

Tatiane Sanches Soares

**Estudos moleculares de enzimas do tipo tripsina presentes no intestino
médio de larvas de *Aedes aegypti***

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de São Paulo,
para a obtenção do Título de Mestre
em Ciências.**

São Paulo

2009

Tatiane Sanches Soares

**Estudos moleculares de enzimas do tipo tripsina presentes no intestino
médio de larvas de *Aedes aegypti***

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de São Paulo,
para a obtenção do Título de Mestre
em Ciências.**

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Sadae Tanaka

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco José A. Lemos

São Paulo

2009



Universidade Federal de São Paulo
Departamento de Bioquímica

Chefe de Departamento:

Profa Dra Marimélia Aparecida Porcionatto

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular:

Profa Dra Helena Bonciani Nader

Soares, Tatiane Sanches

Estudos moleculares de enzimas do tipo tripsina presentes no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*.

XV, 68 fl.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular.

Molecular studies of trypsin-like enzymes present in midgut of *Aedes aegypti* larvae.

1. *Aedes aegypti*. 2. Enzimas digestivas. 3. Tripsina. 4. Mosquito. 5. Inibidores de serinoproteases. 6. Larvas.

"Pesquisar é ver o que outros viram e pensar o que nenhum outro pensou"

(Albert Szent-Gyorgyi)

Morre lentamente quem se transforma em escravo do hábito, repetindo todos os dias os mesmos trajetos, quem não muda de marca. Não se arrisca a vestir uma nova cor ou não conversa com quem não conhece. Morre lentamente quem faz da televisão o seu guru.

Morre lentamente quem evita uma paixão, quem prefere o negro sobre o branco e os pontos sobre os "is" em detrimento de um redemoinho de emoções, justamente as que resgatam o brilho dos olhos, sorrisos dos bocejos, corações aos tropeços e sentimentos.

Morre lentamente quem não vira a mesa quando está infeliz com o seu trabalho, quem não arrisca o certo pelo incerto para ir atrás de um sonho, quem não se permite pelo menos uma vez na vida, fugir dos conselhos sensatos.

Morre lentamente quem não viaja, quem não lê, quem não ouve música, quem não encontra graça em si mesmo.

Morre lentamente quem destrói o seu amor-próprio, quem não se deixa ajudar.

Morre lentamente, quem passa os dias queixando-se da sua má sorte ou da chuva incessante.

Morre lentamente, quem abandona um projeto antes de iniciá-lo, não pergunta sobre um assunto que desconhece ou não responde quando lhe indagam sobre algo que sabe.

Evitemos a morte em doses suaves, recordando sempre que estar vivo exige um esforço muito maior que o simples fato de respirar. Somente a perseverança fará com que conquistemos um estágio esplêndido de felicidade.

Pablo Neruda

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus; não daria somente um passo que não fosse de Sua vontade. O que muitos podem chamar de sorte eu chamo de fé; essa é a maior força que pode impulsionar o ser humano e de onde tiramos força para alcançar qualquer objetivo.

À minha orientadora e amiga Cida, pelos ensinamentos, pela presença constante, pela orientação, pela ótima companhia. Mostrando que a arte de ensinar vem do amor pelo que se faz, em quem eu me espelho e admiro.

Ao meu co – orientador Franzé, pela base científica, pela amizade, pelo apoio, pela grande ajuda no trabalho e por ter me encaminhado até São Paulo, dizendo que isso seria importante para mim, e realmente foi.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Renan, Diego, Diogo, Renata, Moiaxi, Marina, Flávia e Rafael, pela amizade, pelos dias maravilhosos, pelo senso de humor e pela compreensão do verdadeiro sentido de grupo. Em especial o Renan, o Diogo e o Diego pela grande amizade que foi formada.

Ao Ricardo, por ter me ajudado na parte de purificação, pelos ensinamentos bioquímicos e pelos momentos de descontração após o trabalho e principalmente pela amizade.

À minha família, que me deu a base, sem ela não haveria crescimento. Pelo apoio quando tantas vezes tudo estava errado, me mostrando que eu era capaz e que eles acreditavam em mim. A eles pelo apoio, carinho, amizade e pela união. Em especial à minha mãe, Maria José, por todo amor, apoio e compreensão pela minha ausência; ela é o sentido da minha vida.

Ao Fabrício, pelo carinho, pela compreensão pela distância a maior parte desta tese e por minha falta de tempo, pelo enorme apoio que tem me dado e pelo companheirismo.

Às minhas amigas Kamilla, Natália e Analiz, pela eterna amizade. Em especial à Analiz pela ajuda nas dissecções dos mosquitos.

À Dra Izaura Yoshico Hirata do Departamento de Biofísica da UNIFESP, pelo sequenciamento da região N-terminal da proteína purificada e pela enorme simpatia.

À Sabrina, pelos sequenciamentos de nucleotídeos ao longo deste trabalho.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Bioquímica que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

Este trabalho foi financiado por:

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo

Sumário

Abreviaturas	I
Tabela de aminoácidos	II
Lista de figuras	III
Lista de tabelas	IV
1. Introdução	1
1.1. <i>Aedes aegypti</i>	1
1.1.1. Classificação	1
1.1.2. Biologia e habitat.....	1
1.1.3. Distribuição geográfica	3
1.1.4. A Importância do controle dos mosquitos.....	5
1.1.5. Controle do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	7
1.1.6. Características gerais do sistema digestivo de insetos	9
1.1.7. O sistema digestivo da larva e do adulto do mosquito	11
1.2. Proteases	14
1.3. Inibidores de serinoproteases	16
1.4. Tripsinas de <i>Aedes aegypti</i>	16
2. Objetivos	19
3. Materiais e métodos	20
3.1. Análise dos transcritos de tripsinas presentes no mosquito <i>Aedes aegypti</i>	20
3.1.1. Extração do RNA total do intestino médio dos diferentes estádios do <i>Aedes aegypti</i>	20
3.1.2. Construção da primeira fita de cDNA	21
3.1.3. Construção dos oligonucleotídeos degenerados	21
3.1.4. Amplificação dos fragmentos de DNA dos genes de tripsina presentes no intestino médio de larvas de 4º instar por PCR	21
3.1.5. Eletroforese em gel de agarose	22
3.1.6. Extração de fragmento de DNA do gel de agarose	22
3.1.7. Ligação dos fragmentos ao vetor de clonagem pGEM-T	23
3.1.8. Precipitação de DNA	23

3.1.9. Transformação da bactéria <i>E. coli</i> (DH5α) por eletroporação	24
3.1.10. Sequenciamento automático de DNA.....	24
3.1.11. Análise por PCR semi-quantitativo da expressão de tripsinas de <i>Aedes aegypti</i> em diferentes estádios de vida	25
3.2. Purificação e caracterização das tripsinas presentes no intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	26
3.2.1. Preparação do extrato do intestino médio de larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	26
3.2.2. Preparo da resina BPTI-Sepharose	26
3.2.3. Cromatografia de afinidade em coluna BPTI-Sepharose	27
3.2.4. Cromatografia de troca iônica em coluna Resource S	27
3.2.5. Cromatografia de fase reversa em coluna <i>Sephasil peptide C₈</i>	28
3.2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).....	28
3.2.7. Coloração de gel de poliacrilamida por prata	29
3.2.8. Sequenciamento de aminoácidos da tripsina purificada	30
3.2.9. Determinação da constante de <i>Michaelis Menten</i> (K_m)	30
3.2.10. Determinação da constante de dissociação aparente (K_i)	31
3.2.11. Zimografia em gel de poliacrilamida.....	31
4. Resultados	33
4.1. Pequena biblioteca de fragmentos de DNA de tripsinas de larvas de 4º instar de <i>Aedes aegypti</i>	33
4.2. Presença de transcritos de tripsina em diferentes estádios de vida do mosquito.....	38
4.3. Análise do perfil proteolítico das enzimas digestivas do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	39
4.4. Purificação e caracterização de tripsina nativa do intestino médio de larvas de 4º instar de <i>Aedes aegypti</i>	42
5. Discussão	49
5.1. Pequena biblioteca de fragmentos de DNA de tripsina de larvas de 4º instar de <i>Aedes aegypti</i>	49
5.2. A presença de transcritos de tripsina em diferentes estádios de vida do mosquito	50

5.3. Purificação e caracterização da tripsina nativa do intestino médio de larvas de 4º instar	51
6. Resumo	55
7. Abstract	56
8. Referências Bibliográficas	57
9. Anexo I	68

Abreviaturas

A₂₁₅ - Absorbância de ondas eletromagnéticas em 215 nm

A₂₈₀ - Absorbância de ondas eletromagnéticas em 280 nm

A₄₀₅ - Absorbância de ondas eletromagnéticas de 405 nm

AaTI – Inibidor de Tripsina de *Aedes aegypti*

APMSF – 4- Fluoreto de amidinofenilmetilsulfonil

BPTI – Inibidor de Tripsina Pancreática Bovina

DEPC - Dietil pirocarbonato

dNTP – Deóxido nucleotídeos (dATP + dCTP + dGTP + dTTP)

FHD – Febre Hemorrágica da Dengue

HiTI – Inibidor de Tripsina da mosca *Haematobia irritans irritans*

HPLC – “High performance liquid chromatography”

K_i – Constante de dissociação

mAU – Unidades de miliabsorbância

N-terminal – Amino terminal

PCR – Reação em cadeia pela polimerase

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil

pNA – para-nitroanilina

RT PCR - Reação em cadeia pela polimerase por transcriptase reversa

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

TFA – Ácido trifluoracético

U – Unidade

Tabela de aminoácidos

Abreviação		Aminoácido	Abreviação		Aminoácido
Ala	A	Alanina	Leu	L	Leucina
Arg	R	Arginina	Lys	K	Lisina
Asn	N	Asparagina	Met	M	Metionina
Asp	D	Ácido Aspártico	Phe	F	Fenilalanina
Cys	C	Cisteína	Pro	P	Prolina
Glu	E	Ácido Glutâmico	Ser	S	Serina
Gln	Q	Glutamina	Thr	T	Treonina
Gly	G	Glicina	Trp	W	Triptofano
His	H	Histidina	Tyr	Y	Tirosina
Ile	I	Isoleucina	Val	V	Valina

Listas de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	3
Figura 2. Distribuição de <i>Aedes aegypti</i> nas Américas	5
Figura 3. Áreas endêmicas de dengue no mundo	7
Figura 4. Sistema digestivo do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	13
Figura 5. Representação esquemática da interação enzima - substrato	15
Figura 6. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos das enzimas tipo tripsina de <i>Aedes aegypti</i>	34
Figura 7. Gel de agarose de produtos de PCR com oligonucleotídeos degenerados para região interna das tripsinas de <i>Aedes aegypti</i>	35
Figura 8. PCR semi quantitativo da expressão de duas enzimas do tipo tripsina nos diferentes estádios de vida do <i>Aedes aegypti</i>	39
Figura 9. Zimografia de atividades proteolíticas presentes em larvas e adultos de <i>Aedes aegypti</i>	40
Figura 10. Zimografia de extrato do intestino médio de larvas de 4º instar incubado com diferentes inibidores de proteases	41
Figura 11. Atividade proteolítica dos extratos de intestino médio dos diferentes estádios larvais	41
Figura 12. Cromatografia de afinidade em uma coluna BPTI-Sepharose	43
Figura 13. Cromatografia de troca iônica em coluna Resource S do material proveniente da cromatografia de afinidade	44
Figura 14. Cromatografia de fase reversa em coluna <i>Sephasil peptide C₈</i> de tripsina purificada por cromatografia de troca iônica	45
Figura 15. SDS–PAGE	46
Figura 16. Alinhamento das sequências de aminoácidos das enzimas do tipo tripsina com alta similaridade na região N-terminal obtida de <i>Aedes aegypti</i> ..	47

Lista de tabelas

Tabela 1. Sequências de aminoácidos de enzimas hipotéticas do tipo tripsina identificadas no intestino médio de larvas de 4º instar do *Aedes aegypti*. 37

Tabela 2. Constante de dissociação aparente (K_i), por diferentes inibidores de tripsina, para a tripsina purificada de larva de *Aedes aegypti* 48

1. Introdução

1.1. *Aedes aegypti*

1.1.1. Classificação

Os mosquitos são insetos que pertencem à ordem Diptera (composta de 85.000 espécies), família Culicidae (composta de 3200 espécies) que é subdividida em três subfamílias: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitinae (Snodgrass, 1959; Daly *et al.*, 1998). A Culicinae é a maior subfamília, compreendendo 34 gêneros e cerca de 3.000 espécies, inclui três gêneros da tribo Aedini que ocorrem no Brasil: *Aedes*, *Psorophora* e *Haemagogus*. Os seguintes subgêneros de *Aedes* ocorrem no Brasil: *Ochlerotatus*, *Stegomyia*, *Howardina* e *Protomacleaya*. As espécies de *Aedes* de importância epidemiológica estão agrupadas nos subgêneros *Stegomyia* e *Ochlerotatus*. O subgênero *Stegomyia* é um subgênero do Velho Mundo, particularmente da região etíópica, mas duas de suas espécies invadiram países fora de sua distribuição zoogeográfica original, incluindo o Brasil: *Aedes (Stegomyia)* e *Aedes (Stegomyia) albopictus*. O mosquito *Ae. aegypti* foi introduzido no Brasil durante o período colonial, provavelmente na época do tráfico de escravos e é um importante alvo de estudo por ser o principal vetor do dengue e da febre amarela (Consoli e DeOliveira, 1997).

1.1.2. Biologia e habitat

Os mosquitos, em seu ciclo de vida (Figura 1), apresentam quatro estádios de desenvolvimento distintos: ovo, larva, pupa e adulto (Matheson, 1932). Durante o desenvolvimento larval, o mosquito passa por quatro estádios

ou instares. As larvas de *Ae. aegypti* vivem em pequenos corpos d'água temporários e se alimentam de matéria orgânica particulada. Vários estudos mostraram que detritos, bactérias, fungos e algas são fontes nutricionais importantes para larvas de mosquito em seu ambiente natural (Von Durgern e Briegel, 2001; Gimnig *et al.*, 2002). Essas larvas também são conhecidas como retalhadoras que se alimentam de invertebrados mortos (Merritt *et al.*, 1992). Muitas espécies de insetos, após a muda, alimentam-se do exoesqueleto descartado, que é rico em quitina, para reciclar seus componentes (Mira, 2000).

O estágio de pupa é um estágio de transição, onde o adulto se desenvolve dentro do revestimento da pupa, sem se alimentar. As pupas vivem na água até o adulto emergir (Consoli e DeOliveira, 1997).

Somente as fêmeas dos mosquitos são hematófagas, visto que os nutrientes provenientes do sangue são fundamentais para o desenvolvimento dos ovos (Consoli e DeOliveira, 1997). As fêmeas depositam seus ovos, isoladamente, diretamente sobre a superfície líquida ou em um substrato úmido, próximo à água ou em local inundável. Os ovos são resistentes à dessecação, podendo permanecer viáveis mais de um ano em locais secos. As fêmeas do *Ae. aegypti* possuem hábitos diurnos, preferencialmente ao amanhecer e antes do pôr do sol. Porém, podem picar durante o dia todo, se escondendo dentro das casas e buscando refúgio atrás de objetos e móveis (Corbet e Smith, 1974).

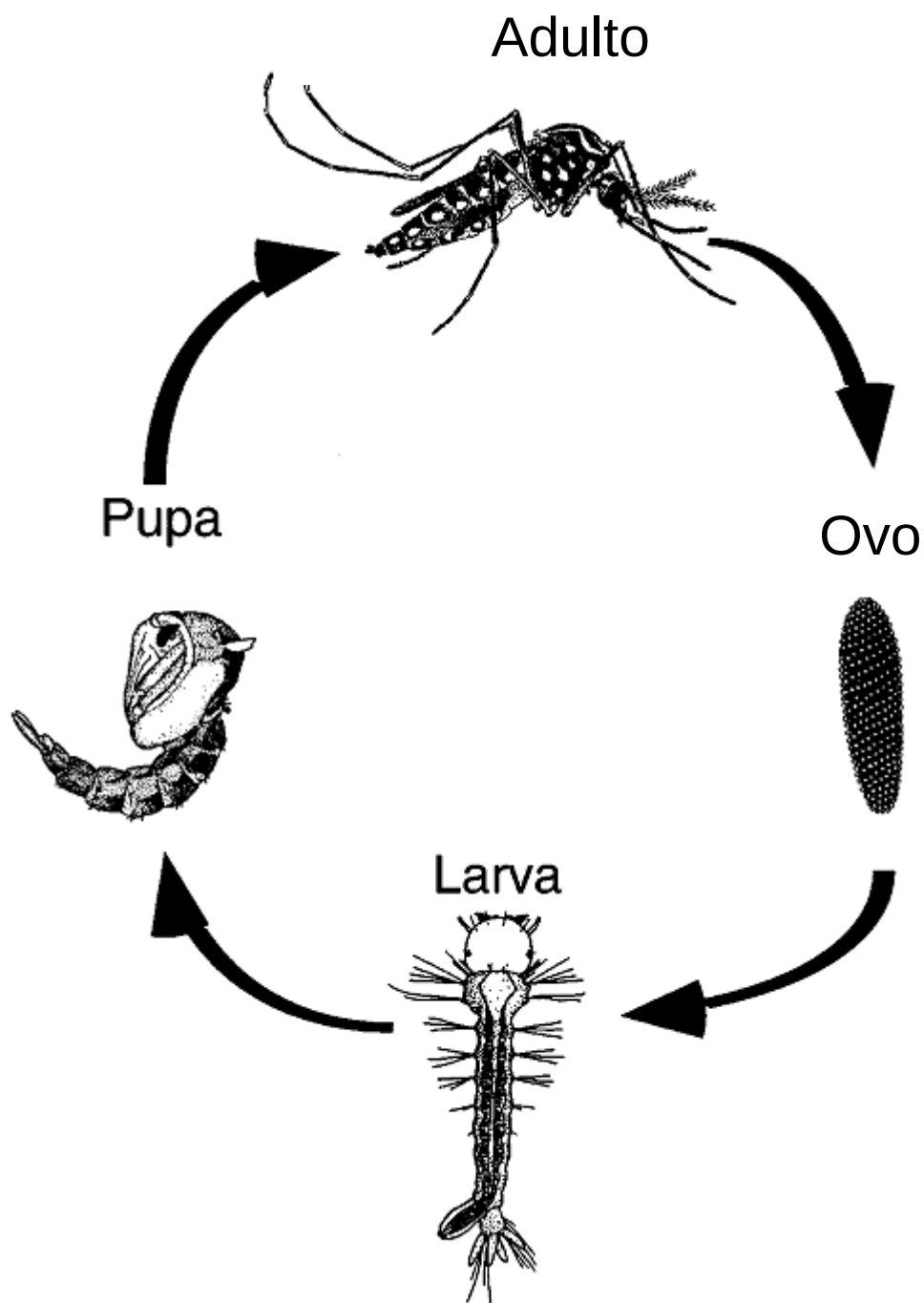


Figura 1. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Fonte: Modificado de Christophers (1960).

1.1.3. Distribuição geográfica

O mosquito *Ae. aegypti* possui ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais (Miller e Novak, 1985). Embora oriundo da África, provavelmente da Etiópia, este mosquito tem acompanhado o homem em sua travessia pelo

mundo através das navegações, tendo sido amplamente introduzido em locais favoráveis ao seu desenvolvimento (Matheson, 1932; Consoli e DeOliveira, 1997).

Durante o período colonial, o *Ae. aegypti* foi introduzido no Brasil pelas diversas embarcações que chegavam ao nosso território. E, posteriormente, devido ao seu potencial como vetor da febre amarela, foi fortemente combatido (Consoli e DeOliveira, 1997). O mosquito *Ae. aegypti*, que havia sido erradicado em vários países do continente americano na década de 50, por causa de falhas na vigilância epidemiológica, a não erradicação do mosquito em países vizinhos e as mudanças sociais e ambientais propiciadas pela urbanização acelerada no final da década de 60, voltou a infestar o Brasil com uma vasta distribuição pelos estados litorâneos, Região Centro-Oeste, Minas Gerais e Tocantins (Consoli e DeOliveira, 1997; Tauil, 2002). A figura 2 mostra a distribuição de *Ae. aegypti* nas Américas em 1970, ao final do programa de erradicação do mosquito, e em 2002 com a reinfestação das Américas por esse mosquito.

