueira RM, de Araújo JM, Schatzmayr HG. 2007. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica*. 22: 358-363.
- Noriega F. G. & Wells MA 1999. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol* 45: 613–620.
- Noriega FG, Edgar KA, Bechet R, Wells MA. 2002. Midgut exopeptidase activities in *Aedes aegypti* are induced by blood feeding. *J Insect Physiol*. 48: 205-212.
- Noriega FG, Edgar KA, Goodman WG, Shah DK, Wells MA. 2001. Neuroendocrine factors affecting the steady-state levels of early trypsin mRNA in *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol*. 47: 515-522.
- Noriega FG, Pennington JE, Barillas-Mury C, Wang XY, Wells MA. 1996. *Aedes aegypti* midgut early trypsin is post-transcriptionally regulated by blood feeding. *Insect Molecular Biology*; 5:25-29.
- Noriega FG, Shah DK, Wells MA. 1997. Juvenile hormone controls early trypsin gene transcription in the midgut of *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*. 6: 63-66.
- Noriega FG, Wang XY, Pennington JE, Barillas-Mury CV, Wells MA. 1996. Early trypsin, a female-specific midgut protease in *Aedes aegypti*: isolation, aminoterminal sequence determination, and cloning and sequencing of the gene. *Insect Biochem Mol Biol*. 26:119-126.
- O'Farrell PH. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol. Chem*. 250: 4007-4021.
- O'Meara GF, Gettman AD, Evans Jr IF, Curtis GA. 1993. The spread of *Aedes albopictus* in Florida. *American Entomologist* 39: 163-172.
- Okuda K, Caroci A, Ribolla P, Marinotti O, de Bianchi AG, Bijovsky AT. 2005. Morphological and enzymatic analysis of the midgut of *Anopheles darlingi* during blood digestion. *J Insect Physiol*. 51: 769-776.

- Page MJ & Di Cera E. 2008. Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci.* 65:1220-1236.
- Page-McCaw A. 2008. Remodeling the model organism: matrix metalloproteinase functions in invertebrates. *Semin Cell Dev Biol* 19: 14-23.
- Papaleo E, Pasi M, Riccardi L, Sambì I, Fantucci P, De Gioia L. 2009. Protein flexibility in psychrophilic and mesophilic trypsins. Evidence of evolutionary conservation of protein dynamics in trypsin-like serine-proteases. *FEBS Lett.* 582: 1008-1018.
- Passos, R A; Marques, G R A M; Voltolini, J C & Condino, M L F. 2003. Dominance of *Aedes aegypti* over *Aedes albopictus* in the southeastern coast of Brazil. *Rev. Saúde Pública.* 37: 729-734.
- Patramool S, Surasombatpattana P, Luplertlop N, Sévéno M, Choumet V, Thomas F, Missé D. 2011. Proteomic analysis of an *Aedes albopictus* cell line infected with Dengue serotypes 1 and 3 viruses. *Parasit Vectors*, 4:138.
- Philip J.M, Fitches E, Harrison R.L., Bonning B, Gatehouse J.A. 2007. Characterisation of functional and insecticidal properties of a recombinant cathepsin L-like proteinase from flesh fly (*Sarcophaga peregrina*), which plays a role in differentiation of imaginal discs. *Insect Biochem Mol Biol.* 37: 589-600.
- Pires FA, Moya-Borja GE, Barreira JD, Pinho RT, Alves CR. 2007. The main proteinases in *Dermatobia hominis* second and third instars larvae are serine-proteinases. *Vet Parasitol.* 145: 326-331.
- Pirraglia C, Myat MM. 2010. Genetic regulation of salivary gland development in *Drosophila melanogaster*. *Front Oral Biol*, 14:32–47.
- Pontes RJS & Ruffino-Netto A. 1994. Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. *Rev Saúde Pública*; 28: 218-227.
- Popova-Butler A, Dean DH. 2009. Proteomic analysis of the mosquito *Aedes aegypti* midgut brush border membrane vesicles. *J Insect Physiol*, 55:264–272.
- Pxneiderer G, Linke R, Reinhardt G. 1970. On the evolution of endopeptidases. 8. Cross-reactions of trypsins and chymotrypsins of different species. *Comp Biochem Physiol* 33: 955–967.
- Rai KS. 1986. Genetics of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc.* 2: 429-436.
- Raikhel AS, Dhadialla TS. 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu Rev Entomol*, 37:217–251.

- Reiter P, Amador MA, Anderson RA, Clark GG. 1995. Short report: dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. *Am J Trop Med Hyg.* 52: 177-179.
- Reumer A, Bogaerts A, Van Loy T, Husson SJ, Temmerman L, Choi C, Clynen E, Hassan B, Schoofs L. 2009. Unraveling the protective effect of a *Drosophila* phosphatidylethanolamine-binding protein upon bacterial infection by means of proteomics. *Dev Comp Immunol*, 33:1186–1195.
- Reynolds J, Poelchau MF, Rahman Z, Armbruster PA, Denlinger DL. 2012. Transcript profiling reveals mechanisms for lipid conservation during diapause in the mosquito. *Aedes albopictus*. *J Insect Physiol*, 58:966–973.
- Ribeiro JM, Francischetti IM. 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol*, 48:73–88.
- Ribeiro JM. 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis*, 4:143–152.
- Ribeiro JMC, Arcà B, Lombardo F, Calvo E, My V. 2007. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics*, 8:6
- Rightor JA, Farmer Brasil, Clark JL Jr. 1987. *Aedes albopictus* in Chicago, Illinois. *J Am Mosq Control Assoc*; 3: 657.
- Rodrigues J, Agrawal N, Sharma A, Malhotra P, Adak T, Chauhan VS, Bhatnagar RK. 2007. Transcriptional analysis of an immune-responsive serine protease from Indian malarial vector, *Anopheles culicifacies*. *BMC Mol Biol.* 8: 33.
- Romoser WS 1996. The vector alimentary system, In: *The Biology of Disease Vectors*, 1st edition. Edited by Beaty, B.J. and Marquardt, W.C.; Colorado: University Press of Colorado, pp. 298- 317.
- Rosenfeld A, Vanderberg JP. 1998. Identification of electrophoretically separated proteases from midgut and hemolymph of adult *Anopheles stephensi* mosquitoes. *J Parasitol.* 84: 361-365.
- Rossi GC, Pascual NT, Krsticevic FL. 1999. First record of *Aedes albopictus* (Skuse) from Argentina. *J Am Mosq Control Assoc.* 15: 422.
- Saboia-Vahia L, Borges-Veloso A, Cuervo P, Junqueira M, Mesquita-Rodrigues C, Britto C, Domont GB, De Jesus JB. 2012. Protein expression in the midgut of sugar-fed *Aedes albopictus* females. *Parasit & Vectors*: 11;5:290.