O *Ae. aegypti* pode ser encontrado em todo o território brasileiro e sua ampla distribuição é fortemente influenciada pela presença do homem e pelo nível de pobreza da população. O desmatamento crescente, principalmente para uso agrícola, diminui os habitats rurais do mosquito, levando-o para centros urbanos, mostrando desse modo, um padrão de migração similar ao da população humana (Mendonça *et al.*, 2005).

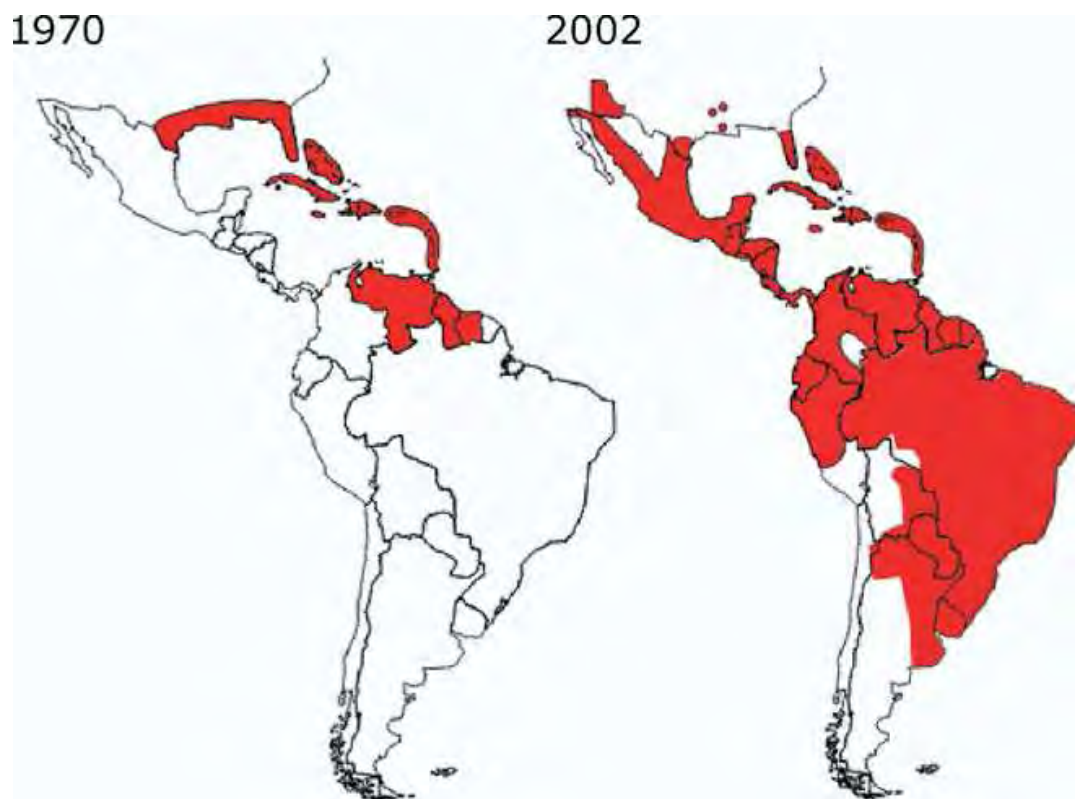


Figura 2. Distribuição de *Aedes aegypti* nas Américas. Em 1970, no final do programa de erradicação do mosquito, e em 2002, com reinfestação das Américas. Fonte: PAHO/WHO, 2002.

1.1.4. A Importância do controle dos mosquitos

Os mosquitos são responsáveis por sérios problemas para a saúde pública, por serem vetores de inúmeras doenças, incluindo malária, febre amarela, dengue, encefalite japonesa, vírus do Nilo Ocidental, Chikungunya e filariose (Tolle, 2009).

Os mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* são os principais vetores do dengue e febre amarela (Schoepp *et al.*, 1990). No Brasil, apesar do *Ae. albopictus* estar presente ainda não foi detectado como transmissor, assim o

Ae. aegypti é o único vetor conhecido para dengue e febre amarela urbana (Consoli e DeOliveira, 1997).

A dengue é uma doença endêmica no sudoeste da Ásia, ilhas do Pacífico, África e Américas (Figura 3). Devido à existência de pelo menos quatro sorotipos de vírus diferentes (DEN 1, DEN 2, DEN 3 e DEN 4) que causam o dengue, torna-se difícil a produção de uma vacina como forma de controle, diferentemente da febre amarela que pode ser controlada com vacinas (Carvalho *et al.*, 2003).

Nas primeiras dez semanas do ano de 2009, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS, 2009) registrou 114.355 casos notificados de dengue, sendo 235 casos confirmados de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e dezesseis óbitos por FHD, também foram notificados 368 casos de dengue com complicações o que resultou em sete óbitos. Comparando os casos notificados de dengue em 2009 com o mesmo período de 2008 verifica-se uma redução de 28,6% no número de casos. Em 2008 foram registrados 160.137 casos notificados de dengue, sendo 1.445 casos de FHD e 5.258 de casos de dengue com complicações.

A erradicação do mosquito urbano tem exigido um esforço substancial do Ministério da Saúde, que elevou para R\$ 1,08 bilhão a verba destinada aos estados e municípios para o combate à doença (SVS/MS, 2009).

O mosquito *Ae. aegypti* também atua como vetor de um arbovírus do gênero Flavivírus, responsável pela febre amarela na América Central e do Sul e no oeste da África (Maillard *et al.*, 1993). Essa doença pode ser classificada epidemiologicamente de duas formas: febre amarela silvestre e febre amarela urbana (Consoli e DeOliveira, 1997; Nasci e Miller, 1996). A forma silvestre é

veiculada na floresta por mosquitos silvestres, que picam animais susceptíveis ao vírus, especialmente macacos. Por sua vez, a forma urbana é veiculada dentro das cidades e é transmitida aos seres humanos pela picada do mosquito (Consoli e DeOliveira, 1997).

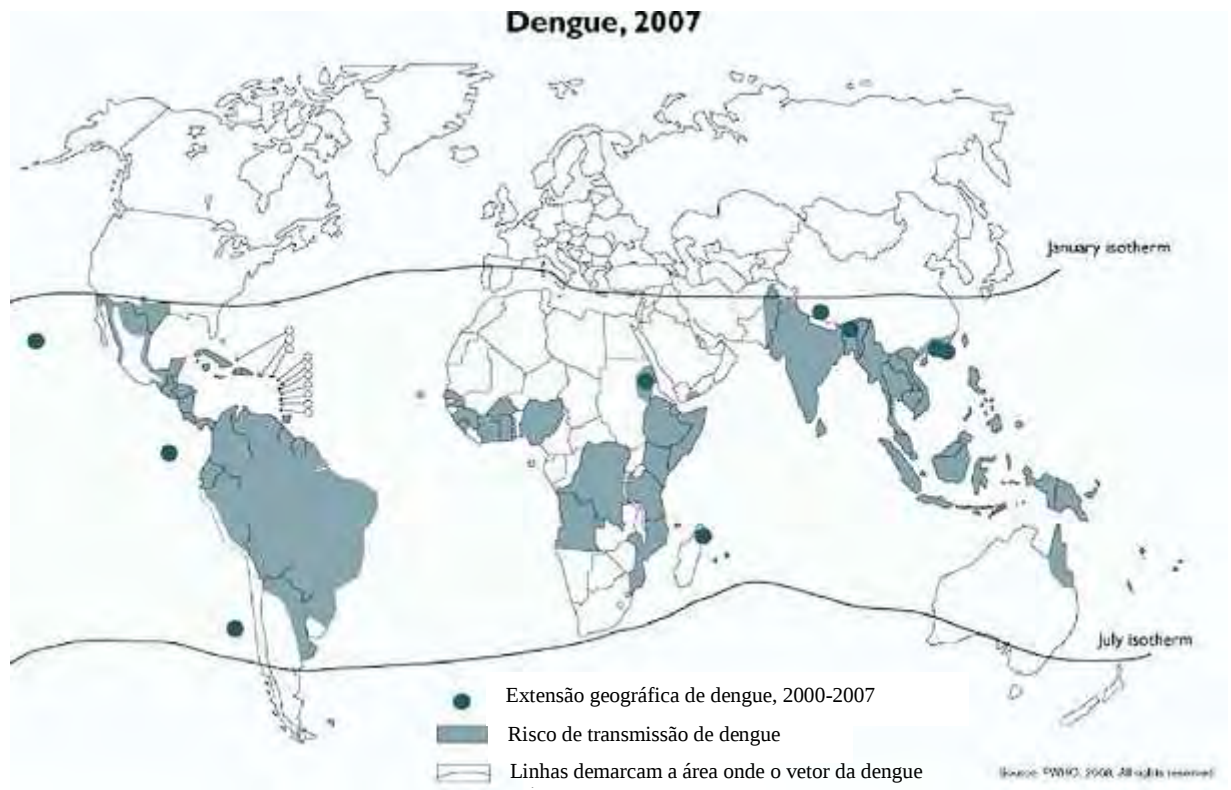


Figura 3. Áreas endêmicas de dengue no mundo. Fonte: WHO, 2008.

1.1.5. Controle do mosquito *Aedes aegypti*

No Brasil, a partir de 1967 os programas de saúde pública usaram exclusivamente inseticidas organofosforados para o controle de *Ae. aegypti* (Ministério da Saúde, 1968; Lima *et al.*, 2003). Em 1999, a resistência do mosquito a esse grupo de inseticidas começou a ser detectada em vários municípios, dentro de um programa coordenado pela FUNASA; nessa época foi

comprovada a resistência ao organofosforado *temephos* (age interrompendo a função do sistema nervoso da larva), único larvicida usado até o ano de 2000 no controle do *Aedes*, e essa resistência norteou a definição de novas estratégias de controle do vetor (FUNASA 1999; Lima *et al.*, 2003). Como alternativa, além do uso de piretróides no controle de adultos, algumas formulações do biolarvicida *Bti* (*Bacillus thuringiensis israelensis*) começaram a ser aplicadas em regiões onde se detectou resistência (MMCA, 2002).

O aumento no número de transmissões de agentes causadores de doenças pelo mosquito *Ae. aegypti* se deve ao aumento do número de sítios de procriação de larvas e à resistência aos atuais inseticidas comerciais. O método mais eficiente para diminuir a incidência de dengue e febre amarela urbana é a erradicação do vetor, o *Ae. aegypti*. Experiências recentes têm mostrado que inseticidas aéreos usados para erradicação desse inseto não são eficientes, já que o mosquito é altamente adaptado ao ambiente urbano e os insetos adultos muitas vezes não são atingidos pelo inseticida pela sua capacidade de se proteger atrás de móveis dentro de ambientes fechados. Uma estratégia bem sucedida para a redução da densidade de mosquitos, onde epidemias de dengue ou febre amarela ocorram, é atacando o local de criação das larvas de forma sistemática através de larvicidas (Ciccia *et al.*, 2000).

A pressão seletiva dos inseticidas convencionais vem aumentando as populações de mosquitos resistentes, crescendo a demanda por novos produtos que sejam seguros para o meio ambiente, degradáveis e específicos para a espécie que se deseja controlar (Carlini e Grossi-De-Sá, 2002).

Existem dois larvicidas efetivos no mercado, o Metoprene, que é um análogo do hormônio juvenil, que interfere no desenvolvimento larval; e o *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) (Henrick *et al.*, 1973), que produz toxinas que se ligam a receptores presentes nas células epiteliais do intestino médio da larva, formando poros não específicos que levam ao inchaço por osmose das células epiteliais do intestino e a morte larval (Henrick *et al.*, 1973). Esses receptores intestinais são específicos do mosquito e, portanto, não são encontrados em mamíferos (MMCA, 2002). O *Bti* tem sido aplicado em larga escala, no momento; contudo, as formulações de *Bti* e de Metoprene, disponíveis para uso no controle de *Aedes*, além de terem custo elevado, apresentam baixa estabilidade em nossas condições climáticas (Lima *et al.*, 2003). Sendo assim, estudos que objetivem o desenvolvimento de alternativas eficientes de controle são importantes.

1.1.6. Características gerais do sistema digestivo de insetos

O intestino dos insetos é um canal que se estende desde a boca até o ânus (Romoser, 1996). Ele está preso em cada extremidade à parede do corpo do inseto, estando seguro pela pressão exercida pelos órgãos adjacentes e traquéias flexíveis (Daly *et al.*, 1998). Existem três divisões principais nesse tubo: o intestino anterior e posterior, de origem ectodérmica, e o intestino médio, de origem endodérmica. Tanto o intestino anterior quanto o intestino posterior são revestidos por uma fina cutícula, chamada íntima, a qual apresenta continuidade com a cutícula do integumento (Terra, 1990; Daly *et al.*, 1998). Essas regiões são consideradas órgãos do integumento, e as células são homólogas às da epiderme. O intestino médio, ao contrário, não possui

esse revestimento devido à sua origem endodérmica, e por isso, a maioria dos insetos sintetiza uma estrutura quitinosa extracelular (matriz peritrófica), para, em adição a outras funções, proteger as células do intestino médio (Lehane e Billingsley, 1996; Daly *et al.*, 1998). A parede do canal alimentar é composta por uma única camada de células, separadas da hemolinfa por uma membrana basal (Daly *et al.*, 1998).

As regiões do intestino são especializadas em funções particulares. O intestino anterior está envolvido primariamente com a ingestão, condução e armazenagem do alimento. O intestino médio está envolvido com a digestão e absorção do alimento e o intestino posterior com a excreção de materiais vindos do intestino médio e dos túbulos de Malpighi que são órgãos de excreção localizados na junção entre o intestino médio e o posterior (Romoser, 1996).

O intestino médio pode ser formado por um tubo simples (Daly *et al.*, 1998); essa região reta é composta por células especializadas na secreção de enzimas digestivas e na absorção de água e nutrientes provenientes da digestão (Lehane e Billingsley, 1996). O lado das células voltadas para o lúmen possui projeções formando as microvilosidades (Lehane e Billingsley, 1996; Daly *et al.*, 1998), as quais proporcionam um aumento na superfície de absorção de cada célula. O lado das células voltado para a hemocele contém a membrana plasmática formada por um conjunto complexo de invaginações, chamado de labirinto basal o qual proporciona também um grande aumento na superfície, através da qual substâncias podem ser trocadas (Lehane e Billingsley, 1996).

1.1.7. O sistema digestivo da larva e do adulto do mosquito

As larvas de mosquitos são aquáticas e alimentam-se constantemente. Durante a ingestão do alimento as peças bucais movem-se juntas, produzindo de 180 a 240 batimentos por minuto. O movimento das escovas orais faz com que a água flua em direção à cabeça, trazendo as partículas de alimento. As partículas podem ser ingeridas diretamente, dependendo do tamanho, as partículas grandes são trituradas com o auxílio das mandíbulas. Embora a filtração seja a forma mais comum de alimentação em uma larva, elas também têm hábitos raspadores (Consoli e DeOliveira, 1997).

O tubo digestivo da larva inicia-se em uma faringe que possui uma musculatura complexa adaptada à deglutição. Em seguida vem o esôfago, fino e muscular, que se liga ao intestino médio. Juntos, a faringe e o esôfago constituem o intestino anterior. Logo à frente, está o esfíncter cardíaco que serve para impulsionar o alimento para frente e evitar o regurgitamento, seguido pelo intestino médio e oito cecos gástricos. As células que revestem o intestino médio são altas e possuem as bordas estriadas, estando adaptadas à secreção e absorção. Após o intestino médio, encontram-se cinco túbulos de Malpighi, e o intestino posterior composto de: câmara pilórica, um íleo (ou intestino delgado), o reto (ou cólon) e um ducto anal (Fig. 4A) (Consoli e DeOliveira, 1997).

Nos mosquitos adultos, o intestino médio é longitudinalmente dividido em uma região anterior em forma de tubo e uma região posterior em forma de saco, a qual é extremamente elástico e revestido por um epitélio formado por células colunar de borda estriada, adaptado à secreção e absorção (Consoli e DeOliveira, 1997). Nesta região do intestino é que ocorrem processos como o

armazenamento e a digestão do sangue (Fig. 4B) (Consoli e DeOliveira, 1997; Billingsley, 1990).

Somente as fêmeas dos mosquitos são hematófagas, uma vez que os nutrientes provenientes do sangue são fundamentais para o desenvolvimento dos ovos. Após pousarem sobre o hospedeiro, as fêmeas selecionam o local da picada, e então o conjunto de estiletes bucais é introduzido na pele do hospedeiro. O sangue é sugado pela ação coordenada das bombas cibarial e faringea, direcionando-o para o intestino médio (Consoli e DeOliveira, 1997). O sangue dos vertebrados é composto principalmente por proteínas, e por isso, as proteases são as principais enzimas digestivas do mosquito (Graf e Briegel, 1989; Muller e Lehane, 1993). A digestão das proteínas da dieta de mosquitos é realizada pela ação de tripsinas (Barillas-Mury e Wells, 1993), quimotripsinas (Jiang *et al.*, 1997), aminopeptidases (Morlais *et al.*, 2003) e carboxipeptidases (Isoe *et al.*, 2009). O máximo da atividade destas peptidases é alcançado entre 24 e 30h após o repasto sanguíneo (Briegel e Lea, 1975; Graf e Briegel, 1989; Noriega e Wells, 1999).

Os mosquitos também ingerem gotículas de carboidratos, e para isso, mergulham a ponta da labela no líquido, sugando-o sem retrair o lábio. Estes açúcares são armazenados no divertículo central, de onde passam lentamente para o estômago, sendo gradualmente digeridos, o que permite à fêmea manter o estômago vazio, pronto para receber o repasto sanguíneo (Consoli e DeOliveira, 1997).

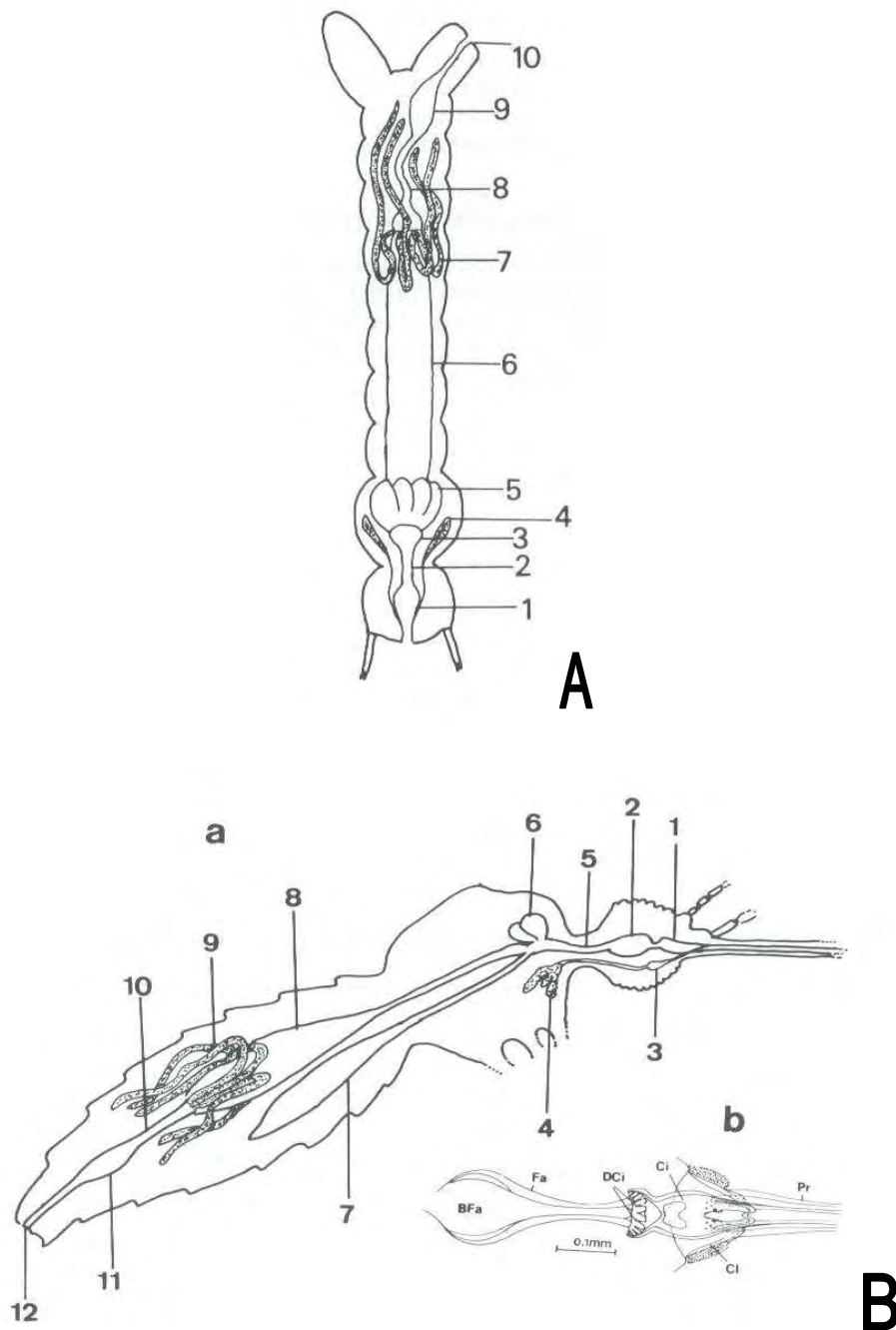


Figura 4. Sistema digestivo do mosquito *Aedes aegypti*. A) Larva: 1. faringe; 2. esôfago; 3. pro-ventrículo; 4. glândula salivar; 5. cecos gástricos; 6. estômago ou intestino médio; 7. tubos de Malpighi; 8. íleo/cólon; 9. reto; 10. ânus. **B) Adulto:** a) 1. bomba cibarial (Ci); 2. bomba faringeana (Bfa); 3. bomba salivar; 4. glândula salivar; 5. esôfago; 6. divertículos dorsais; 7. divertículo ventral; 8. estômago ou intestino médio; 9. tubos de Malpighi; 10. íleo/cólon; 11. reto; 12. ânus. b) Cibário e faringe - vista dorsal. Cl: Clípeo; Dci: dentes do cibário; Fa: faringe; Pr: probóscide. Fonte: Consoli e DeOliveira (1997).

1.2. Proteases

Proteases são essenciais para a sobrevivência de todos os organismos (Barret *et al.*, 2001). As proteases participam de diversos processos fisiológicos, como a digestão de alimentos, defesa imunológica, apoptose, processamento de pró-enzimas, ativação do complemento, coagulação sanguínea e fibrinólise (Twining, 1994; Fairlie *et al.*, 2000). Proteases também são liberadas por células inflamatórias quando ativadas por patógenos ou corpos estranhos, bem como por células normais e cancerosas, quando estas últimas se movem através dos tecidos (Scott, 1992).

As proteases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas em proteínas e peptídeos (Barret *et al.*, 2001). As enzimas proteolíticas são classificadas em famílias de acordo com os mecanismos catalíticos, similaridades estruturais e análises filogenéticas. As cinco famílias de proteases melhor estudadas são: serinoproteases, cisteinoproteases, aspartilproteases, metaloproteases e treoninoproteases (Neurath, 1999; Rawlings *et al.*, 2003).

A família serinoprotease é assim denominada por possuir em seu sítio ativo um resíduo de Ser¹⁹⁵ que juntamente com os resíduos de His⁵⁷ a Asp¹⁰² compõem a tríade catalítica da enzima (Perona e Craik, 1995). Alguns membros desta família são: tripsinas, elastases, quimotripsinas, calicreína plasmática e plasmina. O reconhecimento do substrato pela protease é realizado através da ligação ao resíduo P1 no substrato (nomenclatura segundo Schechter e Berger, 1967) pela posição S1 presente na cavidade catalítica da enzima. A posição S1 da tripsina é específica para cadeias laterais de aminoácidos básicos Lys e Arg devido à presença do resíduo Asp189 no

interior do bolsão catalítico (Otlewski *et al.*, 2001). Além das interações entre P1 e S1, as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos das posições P2, P1', P2' dos substratos e inibidores são importantes na interação com a enzima (Bode e Huber, 1992), mostrado na figura 5.

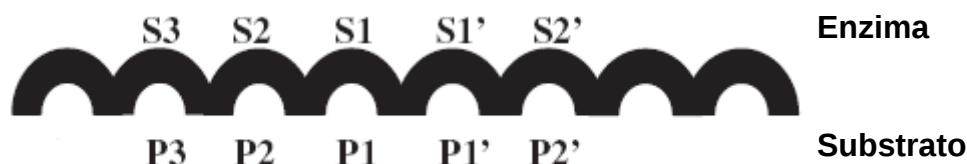


Figura 5. Representação esquemática da interação entre uma enzima e um substrato.

As proteases são amplamente distribuídas em diversos organismos como bactérias, fungos, plantas e animais. Insetos de diferentes espécies utilizam diferentes proteases na digestão dos alimentos (Terra e Ferreira, 1994), como por exemplo, insetos da ordem Coleoptera utilizam cisteinoproteases (Matsumoto *et al.*, 1997) e os da ordem Diptera utilizam serinoproteases. Estudos recentes mostraram que inibidores de cisteinoproteases reduziram apenas 10% da atividade proteolítica presente no estômago de *Mayetiola destructor* (Diptera: Cecidomyiidae) enquanto inibidores de serinoproteases reduziram cerca de 90% da atividade proteolítica. Corroborando estes dados, a análise do transcriptoma de *M. destructor* mostrou apenas dois transcritos correspondentes a cisteinoproteases e vinte e sete transcritos correspondentes as serinoproteases do tipo tripsina e quimotripsina (Zhu *et al.*, 2005).

1.3. Inibidores de serinoproteases

Os inibidores de proteases endógenas ligam-se às enzimas e bloqueiam a sua ação formando complexos estequiométricos estáveis sendo assim importantes reguladores da atividade proteolítica (Laskowski e Qasim, 2000). Em animais invertebrados, os inibidores estão envolvidos em processos fisiológicos fundamentais como no controle da cascata da coagulação (Iwanaga, 1993), resposta imune inata (Imler e Hoffmann, 2000), embriogênese, bem como no controle de processos restritos a artrópodes como, ecdise, metamorfose e cascata da pro-fenoloxidase (Kanost, 1999; Simonet *et al.*, 2003).

A classificação dos inibidores de proteases é feita inicialmente segundo sua origem, que pode ser: tecidos animais, vegetais e microrganismos. Em seguida são classificados de acordo com sua especificidade frente as diferentes proteases, e então podem ser agrupados em famílias segundo a similaridade na estrutura primária, mecanismo de ação, resíduos de cisteínas conservados e estrutura tridimensional (Roberts *et al.*, 1995). Os inibidores de serinoproteases de origem animal são os que apresentam o maior número de membros descritos, sendo os membros das famílias Tipo Serpina, Tipo Kazal e Tipo Kunitz, os mais bem estudados (Roberts *et al.*, 1995).

1.4. Tripsinas de *Aedes aegypti*

Tripsina é uma serinoprotease da família da quimotripsina, caracterizada pela presença de uma tríade catalítica formada por histidina, aspartato e serina, que cliva ligações peptídicas do lado carboxi de L-aminoácidos básicos com uma preferência para arginina de 2 a 10 vezes maior do que para lisina (Craik

et al., 1985). Entre as serinoproteases, tripsina e quimotripsina são as mais encontradas como proteases digestivas no intestino médio de inúmeras espécies de insetos (Terra e Ferreira, 1994).

As enzimas digestivas de *Ae. aegypti* são produzidas pelas células epiteliais do intestino médio (Consoli e DeOliveira, 1997). Em *Ae. aegypti* várias enzimas digestivas têm sido identificadas, incluindo tripsinas (Barillas-Mury e Wells, 1993), quimotripsinas (Jiang *et al.*, 1997) aminopeptidases (Morlais *et al.*, 2003) e carboxipeptidases (Isoe *et al.*, 2009), sendo as enzimas mais abundantes as tripsinas e quimotripsinas (Terra e Ferreira, 1994).

O genoma do *Ae. aegypti* tem aproximadamente 1376 milhões de pares de bases, que é aproximadamente 5 vezes maior do que o genoma do vetor da malária, *Anopheles gambiae*. Ele apresenta um grande número de genes codificando enzimas do tipo tripsina (Nene *et al.*, 2008). Venancio (2009) e colaboradores identificaram 66 tripsinas hipotéticas em larvas e adultos de *Ae. aegypti*, e mostraram através de análise filogenética que a expressão de tripsina em larva e adulto era divergente, possivelmente como uma consequência da adaptação a uma alimentação com sangue.

A expressão de tripsinas persiste durante todos os estádios de desenvolvimento do mosquito *Ae. aegypti* (Yang e Davies, 1971). Em fêmea de mosquito a expressão de tripsina é bifásica, composta por tripsina precoce e tardia. A síntese de tripsina precoce é regulada ao nível traducional por alimentação com sangue, apresentando um pico entre 1 e 6 h após o repasto sanguíneo. A expressão de tripsina tardia é regulada ao nível transcricional, apresentando um pico entre 18 e 24 h após alimentação com sangue. Entretanto, o mecanismo para a regulação transcricional do gene da tripsina

tardia não é completamente conhecido (Noriega e Wells, 1999). Acreditava-se que a atividade da tripsina precoce era responsável pela expressão de tripsina tardia (Barillas-Mury *et al.*, 1995). No entanto, recentemente, foi mostrado que a expressão da tripsina tardia não foi afetada pelo bloqueio da atividade de tripsina precoce com diferentes inibidores de proteases ou pela redução da expressão de tripsina precoce pelo método de RNAi (Lu *et al.*, 2006).

As tripsinas de *Ae. aegypti* também são importantes para o processo de invasão do *Plasmodium gallinaceum*, as tripsinas presentes no intestino médio de adultos são responsáveis pela ativação da proquitinase do plasmódio em quitinase, tornando este capaz de destruir a membrana peritrófica do mosquito e facilitando a invasão das células epiteliais (Shahabuddin *et al.*, 1993; 1996).

Estudos moleculares dos estádios de vida do mosquito *Ae. aegypti*, como a identificação de genes preferencialmente expressos em larvas podem ajudar na identificação de candidatos alvos para o desenvolvimento de novos procedimentos de controle de insetos (Venâncio *et al.*, 2009)

2. Objetivos

O objetivo geral deste projeto foi estudar as tripsinas digestivas de larvas do mosquito *Ae. aegypti*. Para alcançar esse objetivo tivemos como objetivos específicos:

1. Identificação das tripsinas majoritárias presentes em larvas de 4º instar de *Ae. aegypti* através da construção de uma pequena biblioteca de fragmentos de DNAs de tripsinas em vetor de clonagem pGEM-T.
2. Análise da presença das tripsinas majoritárias nas diferentes fases do mosquito por zimografia e dosagem da atividade enzimática.
3. Purificação da tripsina majoritária presente no intestino médio de larvas de 4º instar de *Ae. aegypti*.
4. Caracterização da tripsina purificada

3. Materiais e métodos

3.1. Análise dos transcritos dos genes de tripsinas presentes no mosquito

Aedes aegypti

3.1.1. Extração do RNA total do intestino médio dos diferentes estádios do *Aedes aegypti*

Para a extração do RNA, homogeneizaram-se os intestinos em 500 µL do reagente TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA): vinte larvas inteiras de 1º e de 2º instar (devido às dificuldades em dissecar); vinte intestinos médios de larvas de 3º e 4º instar; vinte pupas inteiras e vinte intestinos médios de fêmeas após 3 h e 24 h de alimentação. Às amostras foram adicionados mais 500 µL do reagente TRIZOL e incubou-se por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, 200 µL de clorofórmio foram adicionados por mL de reagente TRIZOL, agitou-se o tubo vigorosamente por 15 s e incubou-se por 3 min à temperatura ambiente; a amostra foi centrifugada a 12000 g por 15 min a 4°C. Transferiu-se a fase aquosa (separada na parte superior da mistura) para um tubo estéril (1,5 mL) e adicionaram-se 500 µL de isopropanol por mL de reagente TRIZOL; incubou-se por 10 min à temperatura ambiente, centrifugou-se a 12000 g por 10 min a 4°C. Removeu-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento de RNA total com 750 µL de etanol 75%, agitou-se o tubo e centrifugou-se a 10000 g por 5 min a 4°C. O RNA total foi seco por 30 min à temperatura ambiente, ressuspendido em 10 µL de água tratada com DEPC (inibidor de Rnase). Os RNAs totais foram utilizados na síntese da primeira fita de cDNA.

3.1.2. Construção da primeira fita de cDNA

Utilizou-se 1 µg de RNA total ao qual adicionou-se 1 µL de oligo (dT)₁₈ (0,5 µg/mL) e completou-se o volume para 5 µL com água estéril tratada com DEPC; aqueceu-se a mistura por 5 min a 70°C e imediatamente resfriou-se em gelo. Em seguida, adicionaram-se 4 µL de tampão *Improm-IITM 5x Reaction Buffer* (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 2,4 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de dNTP mix (10 mM de cada dNTP: dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 1 µL da enzima *Improm-IITM Reverse Transcriptase* e completou-se o volume para 15 µL com água estéril tratada com DEPC. O programa utilizado foi: 25°C por 5 min, 42°C por 1 h e 72°C por 15 min. A reação foi realizada em um termociclador MJ Research, modelo PTC-200 (Peltier Thermal Cycler).

3.1.3. Construção dos oligonucleotídeos degenerados

Para a construção da biblioteca, oligonucleotídeos degenerados foram projetados com base no alinhamento das sequências de nucleotídeos e aminoácidos (Clustal W) das 36 tripsinas identificadas no genoma do *Ae. aegypti*, foi utilizada uma região altamente conservada contendo o sítio ativo das tripsinas. Os oligonucleotídeos obtidos foram: Aetryfw 5'-TGACNGCTGCNCACTG-3' e Aetryrev 5'-CCGGAATCACCTGGC-3'.

3.1.4. Amplificação dos fragmentos de DNA dos genes de tripsina presentes no intestino médio de larvas de 4º instar por PCR

Na reação de amplificação utilizaram-se 2 µL da primeira fita de cDNA de intestino médio de larvas de *Ae. aegypti*, 1 µL oligonucleotídeos Aetryfw e Aetryrev, 0,5 µL da enzima Taq DNA polimerase (2,5 U) (Fermentas, Vilnius,

Lithuania), 0,5 µL de dNTPs (10 mM) (Fermentas), 1 µL de MgCl₂ (25mM), 5 µL de tampão de reação [Tris-HCl 100 mM pH 8,8, contendo KCl 500 mM e Nonidet P40 0,8% (v/v)] (Fermentas), completando-se o volume para 50 µL com água estéril. A reação de PCR foi realizada utilizando o seguinte programa: 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94°C for 40 s, 50°C por 40 s, e 72°C por 50 s, com uma extensão final de 72°C por 5 min. A reação foi realizada em um termociclador MJ Research, modelo PTC-200.

3.1.5. Eletroforese em gel de agarose

Os fragmentos de DNA resultantes da PCR foram analisados em gel de agarose 1% em tampão TAE (Tris-acetato 0,04 M pH 8,0, contendo EDTA 1 mM), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL). Aplicaram-se 50 µL do produto de PCR e 5 µL do marcador de DNA.

3.1.6. Extração de fragmento de DNA do gel de agarose

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram separados em gel de agarose e purificados com o *QIAEX II gel extration kit* (Qiagen, Hilden, Germany), as duas bandas de DNA amplificadas foram cortadas do gel de agarose com bisturi e transferidas (as duas juntas) para um tubo estéril (1,5 mL). Adicionou-se ao tubo o reagente QX1 (300 µL/100 mg de gel) e o mesmo foi agitado; em seguida, 15 µL do reagente QX2 (resina) foram adicionados e a mistura foi incubada por 10 min a 50°C, sob agitação (900 rpm). Em seguida, a mistura foi centrifugada a 10000 g por 30 s e o sobrenadante descartado. À resina foram adicionados 500 µL de QX1, agitada, e novamente centrifugada a 10000 g por 30 s; o sobrenadante foi descartado. A última etapa de lavagem da

resina foi realizada com a adição de 500 µL do tampão PE, agitação e centrifugação a 10000 g por 30 s. Esse passo foi repetido, e o sobrenadante descartado. A resina foi seca por 20 min à temperatura ambiente e, em seguida, o DNA foi eluído com 15 µL de água estéril, centrifugado a 10000 g por 30 s e transferido para um tubo estéril, tomando-se o cuidado de evitar a transferência de qualquer resíduo de resina.

3.1.7. Ligação dos fragmentos ao vetor de clonagem pGEM-T

Fragmentos de DNA purificados (3 µL) foram ligados no vetor de clonagem pGEM-T easy (1 µL) (Promega, Madison, WI, USA), usando 1U de T₄ DNA ligase (1 µL) e 5 µL de tampão para a enzima T₄ DNA ligase 2x concentrado (Tris-HCl 60 mM pH 7,8, MgCl₂ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM e polietilenoglicol 10%), durante 18 h a 16°C.

3.1.8. Precipitação de DNA

Aos 10 µL de ligação, foram adicionados 2 µL do tampão acetato de sódio 3 M pH 4,3, misturou-se e adicionaram-se 50 µL de etanol 95%; misturou-se novamente e centrifugou-se a 15700 g por 20 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, adicionaram-se 200 µL de etanol 70% ao “pellet” de DNA e centrifugou-se a 15700 g por 5 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” seco por 20 min à temperatura ambiente. O DNA foi suspenso em 6 µL de água estéril.

3.1.9. Transformação da bactéria *E. coli* (DH5 α) por eletroporação

Adicionaram-se 5 μ L do produto da ligação de fragmentos de DNA de tripsinas ao vetor pGEM-T easy a 50 μ L de células competentes *E. coli* DH5 α preparadas para eletroporação e mantidas no gelo. Essa mistura foi cuidadosamente transferida para uma cubeta de eletroporação previamente resfriada e mantida no gelo. O eletroporador (Bio Rad – gene Pulser) foi ajustado para os seguintes parâmetros: 2,5 Kv, 200 Ω , 25 μ F. A cubeta foi seca e colocada no eletroporador; após eletroporação, adicionou-se 1 mL de meio SOC às células que foram transferidas para tubos de 1,5 mL e incubadas sob agitação (900 rpm) por 40 min a 37°C. Em seguida, 100 μ L dessa solução foram aplicados em meio LB-ágar contendo ampicilina (200 μ g/mL) e a placa foi incubada durante a noite a 37°C.

3.1.10. Sequenciamento de DNA

Os clones positivos foram analisados por PCR, usando-se os oligonucleotídeos M13 *forward* e *reverse*. O sequenciamento automático dos fragmentos de DNA clonados em vetor pGEM-T easy (Promega, Madison, USA) foi realizado utilizando-se 200 ng de DNA, 2 μ L do *DyenamicTM ET Terminator Cycle Sequencing Kit* (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK), oligonucleotídeos M13 *forward* ou *reverse* (5 pmol) para um volume final de 10 μ L. A reação foi realizada em solução tampão Tris-HCl 80 mM pH 9,0, contendo 2 mM de MgCl₂, utilizando-se o seguinte programa: 30 ciclos de (95°C por 20 min, 50°C por 15 s, 60°C por 60 s). Os produtos das reações foram precipitados e suspensos em 3 μ L da solução *formamide loading dye* (Amersham Biosciences, Upsalla, Sweden) e aplicados em um sequenciador

automático de DNA *Applied Biosystems* modelo 377 (*Applied Biosystems*, CA, USA). As sequências de nucleotídeos de todos os clones positivos foram analisadas pelo programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Entre os 80 fragmentos sequenciados, somente quatro sequências de tripsina foram identificadas, com os números de acesso ao Banco de Dados: AAEL005607, AAEL006371, AAEL008097 e AAEL005609.