- Sánchez-Vargas I, Scott JC, Poole-Smith BK, Franz AW, Barbosa-Solomieu V, Wilusz J, Olson KE, Blair CD. 2009. Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. *PLoS Pathog*, 5:e1000299.
- Sanders HR, Evans AM, Ross LS, Gill SS. 2003. Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector. *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*, 33:1105–1122.
- Santos R. 2003. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002) *Rev Saúde Pública* 37: 671-673.
- Scheele GA. 1975. Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. *J Biol Chem*. 250: 5375-585.
- Schreiber ET & Cuda JP. 1994. Evaluation of public information packets for source reduction in three socioeconomic areas of Tampa, Florida. *J Mosq Control Assoc* 10: 154-162.
- Schrøder, H.K., Willassen, N.P. and Smalås, A.O. 1998. Structure of a non-psychrophilic trypsin from a cold-adapted fish species. *Acta Crystallogr. D* 54, 780–798.
- Sea VR, Cruz AC, Gurgel RQ, Nunes BT, Silva EV, Dolabella SS, dos Santos RL. 2013. Underreporting of Dengue-4 in Brazil due to low sensitivity of the NS1 Ag test in routine control programs. *PLoS One*. 8(5):e64056.
- Settleman J. 2001. Rac 'n Rho: the music that shapes a developing embryo. *Dev Cell*, 1:321–331.
- Sharma, B.R., Martin, M.M., Shafer, J.A., 1984. Alkaline proteases from the gut fluids of detritus feeding larvae of the crane fly *Tipula abdominalis* (Say) (Diptera: Tipulidae). *Insect Biochem*. 14: 37–44.
- Sirot LK, Hardstone MC, Helinski ME, Ribeiro JM, Kimura M, Deewatthanawong P, Wolfner MF, Harrington LC. 2011. Towards a semen proteome of the dengue vector mosquito: protein identification and potential functions. *PLoS Negl Trop Dis*, 5:e989.
- Smalås, A.O., Heimstad, E.S., Hordvik, A., Willassen, N.P. and Male, R. 1994. Cold-adaptation of enzymes: structural comparison between salmon and bovine tryptins. *Proteins* 20: 149–166.
- Smith, CE. 1956. The history of dengue in tropical Asia and its probable relationship to the mosquito *Aedes aegypti*. *J Trop Med Hyg*. 59: 243–251.



- Souza-Santos R. 1999. Fatores associados à ocorrência de formas imaturas de *Aedes aegypti* na Ilha do Governador, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Soc Brasil Med Trop.* 32: 373-382.
- Sprenger D & Wuithiranyagool T. 1986. The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. *J Am Mosq Control Assoc.* 2: 217-219.
- Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguéz P, Doerks T, Stark M, Muller J, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. 2011. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res*, 39:D561–D568.
- Tabouret G, Bret-Bennis L, Dorchies P, Jacquiet P. 2003. Serine protease activity in excretory-secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. *Vet Parasitol* 114, 305-314.
- Tchankouo-Nguetchou S, Bourguet E, Lenormand P, Rousselle JC, Namane A, Choumet V. 2012. Infection by chikungunya virus modulates the expression of several proteins in *Aedes aegypti* salivary glands. *Parasit Vectors.* 15;5:264.
- Telang A, Li Y, Noriega F G, Brown M R. 2005. Effects of larval nutrition on the endocrinology of mosquito egg development. *J Exp Biol.* 209: 645-655.
- Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva Azevedo R, Teixeira Nunes MR, da Costa Vasconcelos PF. 2011. Dengue vírus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis* 17, 938–940.
- Terra WR 2001. The origins and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch Insect Biochem Physiol* 109B:1-62.
- Terra WR, Ferreira C 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp Biochem Physiol.* 47(2):47-61.
- Tetreau G, Bayyareddy K, Jones CM, Stalinski R, Riaz MA, Paris M, David JP, Adang MJ, Després L. 2012. Larval midgut modifications associated with Bti resistance in the yellow fever mosquito using proteomic and transcriptomic approaches. *BMC Genomics.* 15;13:248.
- Thomas, T. and Cavicchioli, R. 1998. Archaeal cold-adapted proteins: structural and evolutionary analysis of the elongation factor 2 proteins from psychrophilic, mesophilic and thermophilic methanogens. *FEBS Lett.* 439, 281–286.
- Troyo A, Calderón-Arguedas O, Fuller DO, Solano ME, Avendaño A, Arheart KL, Chadee DD, Beier JC. 2008. Seasonal profiles of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larval