3.1.11. Análise por PCR semi-quantitativo da expressão de tripsinas de *Aedes aegypti* em diferentes estádios de vida

O RNA total, extraído de larvas de 1º, 2º, 3º, 4º instar, pupa e adulto fêmea após 3 h e 24 h de alimentação sanguínea, foi usado em um RT-PCR padrão para gerar a 1ª fita de cDNA com o kit para Transcrição Reversa *Improm-IITM* (Promega, Madison, WI, USA). Oligonucleotídeos específicos foram construídos baseados nas sequências de nucleotídeos das tripsinas majoritárias, número de acesso AAEL005607 e AAEL006371, respectivamente. As sequências dos oligonucleotídeos para a tripsina AAEL005607 foram AAEL5607fw 5'CCCGCTCGAGAAAAGAGGTCCCGAAGAGGACCTCTGG3' e AAEL5607rev

5'TTTTCCTTTTGCGGCCGCTTACACCCCGGTGTTGGAGCT3', e para a tripsina AAEL006371 foram AAEL006371fwd 5'CCCGCTCGAGAAAAGACAGCCTTTCAACGGAACGGT3' e AAEL6371rev 5'TTTTCCTTTTGCGGCCGCTCAAACAAGGTGGTTCCTAAA3'. Os oligonucleotídeos para a proteína ribossomal de *Ae. aegypti* (RP49), 5aeexpRP 5'GCTATGACAAGCTTGCCCCCA3' e 3aequaRP1b 5'TCATCAGCACCT

CCAGCTC3' foram usados como controle das preparações de cDNAs. Usando esses oligonucleotídeos e o cDNA de diferentes estádios de vida do mosquito, uma PCR foi realizada utilizando-se o seguinte programa: 94°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 40 s, 55°C por 40 s, e 72°C por 50 s, com uma extensão final de 72°C por 5 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

3.2. Purificação e caracterização das tripsinas presentes no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*

3.2.1. Preparação do extrato do intestino médio de larvas de *Aedes aegypti*

Os intestinos médios de 1000 larvas de 4º instar de *Ae. aegypti* foram dissecados em tampão PBS, macerados em microtubos 1,5 mL com auxílio de um pistilo e foram utilizados no preparo de um extrato bruto (uma larva/ 5 µL) em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5. O extrato foi centrifugado a 12000 g, 5 min a 4°C. O sobrenadante foi separado em alíquotas (1 mL) e armazenado a -20°C.

3.2.2. Preparo da resina BPTI-Sepharose

A resina para cromatografia de afinidade foi preparada pelo método descrito por Cuatrecasas (1970), como se segue: 2 g de Sepharose 4B ativada por CNBr foram suspensas em solução de HCl 1 mM, filtrada rapidamente em funil de placa porosa e lavada com a mesma solução (200 mL). Em seguida, preparou-se uma solução de BPTI (20 mg / 1,5 mL de

tampão NaHCO_3 0,1 M, pH 8,3), que foi adicionado à resina. A mistura foi agitada lentamente por 2 h à temperatura ambiente e deixada 18 h a 4°C. Em seguida, a resina foi filtrada em funil de placa porosa e suspensa em solução de etanolamina 1 M, pH 8,0, agitando-se lentamente por 2 h à temperatura ambiente. Ao final da incubação, a resina foi filtrada e exaustivamente lavada com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,0. A resina foi utilizada na montagem de uma coluna de aproximadamente 5 mL, equilibrada e mantida em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 a 4°C.

3.2.3. Cromatografia de afinidade em coluna BPTI-Sepharose

À coluna BPTI-Sepharose, equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, foi aplicado o sobrenadante contendo as proteínas extraídas do intestino médio de larvas de 4º instar de *Ae. aegypti*. A coluna foi lavada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo 0,15 M de NaCl, até leitura de A_{280} igual ou menor que 0,02, para a retirada de proteínas fracamente ligadas. A eluição do material foi realizada com solução KCl-HCl 0,5 M, pH 2,0; frações de 1 mL foram coletadas em tubos *ependorf* contendo 15 µL de tampão acetato de sódio 1 M, pH 5,0, para aumentar o pH da solução. As frações eluídas foram utilizadas em ensaios enzimáticos com o substrato tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA e as frações contendo atividade proteolítica foram reunidas e dialisadas contra o tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5 e estocadas a -20°C.

3.2.4. Cromatografia de troca iônica em coluna Resource S

À coluna Resource S, conectada a um sistema cromatográfico de alta pressão ÄKTA *purifier*, previamente equilibrada com tampão acetato de sódio

0,05 M pH 5,5, aplicou-se o material contendo atividade proteolítica proveniente da cromatografia de afinidade em coluna BPTI-Sepharose. Após o procedimento de lavagem da coluna, as proteínas foram eluídas com um gradiente linear de NaCl (0 – 1 M) em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5, em fluxo de 1 mL/min por 60 min. As proteínas foram analisadas por absorbância em 280 nm e a atividade proteolítica detectada com o substrato cromogênico Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA. As frações contendo atividade proteolítica foram reunidas e concentradas em Amicon Ultra-15 (Millipore).

3.2.5. Cromatografia de fase reversa em coluna *Sephasil peptide C₈*

Para essa etapa da purificação, utilizou-se uma coluna de fase reversa *Sephasil peptide C₈* conectada em sistema ÄKTA *purifier*. À coluna equilibrada com solução TFA 0,1% (ácido trifluoracético) em água milliQ, foi aplicado o material ativo proveniente da cromatografia de troca iônica em coluna Resource S. As proteínas foram eluídas com um gradiente linear de acetonitrila (0-90%) em solução TFA 0,1%, em fluxo de 1 mL/min durante 60 min. As frações contendo atividade proteolítica foram liofilizadas e analisadas em sequenciador automático de aminoácidos.

3.2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

Foi utilizado o método descrito por Laemmli (1970). O gel de separação de poliacrilamida (12%) foi preparado misturando-se em um tubo: 2,07 de solução aquosa acrilamida 30% e bis-acrilamida 0,8%; 1,87 mL de tampão Tris-HCl 1,0 M pH 8,8; 1,07 mL de água; 0,05 mL de solução de SDS 10%. Antes de colocar o gel entre as placas de vidro a mistura acima foi acrescida de: 3,3

μL de TEMED e 13,4 μL de persulfato de amônio 20% para a polimerização do gel. Em seguida, o gel foi aplicado entre as placas de vidro e coberto de água. Para realizar o alinhamento prévio das amostras foi utilizado o gel de concentração de 5%, misturando-se: 0,56 mL de solução aquosa contendo acrilamida 30% e bis-acrilamida 0,8%; 0,42 mL de tampão Tris-HCl 1 M pH 6,8; 2,28 mL de água; 33 μL de solução de SDS 10%. Em seguida, foram adicionados 2,5 μL de TEMED e 16,7 μL de persulfato de amônio 20% e o gel de concentração foi aplicado sobre o gel de separação e um pente formador de poços acomodado no gel superior. As amostras foram misturadas ao tampão de amostra Bio-Rad (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol 25%, SDS 2% e azul de bromofenol 0,01%,) na proporção 1:1, em condições não desnaturantes. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-HCl 0,025 M pH 8,0, contendo glicina 0,187 M e SDS 0,1%, em voltagem fixa de 100 Volts. O gel foi corado por prata segundo o método 3.2.7.

3.2.7. Coloração de gel de poliacrilamida por prata

Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de prata como descrito por Blum e colaboradores (1987). O gel foi previamente fixado em uma solução contendo metanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído 0,019%, por 30 s em forno de microondas. Lavou-se o gel com etanol 30% por 30 s no forno de microondas e deixou-se agitando por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi tratado com tiosulfato de sódio 0,02% por 30 s em forno de microondas e deixado agitando por 2 min. O gel foi lavado duas vezes com água destilada por 30 seg em forno de microondas e deixou-se agitando por 2 min à temperatura ambiente. A coloração foi realizada com solução de prata

composta por AgNO_3 0,2% e formaldeído 0,028% por 30 s no forno de microondas; deixou-se agitando por 5 min à temperatura ambiente. O gel foi lavado com água destilada à temperatura ambiente por 1 min. O gel foi revelado com uma solução contendo Na_2CO_3 0,006%, formaldeído 0,028% e tiosulfato de sódio 0,004%, à temperatura ambiente. Parou-se a reação de revelação com uma solução contendo metanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído 0,019%.

3.2.8. Sequenciamento de aminoácidos da tripsina purificada

A tripsina purificada de larvas de *Ae. aegypti*, após a cromatografia de fase reversa, foi submetida ao sequenciamento automático de aminoácidos que utiliza o método de Degradação de Edman (Edman, 1949). As amostras obtidas foram aplicadas em um sequenciador automático de aminoácidos modelo PPSQ-23 (Shimadzu, Tokyo, Japan). O sequenciamento foi realizado pela Dra. Izaura Yoshico Hirata, do Departamento de Biofísica da UNIFESP.

3.2.9. Determinação da constante de *Michaelis Menten* (K_m)

A constante de *Michaelis Menten* (K_m) da tripsina purificada de *Ae. aegypti* com o substrato cromogênico Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA foi determinada. Os ensaios cinéticos foram realizados com a tripsina purificada, em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M e Triton X-100 0,1%, nas diferentes concentrações de substratos: 0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,8 mM e 1 mM, por 10 min a 37°C. Os dados experimentais foram utilizados para determinar as velocidades e o valor de K_m utilizando regressão linear no programa Grafit (versão 3.01).

3.2.10. Determinação da constante de dissociação aparente (K_i)

As constantes de dissociação aparente (K_i) de diferentes inibidores de serinoproteases (HITI, AaTI, BPTI) da formação de complexo com a tripsina *Ae. aegypti* purificada foram determinadas de acordo com Bieth (1980). A tripsina purificada foi pré-incubada por a 37°C 10 min, com quantidades crescentes de inibidor (HITI, 0,116 – 2,3 nM; AaTI, 7,7- 153,1 pM; BPTI, 0,01 – 44 µM, concentração máxima utilizada) em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M e Triton X-100 0,1%. As atividades residuais da enzima foram mensuradas após adição do substrato cromogênico, Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA pela absorbância da p-nitroanilina em 450 nm. Os valores de K_i aparente foram então calculados, utilizando-se a equação (Morrison, 1969): $V_i/V_0 = 1 - \{E_t + I_t + K_i - [(E_t + I_t + K_i)^2 - 4E_t I_t]^{1/2}\} / 2E_t$ onde V_i e V₀ são as velocidades na presença e ausência de inibidor respectivamente, E_t corresponde à concentração total da enzima e I_t corresponde à concentração total do inibidor.

3.2.11. Zimografia em gel de poliacrilamida

A zimografia foi realizada em um gel SDS-PAGE (12%) acrescido de 0,3% de gelatina de acordo com o método descrito por Hanspal *et al.* (1983). Após a eletroforese, o gel foi retirado e lavado rapidamente com água destilada e em seguida, enxaguado com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 contendo 2% de Triton X-100, por 30 min à temperatura ambiente; esse procedimento foi repetido por duas vezes. Após estes procedimentos, o gel foi incubado em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0, contendo 100 mM de NaCl, por 1 h a 37°C. Em seguida, o gel foi corado com solução de *Comassie Brilliant Blue R250* e descorado com água ou solução de ácido acético 7,5%. Para os experimentos

de inibição, o extrato de larvas de 4º instar foram pré-incubados com diferentes inibidores de proteases: EDTA (10 mM) PMSF (10 mM) e E64 (10 mM) e, em seguida, aplicados no gel de poliacrilamida.

4. Resultados

4.1. Pequena biblioteca de fragmentos de DNA de tripsinas de larvas de 4º instar de *Aedes aegypti*

Com o objetivo de identificar as enzimas do tipo tripsina, presentes no intestino médio de larvas de *Ae. aegypti*, nossa primeira estratégia foi o alinhamento das sequências de nucleotídeos e aminoácidos das 36 tripsinas presentes no Banco de Dados do genoma do *Ae. aegypti*. Esse alinhamento permitiu identificar as regiões conservadas entre essas moléculas. Com esse resultado, escolhemos regiões das sequências de nucleotídeos internas e conservadas entre todas as moléculas para construir os oligonucleotídeos que podem ser visualizados na Figura 6.

AAEL005614	252	TGTCCGCTGCTCACTG	TACCGTTGCTCCAGTTT	-----	CCGCTGG	///	TTGCAACGGAGATAGCGG	644
AAEL005607	250	TGTCCGCTGCTCACTG	TACCGTTGCTCCAGTTT	-----	CCGCTGG	///	TTGCAACGGAGATAGCGG	642
AAEL005609	250	TGTCCGCTGCTCACTG	TACCGTATCTCCAGTTA	-----	CCGCTGG	///	CTGCAACGGAGATAGCGG	642
AAEL005603	244	TGTCCGCTGCTCACTG	TACCGTTGCTCCAGTTA	-----	CTGTGAA	///	TTGCAATACTGACAGTGG	636
AAEL005611	261	TTTCGGCCGCTCACTG	TACTCATCCATTGCCAA	-----	ACGTTGC	///	TTGCAATGGTGATAGCGG	653
AAEL005616	281	TCACCGCAGCACATTG	TGTCTTCCCTCAACGCG	-----	AGCTTCG	///	GTGCAACGGAGACAGTGG	673
AAEL012852	250	TAACCGCTGCCCCTG	CGCCC---CTACTACCG	-----	CTAAGCCA	///	CTGCCAGGGTGACTCCGG	648
AAEL007818	247	TGACAGCAGCTCACTG	CACCA---CGAATACAG	-----	ATCCTGCG	///	TTGCCAGGGAGACTCCGG	648
AAEL013713	223	TGACCGCTGGTCACTG	TGCCA---GCCCTAGAG	-----	AC---CAT	///	TTGCCAGGGTGATTCCGG	621
AAEL010202	234	TGACCGCTGGTCACTG	TGCCA---GCCCTAGAG	-----	AC---CAT	///	TTGCCAGGGTGATTCCGG	632
AAEL013712	246	TGACTGCTGGCCACTG	TGCAG---CTTCTGGTC	-----	AA---ACA	///	TTGCCAGGGTGATTCCGG	644
AAEL010203	229	TGACTGCTGGACACTG	TGCAT---TCTCTGGGC	-----	AA---ACA	///	TTGCCAGGGTGATTCCGG	627
AAEL010195	229	TGACTGCTGGACATTG	TGCAT---CCTCTGGTC	-----	AA---ACA	///	TTGCCAGGGTGATTCCGG	609
AAEL010196	244	TGACTGCTGGCCACTG	TGCGG---CTTCTGGCC	-----	AA---CCA	///	TTGCCAGGGTGATTCCGG	642
AAEL013715	243	TGACGGCTGGGCATTG	TGCCG---GTAGCAGCG	-----	AAGATCCA	///	TTGCCAGGGAGATTCCGG	644
AAEL013707	232	TGACGGCTGCGCATTG	CGCCG---CTACTAGCG	-----	AAGATCCA	///	TTGCCAGGGAGATTCCGG	633
AAEL007601	260	TGACAGCTGCGCATTG	TGCCT---CCAGTAGCG	-----	AAGATCCA	///	TTGCCAGGGAGATTCCGG	661
AAEL004996	247	TAACGGCAGCCCACTG	TACTAAAGGAATTACCA	-----	ATGCATCG	///	CTGTCAGGGTGACTCCGG	648
AAEL011549	217	TGACCGCAGCCCACTG	CATAGAAGAGGGAAC	-----	///	CTGCCAGGGTGACTCCGG	615	
AAEL005689	178	TGACCGCAGCCCACTG	CATAGAAGAGGGAAC	-----	///	CTGCCAGGGTGACTCCGG	576	
AAEL013703	253	TGACGGCAGCTCATTG	TATTGGAGATCCAACCA	-----	GT---ACG	///	GTGCAACGAAGACTCCGG	657
AAEL006425	267	TGACGGCGGCACATTG	TACGG---ATGGAGCAT	-----	CCGCGTCG	///	CTGCCAGGGAGATTCTGG	668
AAEL006903	208	TAACGGCAGCGCATTG	TACCG---ATGACACAA	-----	TCCCACGC	///	GTGTCGAAGGCGATTCAAG	597
AAEL013623	310	TGACGGCTGCCCACTG	CTGGTGAACGAGGAGG	-----	CGAGCTACTTCC	///	TTGCCAGGGTGATTCCGG	720
AAEL008093	217	TGACGGCTGCCCACTG	CTGGTGAACGAGGAGG	-----	CGAGCTACTTCC	///	TTGCCAGGGTGATTCCGG	627
AAEL008085	245	TGACGGCTGCCCTCTG	CTGGTGAACGAGGAGGCAAGCGTCGTGTTGCGAGCTACTTCC	///	///	TTGCCAGGGTGATTCCGG	670	
AAEL006429	196	TAACGGCTGCGCATTG	CCTGGTAGGTGAAACTC	-----	CAGAC	///	TTGCCAAGGTGACTCGGG	588
AAEL006427	196	TTACGGCTGCGCACTG	CTTAGTCGGTGAAACGC	-----	CAGAC	///	TTGCCAAGGTGACTCGGG	588
AAEL006430	190	TGACGGCAGGTCACTG	CGTGTGGGATAAAAAAGC	-----	CTGCC	///	ATGCCAAGGAGATTCAAG	585
AAEL006414	178	--ACGGCAGCCCACTG	CGTTTATCATAGAAAAC	-----	CTTCT	///	CTGCCAAGGAGATTCTGG	576
AAEL015638	319	TTTCAGCGGCCCACTG	CTTCAGGTCATGGTTCAACAACC	-----	CGCGGTA	///	GTGCAGTGAGATTCCGG	729
AAEL001234	223	TTTCAGCGGCCCACTG	CTTCAGGTCATGGTTCAACAACC	-----	CGCGGTA	///	GTGCAGTGAGATTCCGG	633
AAEL000190	259	TGACGGCAGCACATTG	CTTGGTGGCCGAAACAA	-----	CCGAT	///	TTGCAAGGGTGATTCCGG	651
AAEL006371	769	TGACGGCAGCGCACTG	CATTACCGATATTCAAGGGGTTCCGATGAGCGTTTCTCGGATCC	///	///	CTGTCAGGGTGATTCCGG	1185	
AAEL011553	205	TGACAGCGGCCCACTG	CGTATACTACACAAATG	-----	TAGAACCTACC	///	CTGCCAGGGAGATTCCGG	606
AAEL006418	220	TAACGGCTGCACACTG	TTCTATGGCCACGAAG	-----	CGATTATGAA	///	CTGCGTCGGTGATTCCGG	645

* * * * *

* * * * *

Figura 6. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos das enzimas tipo tripsina de *Aedes aegypti*. Oligonucleotídeos degenerados, Aetryfwd 5'TGACNGCTGCNCACTG3' e Aetryrev 5'CCGGAATCACCCCTGGC3' foram construídos baseados nas seqüências de nucleotídeos das 36 tripsinas presentes no genoma do *Ae. aegypti*. As seqüências de nucleotídeos dentro dos retângulos representam as regiões usadas para construir os oligonucleotídeos degenerados. Asteriscos indicam a identidade entre as bases. As três barras representam partes das seqüências que não foram mostradas na figura.

De posse dos oligonucleotídeos construídos, foi possível realizar uma PCR com a preparação de cDNA de intestino médio de larvas de 4º instar. Na reação de PCR, duas bandas majoritárias foram amplificadas com tamanho de aproximadamente 380 pb (Figura 7). Essas duas bandas foram separadas em gel de agarose, cortadas e purificadas. Os fragmentos de DNAs purificados foram ligados no vetor pGEM-T easy. Essas construções foram utilizadas na transformação de bactérias *E.coli* cepa DH5α. As bactérias transformantes foram selecionadas em placas LB-ágar contendo ampicilina.

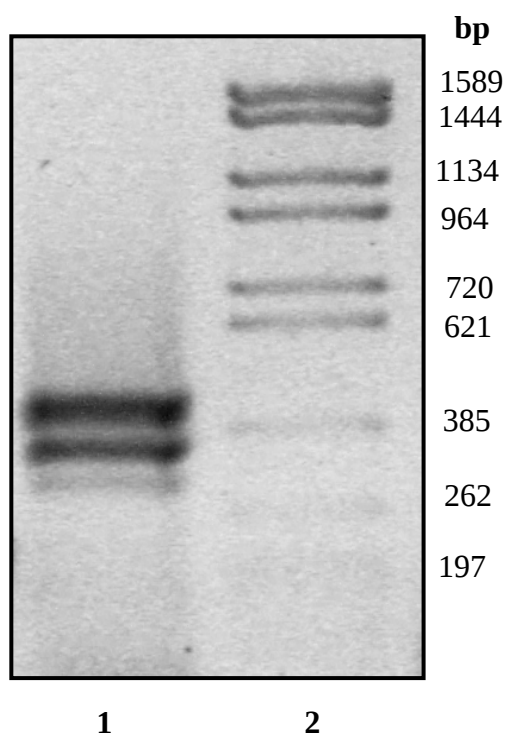


Figura 7. Gel de agarose (1%) de produtos de PCR com oligonucleotídeos degenerados para região interna das tripsinas de *Aedes aegypti*. 1. Reação de PCR utilizando cDNA do intestino médio de larvas de 4º instar de *Ae. aegypti* e oligonucleotídeos degenerados. 2. Marcador de nucleotídeos.