- habitats in an urban area of Costa Rica with a history of mosquito control. *J Vector Ecol.* 33: 76-88.
- Trpis M. 1977. Autogeny in diverse populations of *Aedes aegypti* from East Africa. *Tropenmed Parasitol.* 28: 77-82.
- Tsybina TA, Dunaevsky YE, Belozersky MA, Zhuzhikov DP, Oppert B, Elpidina EN. 2005. Digestive proteinases of yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae: purification and characterization of a trypsin-like proteinase. *Biochemistry (Mosc)* 70: 300-305.
- Vasilakis N, Weaver SC. 2008. The history and evolution of human dengue emergence. 1: *Adv Virus Res.* 72: 1-76.
- Venancio TM, Cristofolletti PT, Ferreira C, Verjovski-Almeida S, Terra WR. 2009. The *Aedes aegypti* larval transcriptome: a comparative perspective with emphasis on trypsins and the domain structure of peritrophins. *Insect Mol Biol.* 18:33-44.
- Venancio TM, Cristofolletti PT, Ferreira C, Verjovski-Almeida S, Terra WR. 2009. The *Aedes aegypti* larval transcriptome: a comparative perspective with emphasis on trypsins and the domain structure of peritrophins. *Insect Molecular Biology*;18:33-44.
- Volz J, Osta M A, Kafatos F C, Müller H M. 2005. The roles of two clip domains serine proteases in innate immune responses of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *The Journal of Biological Chem.* 280: 40161-40168.
- Wasinpiyamongkol L, Patramool S, Luplertlop N, Surasombatpattana P, Doucoure S, Mouchet F, Séveno M, Remoue F, Demettre E, Brizard JP, Jouin P, Biron DG, Thomas F, Missé D. 2010. Blood-feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins. *Proteomics*, 10:1906–1916.
- WHO. 1997. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition; World Health Organization, Geneva.
- WHO. 2001. Yellow fever factsheet. World Health Organization, Geneva.
- WHO. 2002. Dengue factsheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
- WHO. 2009. Yellow fever. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>
- Xavier MJ, Williams MJ. 2011. The Rho-family GTPase Rac1 regulates integrin localization in *Drosophila* immunosurveillance cells. *PLoS One*, 6:e19504.
- Xu W, Huang F S, Hao H X, Duan J H, Qiu Z W. 2006. Two serine proteases from *Anopheles dirus* haemocytes exhibit changes in transcript abundance after infection

- of an incompatible rodent malaria parasite, *Plasmodium yoelli*. Vet. Parasitology. 139: 93-101.
- Yan XH, De Bondt HL, Powell CC, Bullock RC e Borovsky D 1999. Sequencing and characterization of the citrus weevil, *Diaprepes abbreviatus*, Trypsin cDNA. Eur. J. Biochem. 262: 627-636.
- Yang YJ & Davies D. 1971. Trypsin and chymotrypsin during metamorphosis in *Aedes aegypti* and properties of the chymotrypsin. J Insect Physiol 17:117–131.
- Yang YJ & Davies DM. 1972. The effect of cations on chymotrypsin from *Aedes aegypti* larvae. J Insect Physiol. 18: 747-755.
- Yano T, Takahashi N, Kurata S, Natori S. 1995. Regulation of the expression of cathepsin B in *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) at the translational level during metamorphosis. Eur J Biochem 234: 39-43.
- Zhao Z & Russell P. J. 2003. Trypsin activity assay in substrate-specific one- and two-dimensional gels: a powerful method to separate and characterize novel proteases in active form in biological samples. Electrophoresis 24: 3284-3288.
- Zhao Z, Raftery M. J, Niu X. M, Daja M. M, Russell P.J. 2004. Application of in-gel protease assay in a biological sample: characterization and identification of urokinase-type plasminogen activator (uPA) in secreted proteins from a prostate cancer cell line PC-3. Electrophoresis 25: 1142-1148.

**ANEXO**

Outras produções no período:

Borges-Veloso A, **Saboia-Vahia L**, Cuervo P, Pires RC, Britto C, Fernandes N, d'Avila-Levy CM, De Jesus JB. Proteolytic profiling and comparative analyses of active trypsin-like serine peptidases in preimaginal stages of *Culex quinquefasciatus*. Parasit Vectors. 2012 Jun 20;5:123.

Cuervo P, De Jesus JB, **Saboia-Vahia L**, Mendonça-Lima L, Domont GB, Cupolillo E. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. J Proteomics. 2009 Nov 2;73(1):79-92.