Aleatoriamente, 100 clones isolados das placas LB-ágar, contendo ampicilina, tiveram a parte dos DNAs plasmidiais, que codificam para os genes clonados, sequenciados. De 75 clones foram obtidas sequências com qualidade para serem analisadas no programa Blast. Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos obtidas mostraram similaridade com quatro sequências de tripsinas identificadas como: AAEL005607, AAEL006371, AAEL008097 e AAEL005609 no genoma de *Ae. aegypti*, representando frequências de 29,3%, 20%, 6,6% e 1,3%, respectivamente, como mostra a tabela 1.

Tabela 1. Sequências de aminoácidos de enzimas hipotéticas do tipo tripsina identificadas no intestino médio de larvas de 4º instar do *Aedes aegypti*.

Número de Acesso*	Sequência de aminoácidos	Frequência (%) **
AAEL005607	IVGGNEVSIAFPYQLSLRHNGNHICGASVISSNWALSAAHCTVAPVSA	29,3
	GSATLRGGSSSRLTGGVIFAQIVNHPQYNANTINNDVSVLRSTTSFA	
	GANISPITIVPSGTNFAGGTRSVVSGWGLTTPGGSLPTNLRAVDIPVVT	
	LATCRNQWGAARITDSMVCAGEPGRDSCNGDSGGPLVTGGRQFGIVSWG	
	ATQCGGNLAGVYANIGAAVIRNFISSNTGV	
AAEL006371	IIGGTPATLGEFPSKVSLQTTQNSAHFCGGTLLTLRHVLTAAHCITDIQ	20
	GVPMSVSRIQAMADDLNLVLPKMGSAQRVQVKSNIHDKYNPSTLAND	
	LAIVSLEKEFTKTNTLYPSKRASSAPPPGQLCALAGWVTAENSQSISP	
	SLQRVNLEVISFEHCNTAYQGALVKGMMCASAPGRDACQGDSSGALICQ	
	NRVAGVVSFGSGCAHPTFPGVYMDITHYEKWIGKALNGVDSL VGGSMT	
AAEL008097	LLMAFAVTRNHLV	6,6
	IVGGFPASQQATVHQVSIRVKSNDLKAFSGHICGGSLINNRTVLTAAH	
	CLVDSSNRKRSADYFRVVGGSLNRTVTSNTILDVSQVVIHQRYNPVNF	
	DNDVGLLILSSIVSANHATLRPINMAATKPNPGVLCQTSWGTPIFGEP	
	IKTSVLMVNVTVQPTICNGTSSYNGFIKNGMFCAGDVQGYRDACQGD	
AAEL005609	SGGPLVCNGQLAGIVSNGKDCGLAAYPGIYADVAYYRGWILTNGAGQRT	1,3
	IIGGTALALTMVGLVYGFVQRLMM	
	IVGGNEVSIAFPYQLSLRHNGNHICGASVISSNWALSAAHCTVSPVTA	
	GSATLRGGSANRLSGGVIFAQIVNHPQYNSNNLNNDVSVLRSTTSFS	
	GANISPITLVPSGTNFAAGTRSVVSGWGLTTPGGSLPTTLRAVDIPVVA	
AAEL005609	IATCRSQWGAAAITDNMVCAGEPGRDSCNGDSGGPLVTGGRQFGIVSWG	1,3
	ATQCGGPLAGVYANVGAASVRNFISSNTGV	

*Número de acesso no Banco de dados do genoma do *Ae. aegypti*.

**Frequência de cada sequência em “screening” aleatório de uma pequena biblioteca de fragmentos de DNA.

4.2. Presença de transcritos de tripsina em diferentes estádios de vida do mosquito

Utilizando-se os dados da frequência de tripsinas no 4º instar de larvas de *Ae. aegypti* e com o objetivo de analisar o perfil de expressão das tripsinas, foram construídos oligonucleotídeos específicos para as sequências das duas tripsinas majoritárias AAEL005607 e AAEL006371, respectivamente. Os oligonucleotídeos foram utilizados em uma PCR semi-quantitativa com preparações de cDNA de larvas de 1º e 2º instar e intestino médio de larvas de 3º e 4º instar, pupa e fêmeas após 3 h e 24 h de alimentação com sangue. Fragmentos de DNA obtidos por PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Figura 8). A tripsina AAEL005607 foi transcrita em todos os estádios larvais, apresentando um aumento em sua expressão durante o desenvolvimento larval, mas sua transcrição não foi detectada em pupa e em fêmea alimentada. Em contraste ao dado de transcrição da tripsina AAEL005607 durante o desenvolvimento larval, a tripsina AAEL006371 foi detectada somente em larvas de 3º e 4º instar, mas apareceu também em pupa e adulto; sua transcrição é mais baixa do que a AAEL005607 nos 3º e 4º estádios larvais.

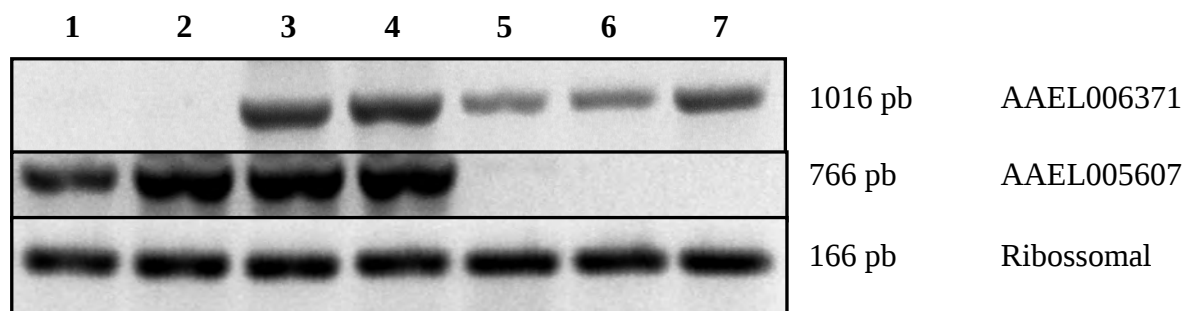


Figura 8. PCR semi-quantitativo da expressão de duas enzimas do tipo tripsina nos diferentes estádios de vida do *Aedes aegypti*. 1. cDNA de larva de 1º instar; 2. cDNA de larva de 2º instar; 3. cDNA de intestino de larva de 3º instar; 4. cDNA de intestino de larva de 4º instar; 5. cDNA de pupa; 6. cDNA de intestino de fêmea após 3 h de alimentação sanguínea; 7. cDNA de intestino de fêmea após 24 h de alimentação sanguínea. Oligonucleotídeos para proteína ribossomal (Rp49) foram usados como controle.

4.3. Análise do perfil proteolítico das enzimas digestivas do mosquito *Aedes aegypti*

Diferentes estádios do *Ae. aegypti* foram analisados por zimografia para confirmar o dado de transcrição. Todos os estádios larvais apresentaram várias bandas com atividade proteolítica sobre a gelatina; essas bandas de proteína aparentemente diferiram somente por concentração, aumentando do estágio precoce ao mais tardio. Nota-se que o perfil proteolítico em fêmeas adultas alimentadas difere muito do perfil larval (Figura 9). Para identificar a família de proteases à qual as enzimas presentes no intestino médio de larvas de *Ae. aegypti* pertencem, o extrato de larvas de 4º instar foi incubado com inibidores específicos de serinoproteases, cisteinoproteases e metaloproteases, antes do experimento de

zimografia. Os nossos resultados mostram que as atividades proteolíticas foram quase que totalmente inibidas por APMSF, um inibidor específico de serinoproteases (Figura 10). A atividade proteolítica presente em extrato de larvas de 1º e 2º instar e no intestino médio de larvas de 3º e 4º instar foi avaliada com o substrato cromogênico utilizado para tripsinas de outros organismos, Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA (Figura 11).

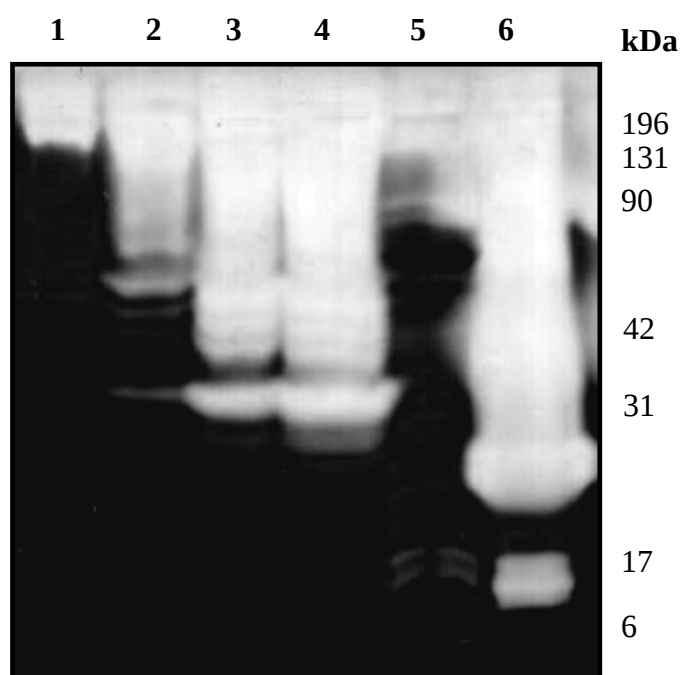


Figura 9. Zimografia (12%) de atividades proteolíticas presentes em larvas e adultos de *Aedes aegypti*. 1. Extrato de larvas de 1º instar; 2. Extrato de larvas de 2º instar; 3. Extrato do intestino médio de larvas de 3º instar; 4. Extrato do intestino médio de larvas de 4º instar; 5. Extrato do intestino médio de fêmeas após 3 h de alimentação sanguínea; 6. Extrato do intestino médio de fêmeas após 24 h de alimentação sanguínea.

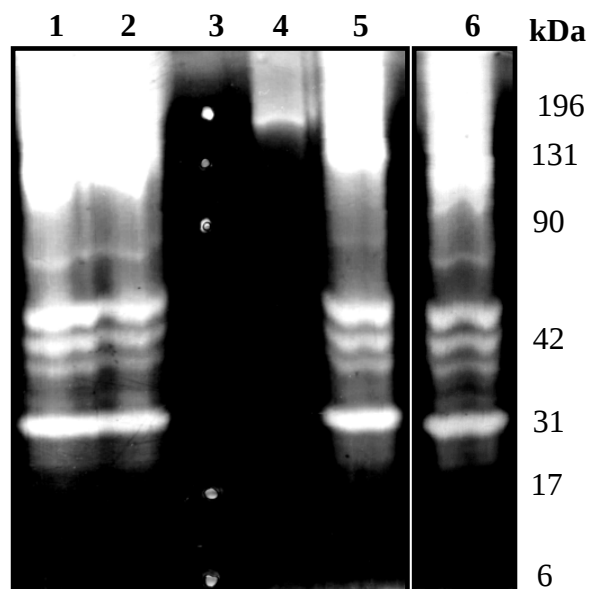


Figura 10. Zimografia (12%) de extrato do intestino médio de larvas de 4º instar incubado com diferentes inibidores de proteases. 1. Extrato do intestino médio; 2. Extrato do intestino médio com metanol; 3. Marcador de massa molecular de proteína; 4. Extrato do intestino médio com APMSF; 5. Extrato do intestino médio com E64; 6. Extrato do intestino médio com EDTA.

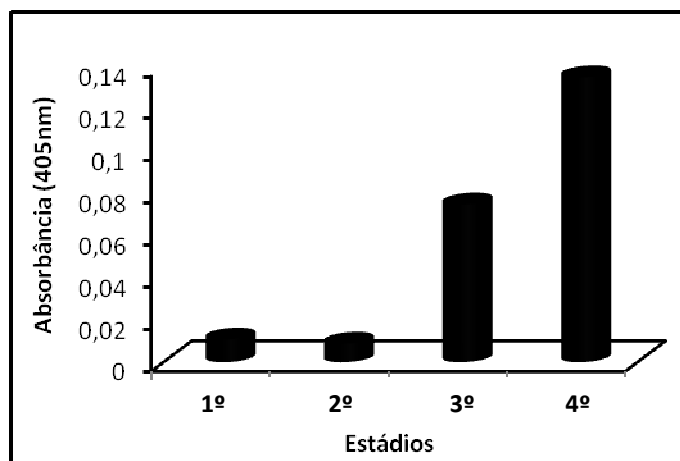


Figura 11. Atividade proteolítica dos extratos de intestino médio dos diferentes estádios larvais. Ensaio enzimático (1,5 µg proteína total) de diferentes estádios larvais utilizando o substrato cromogênico, Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA (0,2 mM) em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, contendo NaCl 150 mM e Triton X-100 0,1%. O experimento foi realizado em duplicata.

4.4. Purificação e caracterização de tripsina nativa do intestino médio de larvas de 4º instar de *Aedes aegypti*

Confirmada uma maior atividade de serinoprotease no intestino médio de larvas de 4º instar. Intestinos médios desse estágio foram utilizados no preparo de um extrato bruto que foi utilizado no primeiro passo de purificação da tripsina nativa. A maior parte da atividade proteolítica presente no extrato bruto foi inibida por BPTI; então, como objetivo de obter um material mais concentrado, foi utilizada, como primeira etapa de purificação, uma cromatografia de afinidade em coluna BPTI-Sepharose. A eluição das atividades do tipo tripsina foi confirmada pela hidrólise do substrato sintético, Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA (Figura 12); as frações com atividade proteolítica foram reunidas e concentradas. O K_i aparente dos inibidores AaTI e HiTI para esse material foram de 9,58 pM e 530 pM, respectivamente. O material proveniente da cromatografia de afinidade foi posteriormente purificado em uma cromatografia de troca iônica usando uma coluna Resource S conectada a um sistema ÄKTA *purifier*. As frações obtidas foram testadas com o substrato Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA, e a atividade proteolítica foi eluída no material não retido na coluna (Figura 13). É importante mencionar que o material pós cromatografia de afinidade já havia sido submetido a uma cromatografia em uma coluna Resource Q, e apresentou o mesmo perfil, ou seja, não ficou retido na coluna. Mas, como proteínas contaminantes foram separadas por esses métodos prosseguimos com a purificação.

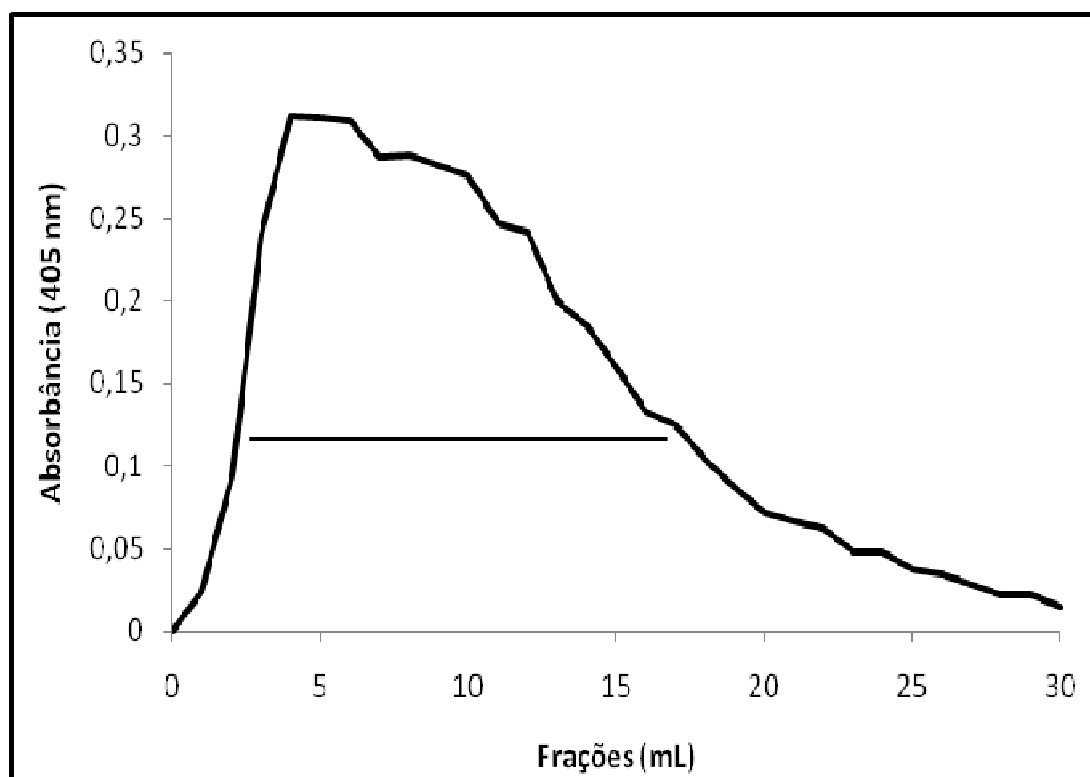


Figura 12. Cromatografia de afinidade em uma coluna BPTI-Sepharose. O extrato do intestino médio de larvas de 4º instar foi aplicado a uma coluna BPTI-Sepharose (5 mL); as proteínas ligadas foram eluídas com solução de KCl 0,5 M pH 2,0. A atividade proteolítica foi medida com Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA. A barra horizontal preta indica as frações com atividades somadas em uma única fração.

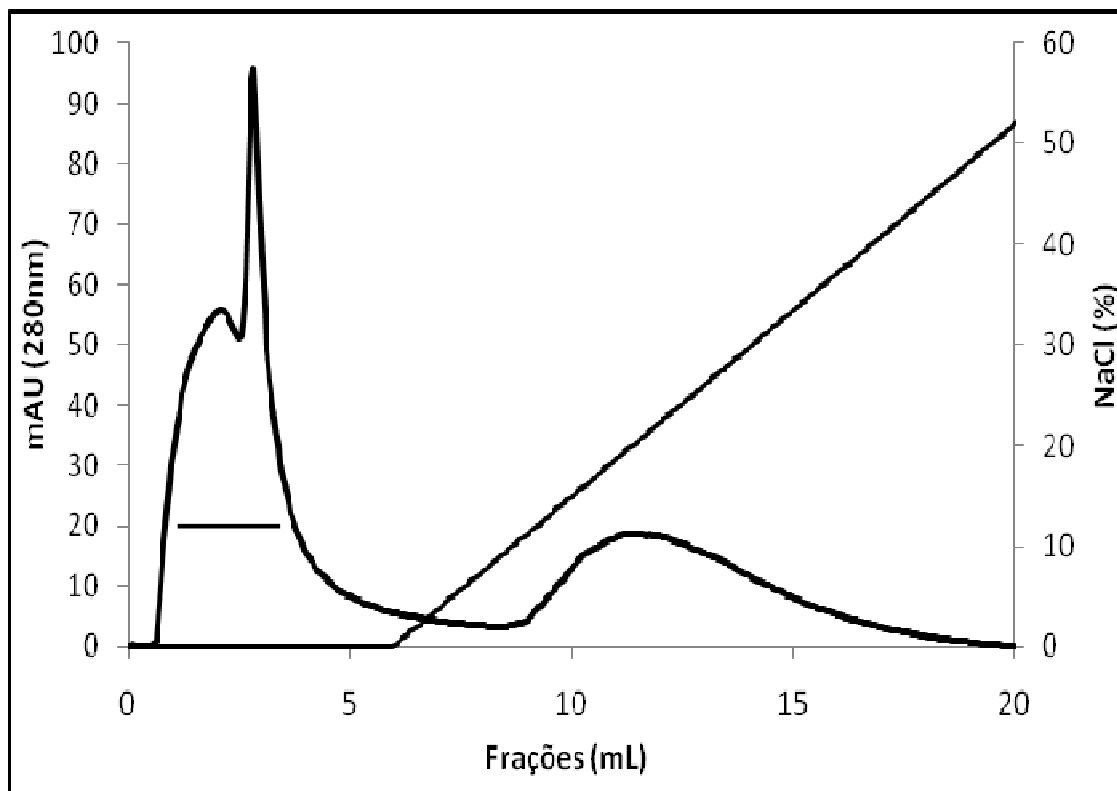


Figura 13. Cromatografia de troca iônica em coluna Resource S do material proveniente da cromatografia de afinidade. Material ativo da BPTI-Sepharose foi aplicado em uma coluna Resource S (5 mL). As proteínas foram eluídas com um gradiente linear de NaCl (0–1 M). A barra horizontal representa as frações que foram reunidas em uma única fração ativa.

Na tentativa de se obter uma enzima mais pura, a fração com atividade proteolítica da coluna Resource S foi concentrada e, em seguida, foi aplicada em uma coluna *Sephasil peptide C₈* em uma cromatografia de fase reversa, ver figura 14. A tripsina de larvas de *Ae. aegypti*, purificada por cromatografia de fase reversa,

apresentou dois picos de proteína, que foram submetidos ao sequenciamento de aminoácidos e apresentaram a sequência N-terminal **IVGGNEVSIA** (Figura 14). A tripsina purificada apresentou uma banda proteica única de 28 kDa em SDS-PAGE (Figura 15).

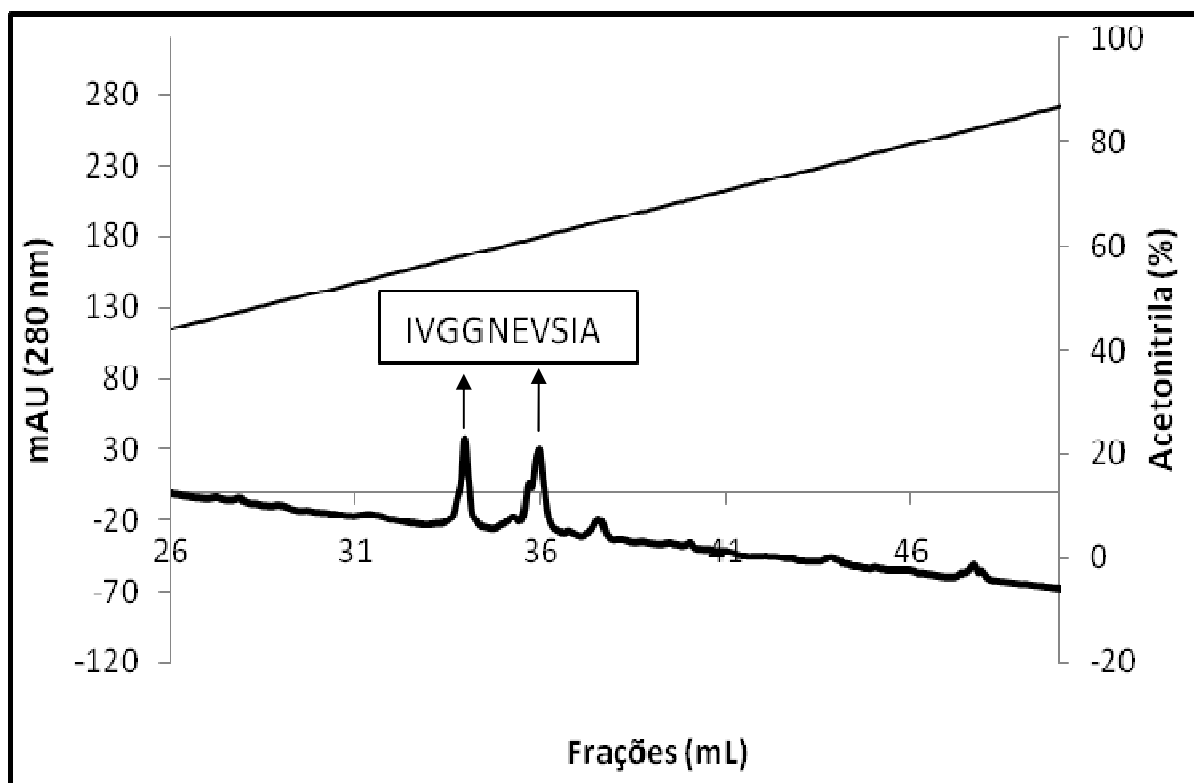


Figura 14. Cromatografia de fase reversa em coluna *Sephasil peptide C₈* de tripsina purificada por cromatografia de troca iônica. A tripsina parcialmente purificada por cromatografia de troca iônica foi aplicada em uma coluna *Sephasil peptide C₈* conectada ao sistema ÄKTA *purifier*. A eluição das proteínas foi realizada com um gradiente linear de acetonitrila (0–90%). Os picos proteicos que apresentaram atividade proteolítica foram submetidos ao sequenciamento automático de aminoácidos N-terminal e a sequência obtida está indicada na figura.

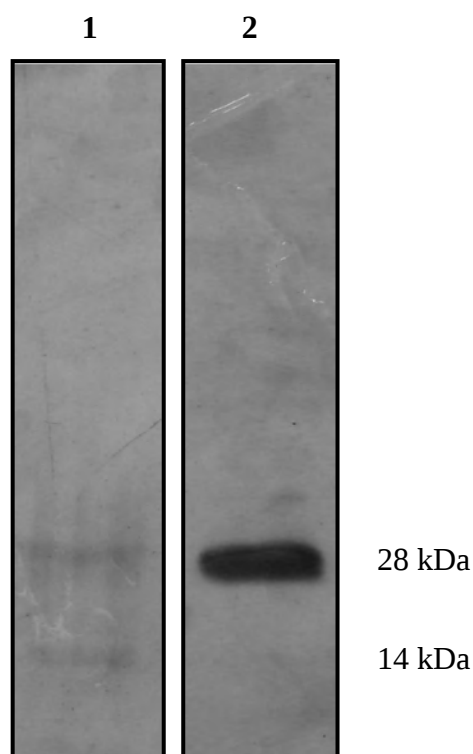


Figura 15. SDS-PAGE (12%) das tripsinas de *Aedes aegypti* purificadas. 1. Material ativo após cromatografia de troca iônica em uma coluna Resource S. 2. Tripsina purificada após cromatografia de fase reversa em coluna *Sephasil peptide C₈*. O gel foi corado com prata.

A sequência N-terminal da tripsina purificada obtida foi idêntica a três isotripsinas de *Ae. aegypti*, identificadas no Banco de Dados como AAEL005614, AAEL005607 e AAEL005609; essas três tripsinas apresentam similaridades em suas sequências, como está mostrado na figura 16. A identificação da tripsina AAEL005607 corrobora os dados de transcrição nesse estágio larval.

AAEL005614	IVGGNEVSIANFPYQLSLRHNGNHICGASVISSNWALSAAHCTVAPVSAGSATLRGGSSS	60
AAEL005607	IVGGNEVSIANFPYQLSLRHNGNHICGASVISSNWALSAAHCTVAPVSAGSATLRGGSSS	60
AAEL005609	IVGGNEVSIANFPYQLSLRHNGNHICGASVISSNWALSAAHCTVSPVTAGSATLRGGSAN	60
*****.*****.		
AAEL005614	RLTGGVIFAVAQIVNHPQYNANTINNDVSVLRSTTSFTGANISPITIVPSGTNFAGGTRS	120
AAEL005607	RLTGGVIFAVAQIVNHPQYNANTINNDVSVLRSTTSFAGANISPITIVPSGTNFAGGTRS	120
AAEL005609	RLSGGVIFAVAQIVNHPQYNSNNLNDVSVLRSTTSFSGANISPITLVPSGTNFAAGTRS	120
.*.***.*.*.*****.*.*.*.*****.*.*****.*.*****.		
AAEL005614	VVSGWGLTTPGGSLPTNLRAVDIPVVTLCRCRSQWGTARITDSMVCAGEPGRDSCNGDSG	180
AAEL005607	VVSGWGLTTPGGSLPTNLRAVDIPVVTLCRCRNQWGAARITDSMVCAGEPGRDSCNGDSG	180
AAEL005609	VVSGWGLTTPGGSLPTTLRAVDIPVVAIATCRSQWGAAAITDNMVCAGEPGRDSCNGDSG	180
*****.*.*****.*.*****.*.*.*.*****.*.*****.*.*****.		
AAEL005614	GPLVTGGRQFGIVSWGAVQCGGNLAGVYANIGAAVIRNFISSNTGV	226
AAEL005607	GPLVTGGRQFGIVSWGATQCGGNLAGVYANIGAAVIRNFISSNTGV	226
AAEL005609	GPLVTGGRQFGIVSWGATQCGPLAGVYANVGAASVRNFISSNTGV	226
*****.*.*****.*.*.*.*****.*.*.*.*****.*.*****.*.*****.		

Figura 16. Alinhamento das sequências de aminoácidos das enzimas do tipo tripsina com alta similaridade na região N-terminal obtida para a tripsina purificada de *Aedes aegypti*. Os asteriscos representam os aminoácidos idênticos em todas as seqüências; os dois pontos indicam substituições conservadas de aminoácidos e o ponto indica substituições semi-conservadas de aminoácidos. O alinhamento foi realizado utilizando o programa ClustalW2

A fim de melhor caracterizar essa tripsina larval de *Ae. aegypti*, o material da cromatografia de troca iônica foi usado em ensaios cinéticos, utilizando o substrato Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA, um substrato cromogênico, utilizado com freqüência para estudos de tripsina bovina (Asgeirsson e Cekan, 2006). A tripsina purificada apresentou um valor de Km de 35,5 µM para esse substrato sintético. Paralelamente, a tripsina purificada foi inibida por dois inibidores de tripsina já caracterizados no nosso laboratório: o AaTI, um inibidor de tripsina e trombina presente em *Ae. aegypti* (manuscrito a ser submetido para publicação) e o HiTI, um

inibidor de tripsina e elastase de neutrófilos presente em “mosca do chifre” (Azzolini *et al.*, 2005), apresentando valores de K_i extremamente baixos de 0,95 e 160 pM, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Constante de dissociação aparente (K_i), por diferentes inibidores de tripsina, para a tripsina purificada de larva de *Aedes aegypti*.

Inibidor	K_i (nM)
AaTI	0,009
HiTI	0,160
BPTI	17,5*

* IC_{50} – Concentração de inibidor que inibiu 50% da tripsina do ensaio.

5. Discussão

5.1. Pequena biblioteca de fragmentos de DNA de tripsina de larvas de 4º instar de *Aedes aegypti*

Venancio e colaboradores (2008) examinaram 66 tripsinas putativas de larvas e adultos anotadas no genoma do *Ae. aegypti*; entre elas, havia serinoprotease, oviductina, lumbroquinase 3, elastase, proacrosina e serinoprotease com domínio clip. Várias dessas sequências de tripsina de *Ae. aegypti*, identificadas tanto em larva quanto em adulto, apresentaram alta similaridade a tripsinas de outros insetos. No intuito de entender melhor as enzimas do tipo tripsina presentes no intestino médio larval, construímos uma pequena biblioteca de fragmentos de DNA de tripsina de larvas de 4º instar de *Ae. aegypti*. Com essa biblioteca nos foi possível identificar quais transcritos de tripsinas estavam presentes nesse estágio larval, pelo sequenciamento de nucleotídeos de 100 clones aleatórios, sendo desses 75 com sequências aproveitáveis. As seqüências de nucleotídeos obtidas revelaram a presença de quatro transcritos de tripsina. Das quatro seqüências de tripsinas identificadas, duas delas representam 50% das seqüências obtidas, sendo as mesmas identificadas como AAEL005607 e AAEL006371, no genoma de *Ae. aegypti*, as quais apresentam similaridades com tripsina e oviductina, respectivamente. Surpreendentemente, ambas as enzimas do tipo tripsina, identificadas em larvas de 4º instar de *Ae. aegypti* nesse trabalho, não foram encontradas por Venancio e colaboradores (2008). Nossa explicação para esse fato foi que os autores usaram uma mistura de larvas e adultos no preparo da biblioteca de cDNA, o que pode ter dificultado a detecção de tripsinas com diferentes níveis de expressão e, conseqüentemente, ter favorecido a identificação de enzimas com alto

nível de expressão do estágio de vida adulto. Paralelamente ao estudo de tripsinas, Isoe e colaboradores (2009) realizaram análises moleculares de exopeptidases, tais como a família de genes de carboxipeptidase. Utilizando uma combinação de clonagem de cDNA e buscas no Banco de dados do genoma de *Ae. aegypti*, os autores caracterizaram dezoito genes de carboxipeptidase do intestino médio de *Ae. aegypti*; algumas das enzimas apresentaram modulação positiva de expressão após ingestão de sangue, sugerindo a necessidade de mais enzimas para a digestão do alimento.

5.2. A presença de transcritos de tripsina em diferentes estádios de vida do mosquito

De posse dos dados obtidos com a biblioteca de fragmentos de DNA de tripsina, as sequências das duas enzimas do tipo tripsina identificadas em larvas de *Ae. aegypti*, AAEL005607 e AAEL006371, foram utilizadas na construção de oligonucleotídeos específicos, as quais foram utilizadas em experimentos de PCR semi-quantitativos ao longo de todos os estádios de desenvolvimento do mosquito. Nossos resultados mostram que a tripsina AAEL005607 foi transcrita em todos os estádios larvais, com expressão aumentada ao longo do desenvolvimento larval; no entanto, sua transcrição não foi detectada em pupa e nas amostras de mosquitos adultos alimentados, sugerindo fortemente que essa tripsina seja expressa exclusivamente em larvas na condição experimental utilizada. Nossos resultados nos permitiram sugerir que a tripsina AAEL005607 é a principal enzima digestiva de larvas de *Ae. aegypti*, devido à sua frequência, comparada as outras enzimas identificadas. Em contraste, a transcrição da tripsina AAEL006371 foi detectável somente em larvas de 3º e 4º instar, assim como em pupa e adulto 3 h após a

alimentação e, interessante, essa tripsina teve o nível de expressão aumentado em adulto 24 h após a alimentação. A transcrição da tripsina AAEL006371 parece ser menor quando comparada à tripsina AAEL5607 nos estádios larvais, 3º e 4º instars. O perfil de expressão da tripsina AAEL006371 sugere um possível papel no processo digestivo apenas das larvas de 3º e 4º instars, assim como nas fases de pulpa e adultos com alteração nos níveis de expressão.

5.3. Purificação e caracterização da tripsina nativa do intestino médio de larvas de 4º instar

A zimografia e a zimografia reversa são métodos simples, mas amplamente usados na identificação de atividade proteolítica de enzimas e de seu efeito inibitório, respectivamente, em géis de poliacrilamida contendo um substrato (Thimon *et al.*, 2008). Nesse trabalho, a zimografia foi realizada para analisar as enzimas presentes no extrato bruto de diferentes estádios de *Ae. aegypti*. Os resultados mostraram a presença de inúmeras proteínas com atividade; no entanto, esse perfil não apresentou alteração significativa, somente um aumento nas intensidades das bandas, durante o desenvolvimento larval. A fim de se confirmar um aumento nas atividades enzimáticas durante o desenvolvimento larval de *Ae. aegypti*, um substrato sintético para tripsina foi utilizado. Os resultados desses dois experimentos corroboram os resultados de Yang e Davies (1971), que mostraram uma variação na atividade enzimática da tripsina ao longo do desenvolvimento larval. Recentemente, Pereira e colaboradores (2008) usaram uma combinação de ensaios bioquímicos e zimografia para caracterizar as enzimas digestivas da lagosta

Panulirus argus; mostraram que essas enzimas foram fortemente inibidas por SBTI e PMSF, provando a prevalência de serinoproteases nesse artrópode.

Na tentativa de se confirmar a presença de serinoproteases no intestino médio de larvas de 4º instar de *Ae. aegypti*, diferentes inibidores de serinoproteases foram usados em combinação com zimografia. Nossos resultados mostraram que quase toda a atividade proteolítica presente no intestino médio de larvas de 4º instar foi inibida por APMSF, inibidor específico de serinoproteases, confirmando a presença dessas enzimas, que corrobora os resultados de enzimas digestivas de outros insetos, que apresentam majoritariamente serinoproteases como enzimas digestivas (Terra e Ferreira, 1994).

Apesar da dificuldade na purificação de tripsina de larvas de inseto, algumas tripsinas digestivas já foram purificadas por métodos cromatográficos clássicos; entre elas, estão tripsinas de espécies de insetos como *Periplaneta americana* (Lopes e Terra, 2003), *Locusta migratoria* (Lam *et al.*, 2000) e *Helicoverpa zea* (Volpicella *et al.*, 2003). De posse desses dados, e também sabendo que o nosso desafio seria maior, visto ser muito pequeno o tamanho das larvas de *Ae. aegypti*, decidimos assim mesmo purificar a tripsina majoritária de larvas de 4º instar, a fim de confirmar os nossos resultados obtidos por sequenciamento de nucleotídeos da biblioteca de fragmentos de DNA de tripsina. A purificação da tripsina majoritária, por métodos cromatográficos clássicos; no entanto, vista a dificuldade em obter altas concentrações da tripsina totalmente isolada, a caracterização cinética da tripsina foi realizada com o material pós cromatografia de troca iônica, principalmente porque o material pós cromatografia de fase reversa não apresentou atividade proteolítica suficiente para essa caracterização. A tripsina parcialmente purificada de larva de 4º instar de *Ae. aegypti* apresentou um valor muito baixo de K_m (36,2 μM) para o Tosyl-

Gly-Pro-Arg-pNa, um substrato cromogênico utilizado para monitorar tripsina bovina (Asgeirsson e Cekan, 2006); isso sugere alta especificidade da enzima para esse substrato. A tripsina parcialmente purificada foi fortemente inibida por dois inibidores de tripsina, HiTI (*Haematobia irritans irritans* Trypsin Inhibitor) e AaTI (*Aedes aegypti* Trypsin Inhibitor), com valores de K_i de 0,95 pM e 0,16 nM, respectivamente. O AaTI é um inibidor de tripsina e trombina presente em glândula salivar e intestino médio de *Ae. aegypti* (dado não publicado). Devido a sua alta especificidade para a tripsina purificada de *Ae. aegypti*, podemos sugerir que o AaTI pode apresentar um papel no controle de tripsina endógena de larva do mosquito, que pudesse ser acidentalmente liberada do intestino médio. O HiTI é um inibidor de tripsina presente na mosca *H. irritans irritans* e foi mostrado que ele apresenta valores de K_i de 0,57 e 0,2 nM para a tripsina bovina e tripsina do mesmo inseto, respectivamente (Azzolini *et al.*, 2005). Apesar da purificação de tripsinas de *Ae. aegypti* ter sido realizada em uma coluna de BPTI-Sepharose, não foi possível determinar seu valor de K_i , estes resultados podem ser resultado de uma inibição não tão forte, ou talvez por um mecanismo de inibição que não se encaixe na inibição *tight binding*, descrito por Morrison (1969). A tripsina de *Ae. aegypti* só foi completamente purificada por cromatografia de fase reversa, apresentando uma banda de proteína de 28 kDa por SDS-PAGE, que corresponde a massa molecular de outras tripsinas de inseto, 20 kDa a 35 kDa (Terra e Ferreira, 1994). A tripsina purificada apresentou a sequência amino-terminal parcial IVGGNEVSIA, que comparada com as enzimas hipotéticas de *Ae. aegypti* mostrou 100% de identidade com as sequências de tripsina AAEL005607, AAEL005614 e AAEL005609. Somando todas as informações geradas neste trabalho, nós sugerimos que a tripsina AAEL005607 é a enzima digestiva majoritária de larvas de 4º instar de *Ae. aegypti*. No entanto, com base nos dados de

transcrição e da sequência de aminoácidos parcial, não somos capazes de descartar que um dos picos de proteína identificado na cromatografia de fase reversa seja produto do gene AAEL005609, visto que dois picos protéicos apresentaram a mesma sequência amino-terminal, e estas enzimas, AAEL005607 e AAEL005609 diferem somente na posição 54, o que não foi possível confirmar com os dados de seqüenciamento de aminoácidos pela escassez de material e limitações do método.

Em conclusão, pela primeira vez, as tripsinas de estágio larval de *Aedes aegypti* foram caracterizadas, seus perfis de expressão ao longo desenvolvimento do mosquito determinado. E uma tripsina digestiva de larva de 4º instar de *Ae. aegypti* foi purificada e caracterizada.

6. Resumo

O *Aedes aegypti* é o vetor mais importante de arboviroses humana sendo responsável pelas transmissões de dengue e febre amarela urbana. As enzimas tipo tripsina apresentam um importante papel na digestão de estádios de vida larval e adulto de *Ae. aegypti*. No presente trabalho, nós identificamos as duas enzimas tipo tripsina majoritárias do intestino médio larval através da construção de uma biblioteca de fragmentos de cDNA de tripsina. Elas são AAEL005607 e AAEL006371, com frequências de expressão de 29,3% e 20%, respectivamente. Análises por PCR semi-quantitativo mostraram que a tripsina AAEL005607 foi transcrita em todos os instars larval, mas a tripsina AAEL006371 apareceu somente nos 3º e 4º instar larvais. A fim de confirmar os dados de transcrição, enzimas tipo tripsina do intestino médio de larvas de 4º instar foram purificadas por cromatografias de afinidade, troca iônica e fase reversa. A tripsina purificada apresentou massa molecular de 28 kDa por SDS-PAGE. Sua sequência de aminoácidos parcial nos permitiu sugerir que a atividade de tripsina é codificada pela sequência AAEL005607. A tripsina purificada (AAEL005607) exibiu um valor de Km de 36,4 μ M para o substrato Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNa e foi fortemente inibida por AaTI e HiTI, ambos inibidores de tripsina, com valores de Ki de 0,94 pM e 160 pM, respectivamente. Em conclusão, pela primeira vez, a enzima digestiva majoritária de 4º instar larval de *Ae. aegypti* foi purificada e caracterizada.

7. Abstract

Aedes aegypti is the most important vector of human arboviral diseases and it is responsible for dengue and urban yellow fever transmissions. Trypsin-like enzymes play an important role in the *Ae. aegypti* adult and larval life stages digestion. In the present work, we identified the two major trypsin-like enzymes of *Ae. aegypti* larval midgut through the trypsin cDNA fragments library construction. They are AAEL005607 and AAEL006371, with expression frequencies of 29.3% and 20%, respectively. Semi quantitative PCR analysis showed that the AAEL005607 was transcribed in all larval instars, but AAEL006371 appeared only in 3rd and 4th larval instars. In order to confirm the transcription data, trypsin-like enzymes from 4th instar larvae of *Ae. aegypti* midgut were purified by affinity, ionic exchange and reversed-phase chromatographies. Purified trypsin presented molecular mass of 28 kDa by SDS-PAGE. Its partial amino acid sequence allowed us to suggest that the trypsin activity is encoding by AAEL005607 sequence. The purified trypsin (AAEL005607) showed K_m value of 36.4 μ M for Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNa substrate and was strongly inhibited by AaTI and HiTI, both trypsin inhibitors, with K_i of 0.94 pM and 160 pM, respectively. In conclusion, for the first time, the major digestive enzyme of 4th larval instar of *Ae. aegypti* was identified and characterized.

8. Referências Bibliográficas

Asgeirsson B e Cekan P. 2006 Microscopic rate-constants for substrate binding and acylation in cold-adaptation of trypsin I from Atlantic cod. FEBS Lett 580 () 4639-44.

Azzolini SS, SD Sasaki, IT Campos, S Torquato RJ, Juliano MA, Tanaka AS. 2005. The role of HiTI, a serine protease inhibitor from *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae) in the control of fly and bacterial proteases. Exp Parasitol 111: 30-6.

Barillas-Mury CV, Noriega FG, Wells MA. 1995. Early trypsin activity is part of the signal transduction system that activates transcription of the late trypsin gene in the midgut of the mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol 25: 241-6.

Barillas-Murray C e Wells MA. 1993. Cloning and sequencing of the blood meal-induced late trypsin gene from the mosquito *Aedes aegypti* and characterization of the upstream regulatory region. *Insect Molecular Biology*. 2: 7- 12.

Barret AJ, Rawlings ND, O'Brien EA. 2001. The MEROPS database as a protease information system. J Struct Biol. 134: 95-102.

Bieth JG. 1980. Pathophysiological interpretation of kinetic constants of protease inhibitors. Bull Eur Physiopathol Respir 16: 183-97.

Billingsley, P. F. 1990. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. Annu. Rev. Entomol. 35: 219–248.

Bode W, Huber R. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Euro J. Biochem.* 204(2): 433-52.

Blum H, Beier H, Gross HJ. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Eletrophoresis.* 8: 93-99.

Carlini CR, Grossi-De-Sá MF. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon.* 40: 1515-1539.

Carvalho AFU, Melo VMM, Craveiro AA, Machado MI, Bantim MB, Rabelo EF. Larvicidal activity of the Essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* linn. Short communication. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz.* 2003; 98(4): 569-571.

Christophers SR. 1960. *Aedes Aegypti: Yellow Fever Mosquito, Its Life History, Bionomics and Structure.* Cambridge University Press, New York, p. 399.

Ciccía G, Coussio J, Mongelli E. 2000. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. *Jornal of Ethnopharmacology* 72: 185–189.

Consoli RAGB e Lourenço-de-Oliveira RL. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994. 228p

Corbet PS e Smith SM. 1974. Diel periodicities of landing of nulliparous and parous *Aedes aegypti* (L.) at Dar es Salaam, Tanzania (Diptera, Culicidae). Bull. Entomol. 64: 111-121.

Craik CS, Largman C, Fletcher T, Roczniak S, Barr PJ, Fletterick R, Rutter WJ. 1985. Redesigning trypsin: alteration of substrate specificity. Science 228: 291-7.

Cuatrecasas P. 1970. Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. J Biol Chem. 245(12):3059-65.

Daly HV, Doyen JT, Purcell III AH. Introduction to Insect Biology and Diversity. 2nd ed. Oxford University Press, Oxford. 1998.

Edman P. 1949. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. Arch Biochem. 22(3):475.

Fairlie DP, Tyndall JD, Reid RC, Wong AK, Abbenant G, Scanlon MJ, March DR, Bergman DA, Chai CL, Burkett BA. 2000. Conformational selection of inhibitors and substrates by proteolytic enzymes: implications for drug design and polypeptide processing. J Med Chem. 43(7):1271-81.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – FUNASA. Reunião técnica para discutir *status* de resistência de *Aedes aegypti* e definir estratégias a serem implantadas para monitoramento da resistência no Brasil. Brasília, Brasil. 1999.

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 Biochem.* 19, 129-137.

Gimnig JE, Ombok M, Otieno S, Kaufman MG, Vulule JM, Walker ED. 2002. Density-dependent development of *Anopheles gambiae*(Díptera:Culicidae) larvae in artificial habitats. *J. Med. Entomol.* 39:162-172.

Henrick CA, Staal, GB, Siddall, JB. 1973. Alkul 3,7,11-trimethyl-2-4dodecadienoates, a new class of potent insect growth regulators with juvenile hormone activity. *J. Agric. Food Chem.* 21(3):354-359.

Isoe J, Zamora J, Miesfeld RL. 2009. Molecular analysis of the *Aedes aegypti* carboxypeptidase gene family. *Insect Biochem Mol Biol* 39: 68-73.

Imler JL, Hoffmann JA. 2000. Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Current Opinion in Microbiology.* 3(1): 16-22. Review.

Iwanaga S. 1993. The limulus clotting reaction. *Curr Opin Immunol.* 5(1): 74-82. Review.

Jiang Q, Hall M, Noriega FG, Wells M. 1997. cDNA cloning and pattern of expression of an adult, female-specific chymotrypsin from *Aedes aegypti* midgut. *Insect Biochem Mol Biol* 27: 283-9.

Kanost MR. 1999. Serine protease inhibitors in arthropod immunity. Dev. Comp. Immunology. 23:291-301.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685

Lam W, Coast GM, Rayne RC. 2000. Characterisation of multiple trypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. Insect Biochem Mol Biol. 30: 85-94.

Laskowski M, Qasim MA. 2000. What can the structures of enzymes-inhibitors complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? Biochimia Biophysica Acta. 1477: 324-337.

Lima JBP, Cunha MC, Silva RC, Galardo AK, Soares SS, Braga IA, Ramos LP, Valle D 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the states of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 68: 329-333.

Lopes AR e Terra WR. 2003. Purification, properties and substrate specificity of a digestive trypsin from *Periplaneta americana* (Dictyoptera) adults. Insect Biochem Mol Biol. 33: 407-15.

Lu SJ, Pennington JE, Stonehouse AR, Mobula MM, Wells MA. 2006. Reevaluation of the role of early trypsin activity in the transcriptional activation of the late trypsin gene in the mosquito *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol. 36: 336-43.

Maillard M, Marston A, Hostettmann K. Search for molluscicidal and larvicidal agents from plants. In: Balandrin, M. (Ed.), Human Medicinal Agents From Plants. American Chemical Society, Washington DC.1993.

Matheson R. Medical entomology. 1st edition. USA: Charles & Thomas. 1932. 489p.

Matsumoto I, Emori Y, Abe K, Arai S. 1997. Characterization of a gene family encoding cysteine proteinases of *Sitophilus zeamais* (maize weevil), and analysis of the protein distribution in various tissues including alimentary tract and germ cells. J Biochem. 121(3): 464-76.

Mendonça FA, Silva KFS, Santos KK, Ribeiro Júnior KAL, Sant'ana AEG. 2005. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. Fitoterapia. 76: 629-636.

Merritt RW, Dadd RH, Walker ED. 1992. Feeding behavior, natural food and nutritional relationships of larval mosquitoes. Annu. Rev. Entomol. 37: 349-376.

Michigan Mosquito Control Association (MMCA). Michigan Mosquito Manual. 2002.

Miller N e Lehane MJ. 1993. Peritrophic membranes, cell surface molecules and parasite tropisms within arthropod vectors. Parasitology today. 9(4): 128.

Miller S, Novak RJ. 1985. Analysis of lipids by gas-liquid chromatography and complementary methods in four strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Comp Biochem Physiol B*. 81(1): 235-40.

Ministério da Saúde Endemias Rurais. Métodos de trabalho adotados pelo DNERu, Departamento Nacional de Endemias Rurais. 1968.

Mira A. 2000. Exuviae eating: a nitrogen meal? *Journal Insect Physiology*. 46:605-610.

Morlais I, Mori A, Schneider JR, Severson DW. 2003. A targeted approach to the identification of candidate genes determining susceptibility to *Plasmodium gallinaceum* in *Aedes aegypti*. *Mol Genet Genomics* 269: 753-64.

Morrison JF. 1969. Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 185: 269-86.

Nasci RS, Miller BR 1996. Culicine mosquitoes and the agents they transmit. In BJ Beaty, WC Marquardt (eds), *The Biology of Disease Vectors*, 1st ed., Colorado University Press, Niwot, CO, p. 85-97.

Nene V *et al.* 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*. 316: 1718-23.

Neurath H. 1999. Proteolytic enzymes, past and future. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(20): 10962-3.

Noriega FG, Wells MA. 1999. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol*. 45(7): 613-620.

Otlewski J, Jaskolski M, Buczek O, Cierpicki T, Czapinska H, Krowarsch D, Smalas AO, Stachowiak D, Szpineta A, Dadlez M. 2001. structure-function relationship of serine protease-protein inhibitor interaction. *Acta Biochim Pol*. 48(2): 419-28. Review.

PAHO/WHO, 2002. In: Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Division of vector-borne infectious diseases. Disponible no site: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/map-ae-aegypti-distribution.htm>

Perera E, Moyano FJ, Diaz M, Perdomo-Morales R, Montero-Alejo V, Alonso E, Carrillo O, Galich GS. 2008. Polymorphism and partial characterization of digestive enzymes in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 150: 247-54.

Perona JJ, Craik CS. 1995. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci*. 4(3):337-60. Review.

Roberts RM, Mathialagan N, Duffy JY, Smith GW. 1995. Regulation and regulatory role of proteinase inhibitors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 5(3-4): 385-436.

Romoser WS *The Biology of Disease Vectors*, University Press of Colorado.1996. 606 pp.

Shahabuddin M, Kaslow DC. 1993. Chitinase: a novel target for blocking parasite transmission? *Parasitol Today*. 9(7):252-5.

Shahabuddin M, Lemos FJ, Kaslow DC, Jacobs-Lorena M. 1996. Antibody-mediated inhibition of *Aedes aegypti* midgut trypsins blocks sporogonic development of *Plasmodium gallinaceum*. *Infect Immun*. 64(3): 739-43.

Schechter I, Berger A. 1967. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*. 27(2):157-62.

Schoepp RJ, Beaty, BJ, Eckels KH. 1990. Dengue 3 virus infection of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. Comparision of parent and progeny candidate vaccine viruses. *Am. Trop. Med. Hyg*. 42(1): 89-96.

Scott GK. 1992. Proteinases and proteinase inhibitors as modulators of animal cell growth. *Comp. Biochem Physiol*. 103B: 785-793.

Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS), 2009.

Disponível no site:
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletimdengue2803.pdf>

Simonet G, Claeys I, Huybrechts J, De Loof A, Vander Broeck J. 2003. Bacterial production and purification of SGPI-1 and SGPI-2, two peptidic serine protease inhibitors from the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Protein Expr Purif*. 31(2):188-96.

Snodgrass RE. 1959. The anatomical life of the mosquito. *Smithsonian Miscellaneous Collections*. 139: 1-87.

Tauil PL. 2002. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 18(3): 867-871.

Terra WR. 1990. Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology* 35:181–200.

Terra WR, Ferreira C. 1994. Insect digestive enzymes: properties compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol*. 1: 1-62.

Thimon V, Belghazi M, Labas V, Dacheux JL, Gatti JL. 2008. One- and two-dimensional SDS-PAGE zymography with quenched fluorogenic substrates provides identification of biological fluid proteases by direct mass spectrometry. *Anal Biochem* 375: 382-4.

Tolle MA. 2009. Mosquito-borne diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 39: 97-140

Twining S. 1994. Regulation of proteolytic activity in tissues. *Current Rev. Biochem Mol. Biol.* 29: 315-383.

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.

Volpicella M, Ceci LR, Cordewener J, America T, Gallerani R, Bode W, Jongsma MA, Beekwilder J. 2003. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. *Eur J Biochem* 270: 10-9.

Von Dungern P, Briegel H. 2001. Protein catabolism in mosquitoes: ureotely and uricotely in larval and imaginal *Aedes aegypti*. *Journal Insect Physiology*. 46: 131-141.

Yang YJ e Davies DM. 1971. Trypsin and chymotrypsin during metamorphosis in *Aedes aegypti* and properties of the chymotrypsin. *J Insect Physiol* 17: 117-31.

World Health Organization. Infectious diseases of potential risk for travellers chapter 5. International travel and health 2008. Disponível na página: http://www.who.int/ith/chapter5_2008.pdf

Zhu YC, Liu X, Maddur AA, Oppert B, Chen MS. 2005. Cloning and characterization of chymotrypsin-and trypsin-like cDNAs from the gut of the Hessian fly *Mayetiola destructor* (Say). *Insect Biochem Mol Biol.* 35(1): 23-32.

9. Anexo I

Manuscrito em processo de submissão:

Tatiane S. Soares, Renata M. O. Watanabe, Francisco J. A. Lemos, Aparecida S. Tanaka. 2009. Molecular studies of trypsin-like enzymes present in midgut of *Aedes aegypti* larvae.

Molecular studies of trypsin-like enzymes present in midgut of *Aedes aegypti* larvae

Tatiane S. Soares^a, Renata M. O. Watanabe^a, Francisco J. A. Lemos^b, Aparecida S. Tanaka^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, UNIFESP-EPM, São Paulo - SP, Brazil.

^b Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro – RJ, Brazil.

*This work was supported by: FAPESP – Proc.05/03514-9 and CNPq Proc. No.575829/2008-7) (Brazil); T.S.S. fellowship was supported by CAPES.

Corresponding author.* Departamento de Bioquímica, UNIFESP-EPM, Rua Três de Maio 100, 04044-020 São Paulo - SP, Brazil; Tel: +55-11-5576-4444; Fax: +55-11-5572-3006; *E-mail:* [tanaka.bioq@epm.br**](mailto:tanaka.bioq@epm.br).

Key words: Mosquito; trypsin; BPTI; larvae; *Aedes*; serine protease inhibitor.

Abbreviations: HiTI- *Haematobia irritans irritans* Trypsin Inhibitor; AaTI- *Aedes aegypti* Trypsin Inhibitor; BPTI- Bovine pancreatic trypsin inhibitor.

Abstract

Aedes aegypti is the most important vector of human arboviral diseases and it is responsible for dengue and urban yellow fever transmissions. Trypsin-like enzymes plays an important role in the *Ae. aegypti* adult and larval life stages digestion. In the present work, we identified the two major trypsin-like enzymes of *Ae. aegypti* larval midgut through the trypsin cDNA library construction. They are AAEL005607 and AAEL006371, with expression frequencies of 29.3% and 20%, respectively. Semi quantitative PCR analysis showed that the AAEL005607 was transcribed in all larval instars, but AAEL006371 appeared only in 3rd and 4th larval instars. In order to confirm the transcription data, trypsin-like enzymes from 4th instar larvae of *Ae. aegypti* midgut were purified by affinity, ionic exchange and reversed-phase chromatographies. Purified trypsin presented molecular weight of 28 kDa by SDS-PAGE. Its partial amino acid sequence allowed us to suggest that the trypsin activity is encoding by AAEL005607 sequence. The purified trypsin (AAEL005607) showed K_m value of 36.4 μ M for tosyl-Gly-Pro-Arg-pNa substrate and was strongly inhibited by AaTI and HiTI, both trypsin inhibitors, with K_i of 0.94 pM and 160 pM, respectively. In conclusion, for the first time, the major digestive enzyme of 4th larval instar of *Ae. aegypti* was identified and characterized.

Introduction

Dengue is now the main reemerging disease in the world, and without an efficacious preventive vaccine and effective etiologic treatment. The chief way for reducing dengue transmission is to control its vector, the mosquito *Aedes aegypti* [1].

Aedes aegypti mosquito is the main vector of arbovirus, the etiologic agent of dengue and yellow fever. The mosquito is well adapted to urban areas, constituting a major public health problem [2]. The incidence of dengue fever has increased tremendously [3], approximately 50 million people are affected by dengue per year and 2.5 billion are living in risk areas [2].

Ae. aegypti genome has about 1376 million base pairs which is about five times bigger than the genome of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. It presents a higher number of trypsin-like enzymes encoding genes [4]. Venancio *et al.* [5] identified 66 putative trypsins in larvae and adults of *Ae. aegypti*, and showed through phylogenetic analysis that trypsin expression in larvae and adult were divergent, possibly as a consequence of blood feeding adaptation.

Trypsin is a serine endopeptidase of the chymotrypsin family, characterized by a catalytic triad formed by Histidine, Aspartate, and Serine, which cleaves peptide bond at the carboxyl side of basic L-amino acids with a preference for Arg over Lys of 2- to 10-fold [6]. Among the serine endopeptidases, trypsin and chymotrypsin are most frequently found as digestive proteases in the midgut of innumerable insect species [7], but trypsins may differ among insect groups [8]. In *Ae. aegypti* digestive enzymes have been identified, including trypsins [9], chymotrypsins [10], aminopeptidases [11] and carboxypeptidases [12]. Trypsin expression persists throughout all developmental instars of *Ae. aegypti* [13], and in the female mosquito, trypsin expression is biphasic, early and late trypsins. Early trypsin synthesis is regulated at the translational level by blood feeding, reaching peak in the 1-6 h post-blood

meal. Late trypsin expression is regulated at the transcriptional level, reaching peak in the 18-24 h post-blood meal. However, the mechanism of the late trypsin gene transcriptional regulation is not completely known [14]. It is believed that the early trypsin activity was responsible for the late trypsin expression [15]. Recently, it was showed that late trypsin expression was not affected either by inhibition of early trypsin or by reduction of its expression [16].

Molecular studies of *Ae. aegypti* life stages, such as identification of genes preferentially expressed in larvae may help in the discovery of candidate targets to develop new insect control procedures [5]. The aim of the present work was the molecular characterization of trypsin-like enzymes present in the *Ae. aegypti* larval midgut.

2. Materials and Methods

2.1. Mosquitoes

Aedes aegypti (Rockefeller strain) colony was maintained at 27°C, in a high humidity chamber. The insects were fed with 10% sucrose solution. Larvae were kept in a glass container filled with water and were fed with a minced commercial mouse food. Gut were dissected in sodium phosphate buffered saline, pH 7.2 (PBS) and maintained at -20°C, according to Moll et al. [17].

2.2. Construction of a small library of *Ae. aegypti* trypsin cDNA fragments from 4th instar larvae

Oligonucleotides were constructed based on the nucleotide sequence alignments (ClustalW) of the 36 trypsins identified in the *Aedes aegypti* genome (tripfwd: 5'-TGACNGCTGCNCACTG-3' and triprev: 5'-CCGGAATCACCCCTGGC-3'). Total RNA extracted of 4th instar of *Aedes* larvae midgut was used in a standard RT-PCR to generate the

cDNA first strand using Improm-IITM Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA). A PCR was performed and the resulting fragments were purified using the QIAEX II gel extraction system according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). Purified DNA fragments were ligated into the pGEM-T easy vector (Promega, Madison, USA) using 1U of DNA ligase during 18 h at 16°C. The ligation was used for *E. coli* DH5- α strain transformation by electroporation (parameters: 2.5 Kv, 200 Ω , 25 μ F). Transformed bacterias were selected on LB-agar plate containing ampicillin (200 μ g/mL). Positive clones were submitted to automatic nucleotide sequencing using DyenamicTM ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) in a Sequencer model 377 (Applied Biosystems, CA, USA). The nucleotide sequences were analyzed by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program.

2.3. Semi quantitative PCR of *Aedes aegypti* trypsin expression in different life stages

Total RNA extracted from 1st, 2nd, 3rd and 4th instar larvae, pupa and adult after 3 h and 24 h of blood feeding were used in a standard RT-PCR to generate the cDNA first strand with Improm-IITM Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA). Specific oligonucleotides were constructed based on the trypsin nucleotide sequences with access numbers AAEL005607 (AAEL5607fwd 5'CCCGCTCGAGAAAAGAGGTCCCGAAGAGGACCTCTGG3' and AAEL5607rev 5'TTTCCTTTTGCGGCCGCTTACACCCCGGTGTTGGAGCT3'); and for AAEL006371 (AAEL006371fwd 5'CCCGCTCGAGAAAAGACAGCCTTTCAACGGAACGGT3' and AAEL6371rev 5'TTTCCTTTTGCGGCCGCTCAAACAAGGTGGTTCCTAAA3'). The following oligonucleotides for *Aedes aegypti* ribosomal protein sequence (RP49), 5aexpRP 5'GCTATGACAAGCTTGCCCCCA3' and 3aequaRP1b 5'TCATCAGCACCTCCAGCTC3' were used for cDNA control. Using these oligonucleotides and the cDNA from

different life stages, a PCR was performed and the amplified DNA fragments were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis.

2.4. Purification of *Aedes aegypti* trypsin from 4th instar larvae

The dissected midguts from 4th instar *Aedes aegypti* larvae were homogenized in 0.05 M sodium acetate buffer pH 5.5 (1 midgut : 5 μ L). The homogenate was centrifuged at 12,000 $\times g$ for 10 min at 4°C. The supernatant was applied to a BPTI–Sepharose column previously equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0. The fractions eluted with 0.5 M KCl pH 2.0 containing proteolytic activity were pooled. Following, the material was applied to a resource S column connected to an AKTA purifier system, previously equilibrated with 0.05 M sodium acetate buffer pH 5.5. The proteins were eluted by a linear NaCl gradient (0 – 1 M), with flow rate of 1 mL/min for 60 min. The fractions containing unbound proteins were pooled and applied in a C₁₈ Sephasil column connected to an AKTA Purifier System, pre-equilibrated in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), the proteins were eluted with a linear acetonitrile gradient (0 - 90%), with flow rate of 1 mL/min for 60 min.

2.5. SDS–polyacrylamide gel electrophoresis

Aedes aegypti purified trypsin by ionic exchange and reverse phase chromatographies were analyzed by SDS–PAGE. The protein was separated in a 12% acrylamide gel in Tris–glycine buffer according to Laemmli [18]. The gel was stained with silver solution [19].

2.6. N-terminal amino acid sequencing

N-terminal amino acid determination of the *Ae. aegypti* purified trypsin was realized by Edman degradation [20] using a PPSQ-23 Model Protein Sequencer (Shimadzu, Tokyo, Japan).

2.7. Dissociation constant (K_i) determination

The equilibrium dissociation constants of different serine protease inhibitors (HiTI, AaTI, BPTI) for purified *Ae. aegypti* trypsin were determined according to Bieth [21]. The residual enzyme activity was measured after addition of a chromogenic substrate, tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA. Apparent K_i values were calculated by fitting the steady-state velocities to the equation for tight-binding inhibitor using a nonlinear regression analysis [22].

2.8. *Michaelis Menten* constant (K_m) determination

The *Michaelis Menten* constant (K_m) of *Ae. aegypti* purified trypsin for tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA, a chromogenic substrate, was determined. The purified trypsin was incubated with different concentrations of substrates: 0.05 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.4 mM, 0.8 mM and 1 mM. The velocities and K_m values were determined by linear regression using the Grafit program.

2.9. Zymography

Zymography was performed in a SDS-PAGE (12%) containing 0.3% of gelatin according to the method described by Hanspal *et al.* [23]. The following extracts were applied: 17 μ L 1st instar larvae; 9.6 μ L 2nd instar larvae; 2.7 μ L 3rd instar larvae midgut; 1 μ L 4th instar larvae midgut; 1 μ L female midgut, 3 h after feeding; 1 μ L female midgut, 24 h after feeding. In the zymography in the presence of inhibitors it was applied 0.5 μ L midgut extract with: 0.5 μ L of methanol; 10 mM APMSF; 10 mM E64; 10 mM EDTA. The marker used was Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad). The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R250 solution.

3. Results and discussion

3.1. Small library of *Ae. aegypti* trypsin cDNA fragments from fourth instar larvae

Although there are a number of studies dealing with functional aspects of trypsin-like enzymes present in midgut of *Ae. aegypti* larvae [13], our understanding of these enzymes at the protein level has been extremely limited.

Recently, Venancio *et al.* [5] examined 66 putative trypsins annotated in the *Aedes aegypti* genome, among them, there were serine protease, oviductin, lumbrakinase 3, elastase, proacrosin and clip domain serine proteases. In attempt to better understand the trypsin-like enzymes present in the *Ae. aegypti* larval midgut we constructed a small library of *Ae. aegypti* trypsin DNA fragments of 4th instar larvae. Our first strategy was the alignment of 36 trypsin nucleotide sequences present in the *Ae. aegypti* genome (Fig. 1). Degenerated oligonucleotides were constructed and used in a PCR to identify which trypsins were expressed in this larval stage. Two major bands amplified, with approximately 380 bp (Fig 2A), were purified, ligated into pGEM-T easy vector and used to transform *E. coli* DH5- α strain. Randomly, 100 isolated clones were selected and sequenced. Among them, 75 clones revealed suitable sequences that were analyzed by Blast program. Only four trypsin-like enzymes were identified, AAEL005607, AAEL006371, AAEL008097 and AAEL005609 in the *Ae. aegypti* genome, representing 29.3%, 20%, 6.6% and 1.3%, respectively (Table 1). Surprisingly, both major *Ae. aegypti* larval trypsin-like enzymes which are similar to trypsin and oviductin, respectively, were not found by Venancio *et al.* [5]. Our explanation is that the authors used a mixture of larvae e adults which may difficult the detection of trypsin with different expression levels, favor the detection of enzymes with high expression levels.

3.2. Presence of trypsin transcripts in different mosquito life stages

Trypsin-like enzymes identified as AAEL005607 and AAEL006371 expression levels were analyzed by semi quantitative PCR experiments, during the *Ae. aegypti* development stages. The trypsin AAEL005607 was transcribed in all larval instars, with an increasing expression along the larval development, but its transcription was not detected in pupae and adult mosquito (Fig 2B), confirming it as an exclusively larval enzyme in the experimental condition used. Our results allowed us to suggest that trypsin AAEL005607 is the main digestive enzyme of *Ae. aegypti* larvae. In contrast, the trypsin AAEL006371 was detected only in 3rd and 4th larval instars but appeared also in the pupae, adult 3 h and 24 h after feeding. The AAEL006371 transcription seems to be lower than the AAEL005607, mainly in the older larval stage (Fig. 2B).

3.3. Purification and characterization of native trypsin from 4th instar *Aedes aegypti* larval midgut

Zymography and reverse zymography are convenient methods widely used to detect proteolytic activity of enzymes and the inhibitory effect of protease inhibitors in polyacrylamide gels, respectively [24]. In this work, zimography was performed using crude extract of *Ae. aegypti* in different life stages to confirm the transcription data and not much difference was noted in the proteolytic activity bands through the larval development, only that the concentration seems to be increasing during the larval development (Fig. 3A and 3C), corroborating Yang and Davies results that showed differences in the trypsin enzymatic activity throughout the larval development. Recently, Perera *et al* [25] used a combination of biochemical assays and zymography to characterize digestive enzymes of lobster *Panulirus argus*, and showed strong inhibition effects to its enzymes by SBTI and PMSF, proving the prevalence of serine endopeptidases in this arthropod. In attempt to confirm the presence of

serine endopeptidases, the 4th instar midgut extract was incubated with specific inhibitors for serine proteases, cysteine proteases and metallo proteases, respectively (Fig. 3B). Our results showed that almost all proteolytic activity present in midgut of 4th instar were inhibited by APMSF, confirming the presence of serine endopeptidases which corroborates findings of other insect digestion enzymes [7]. Most of the proteolytic activity present in the fourth instar *Ae. aegypti* midgut was inhibited by BPTI (data not shown). So, in order to concentrate the enzymes, the first step of purification was an affinity chromatography in a BPTI-Sepharose column. The proteolytic activity fractions were confirmed by hydrolysis of tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA (Fig 4A), and were pooled. The enzymatic activity was further purified in an ion exchange chromatography using a Resource S column connected to an AKTA purifier system (Fig 4B) the major proteolytic activity was observed in flow-through fractions (Fig 4B). In attempt to obtain a pure enzyme, the material from Resource S column was applied to a reverse phase chromatography in a C₈ Sephasil column (Fig. 4C). *Ae. aegypti* trypsin was completely purified by this methodology, presenting a protein band of 28 kDa by SDS-PAGE, which was in agreement to other insect trypsin molecular mass, 20,000 to 35,000 Da [7]. The partial amino-terminal sequence of purified trypsin, 10 residues, IVGGNEVSIA, for two peaks from the same chromatography (Fig. 4C), showed complete identity to the following trypsin sequences AAEL005607, AAEL005614 and AAEL005609 from *Ae. aegypti* genome. These three tryptins display structural similarities, as shown in Figure 4D. Taking all together, we can suggest that trypsin AAEL005607 is the major digestive enzyme in the *Ae. aegypti* 4th instar larvae comparing transcription and partial amino acid sequence, but we cannot discard that one of the protein peaks from reverse phase chromatography is the protein corresponding to the gene AAEL005609 product. The amino acid sequences of AAEL005607 and AAEL005609 differ only at position 54, which was not possible to confirm because of the lack of material. Finally, to characterize this *Aedes* larval trypsin, the partial purified trypsin

from ion exchange chromatography was used in kinetic assays, and presented low K_m value of 36.4 μM for tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA, a chromogenic substrate well hydrolyzed by bovine trypsin [26]. Partial purified trypsin was strong inhibited by two trypsin inhibitors, AaTI (manuscript in preparation) and HiTI [27] presenting K_i values of 0.95 and 160.00 μM , respectively (Table 2). AaTI is a trypsin and thrombin inhibitor presents in *Ae. aegypti* salivary glands and midgut. Due to its high specificity for *Ae. aegypti* trypsins, we can suggest that AaTI play a role in the mosquito endogenous trypsin control, which may be accidentally leakage from the midgut. Even though, the *Ae. aegypti* trypsins purification was done in a BPTI-Sepharose, it was not possible to determine its K_i value, whereas it seems that the inhibition was not strong or that the inhibition mechanisms is not slow tight binding [22].

In conclusion, for the first time, trypsins from larval stage of *Aedes aegypti* were purified, characterized and their expression profiles along the mosquito development determined.

Acknowledgments

We thank Dr. Izaura Y. Hirata from the Department of Biophysics, UNIFESP, for performing the amino acid sequencing and Renan O. Clara for linguistic corrections of the manuscript. This work was supported by grants from FAPESP (Proc. No. 05/03514-9) and CNPq (470070/2004-8; 575829/2008-7). T.S. Soares was supported by CAPES.

References

- [1] P.L. Taail, [Critical aspects of dengue control in Brazil]. *Cad Saude Publica* 18 (2002) 867-71.
- [2] J.S. Mackenzie, D.J. Gubler, and L.R. Petersen, Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* 10 (2004) S98-109.
- [3] S. Halstead, Global perspective on dengue research. *Dengue Bulletin* 24 (2000) 77-82.
- [4] V. Nene, J.R. Wortman, D. Lawson, B. Haas, C. Kodira, Z.J. Tu, B. Loftus, Z. Xi, K. Megy, M. Grabherr, Q. Ren, E.M. Zdobnov, N.F. Lobo, K.S. Campbell, S.E. Brown, M.F. Bonaldo, J. Zhu, S.P. Sinkins, D.G. Hogenkamp, P. Amedeo, P. Arensburger, P.W. Atkinson, S. Bidwell, J. Biedler, E. Birney, R.V. Bruggner, J. Costas, M.R. Coy, J. Crabtree, M. Crawford, B. Debruyne, D. Decaprio, K. Eiglmeier, E. Eisenstadt, H. El-Dorri, W.M. Gelbart, S.L. Gomes, M. Hammond, L.I. Hannick, J.R. Hogan, M.H. Holmes, D. Jaffe, J.S. Johnston, R.C. Kennedy, H. Koo, S. Kravitz, E.V. Kriventseva, D. Kulp, K. Labutti, E. Lee, S. Li, D.D. Lovin, C. Mao, E. Mauceli, C.F. Menck, J.R. Miller, P. Montgomery, A. Mori, A.L. Nascimento, H.F. Naveira, C. Nusbaum, S. O'Leary, J. Orvis, M. Pertea, H. Quesneville, K.R. Reidenbach, Y.H. Rogers, C.W. Roth, J.R. Schneider, M. Schatz, M. Shumway, M. Stanke, E.O. Stinson, J.M. Tubio, J.P. Vanzee, S. Verjovski-Almeida, D. Werner, O. White, S. Wyder, Q. Zeng, Q. Zhao, Y. Zhao, C.A. Hill, A.S. Raikhel, M.B. Soares, D.L. Knudson, N.H. Lee, J. Galagan, S.L. Salzberg, I.T. Paulsen, G. Dimopoulos, F.H. Collins, B. Birren, C.M. Fraser-Liggett, and D.W. Severson, Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* 316 (2007) 1718-23.
- [5] T.M. Venancio, P.T. Cristofaletti, C. Ferreira, S. Verjovski-Almeida, and W.R. Terra, The *Aedes aegypti* larval transcriptome: a comparative perspective with emphasis on trypsins and the domain structure of peritrophins. *Insect Mol Biol* 18 (2009) 33-44.
- [6] C.S. Craik, C. Largman, T. Fletcher, S. Roczniak, P.J. Barr, R. Fletterick, and W.J. Rutter, Redesigning trypsin: alteration of substrate specificity. *Science* 228 (1985) 291-7.
- [7] W.R. Terra, and C. Ferreira, Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 109 (1994) 1-62.
- [8] A.R. Lopes, and W.R. Terra, Purification, properties and substrate specificity of a digestive trypsin from *Periplaneta americana* (Dictyoptera) adults. *Insect Biochem Mol Biol* 33 (2003) 407-15.

- [9] C. Barillas-Mury, and M.A. Wells, 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* 2 (1993) 7-12.
- [10] Q. Jiang, M. Hall, F.G. Noriega, and M. Wells, cDNA cloning and pattern of expression of an adult, female-specific chymotrypsin from *Aedes aegypti* midgut. *Insect Biochem Mol Biol* 27 (1997) 283-9.
- [11] I. Morlais, A. Mori, J.R. Schneider, and D.W. Severson, A targeted approach to the identification of candidate genes determining susceptibility to *Plasmodium gallinaceum* in *Aedes aegypti*. *Mol Genet Genomics* 269 (2003) 753-64.
- [12] J. Isoe, J. Zamora, and R.L. Miesfeld, Molecular analysis of the *Aedes aegypti* carboxypeptidase gene family. *Insect Biochem Mol Biol* 39 (2009) 68-73.
- [13] Y.J. Yang, and D.M. Davies, Trypsin and chymotrypsin during metamorphosis in *Aedes aegypti* and properties of the chymotrypsin. *J Insect Physiol* 17 (1971) 117-31.
- [14] F.G. Noriega, and M.A. Wells, A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol* 45 (1999) 613-620.
- [15] C.V. Barillas-Mury, F.G. Noriega, and M.A. Wells, Early trypsin activity is part of the signal transduction system that activates transcription of the late trypsin gene in the midgut of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 25 (1995) 241-6.
- [16] S.J. Lu, J.E. Pennington, A.R. Stonehouse, M.M. Mobula, and M.A. Wells, Reevaluation of the role of early trypsin activity in the transcriptional activation of the late trypsin gene in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 36 (2006) 336-43.
- [17] R.M. Moll, W.S. Romoser, M.C. Modrzakowski, A.C. Moncayo, and K. Lerdthusnee, Meconial peritrophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera: Culicidae) metamorphosis. *J Med Entomol* 38 (2001) 29-32.
- [18] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-5.
- [19] H. Blum, H. Beier, and H.J. Gross, Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8 (1987) 93-99.
- [20] P. Edman, and G. Begg, A protein sequenator. *Eur J Biochem* 1 (1967) 80-91.
- [21] J.G. Bieth, Pathophysiological interpretation of kinetic constants of protease inhibitors. *Bull Eur Physiopathol Respir* 16 Suppl (1980) 183-97.
- [22] J.F. Morrison, Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 185 (1969) 269-86.

- [23] J.S. Hanspal, G.R. Bushell, and P. Ghosh, Detection of protease inhibitors using substrate-containing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 132 (1983) 288-93.
- [24] V. Thimon, M. Belghazi, V. Labas, J.L. Dacheux, and J.L. Gatti, One- and two-dimensional SDS-PAGE zymography with quenched fluorogenic substrates provides identification of biological fluid proteases by direct mass spectrometry. *Anal Biochem* 375 (2008) 382-4.
- [25] E. Perera, F.J. Moyano, M. Diaz, R. Perdomo-Morales, V. Montero-Alejo, E. Alonso, O. Carrillo, and G.S. Galich, Polymorphism and partial characterization of digestive enzymes in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 150 (2008) 247-54.
- [26] B. Asgeirsson, and P. Cekan, Microscopic rate-constants for substrate binding and acylation in cold-adaptation of trypsin I from Atlantic cod. *FEBS Lett* 580 (2006) 4639-44.
- [27] S.S. Azzolini, S.D. Sasaki, I.T. Campos, R. J. S. Torquato, M.A. Juliano, and A.S. Tanaka, The role of HiTI, a serine protease inhibitor from *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae) in the control of fly and bacterial proteases. *Exp Parasitol* 111 (2005) 30-6.

Figure Legends:

Fig.1. *Aedes aegypti* trypsin like enzymes analysis. Alignment of nucleotide sequences of the 36 trypsins from the *Ae. aegypti* genome. Degenerated oligonucleotides constructed based on this alignment were used to amplify an internal region of trypsin genes transcript in the 4th instar of *Ae. aegypti* larvae. The nucleotide sequences inside the box were the regions used to construct the degenerated oligonucleotides. Asterisks indicate the identity of the bases. The three bars represent parts that were not shown in the nucleotide sequences.

Fig.2. Amplification of trypsin-like enzymes DNA fragments by PCR. (A) 1. Agarose gel (1%) of PCR products for internal region of the *Aedes aegypti* trypsins using 4th instar larvae midgut cDNA 2. DNA fragment markers. (B) Semi quantitative PCR for two trypsin-like enzymes expression in the *Ae. aegypti* different life stages. 1. 1st instar larvae; 2. 2nd instar larvae; 3. 3rd instar larvae; 4. 4th instar larvae; 5. pupa; 6. adult after 3 h blood feeding; 7 adult after 24 h blood feeding. Oligonucleotides for *Ae. aegypti* ribosomal protein (RP49) were used as control.

Fig. 3. Proteolytic activity of midgut extract. (A) Zimography (12%) of proteolytic activities present in *Ae. aegypti* larva and adult extracts; 1. 1st instar larvae; 2. 2nd instar larvae; 3. 3rd instar larvae midgut; 4. 4th instar larvae midgut; 5. female midgut, 3 h after feeding; 6. female midgut, 24 h after feeding. (B) Zimography (12%) using 4th instar larvae midgut extract with different inhibitors. 1. midgut; 2. midgut with methanol; 3. Marker Kaleidoscope Prestained Standards; 4. midgut with APMSF; 5. midgut with E64; 6. midgut with EDTA. (C) Enzymatic activity in different larval instars using tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA (0.2 mM).

Fig. 4. Purification and characterization of a trypsin-like enzyme from 4th instar of *Ae. aegypti* larvae midgut. (A). Midgut extract was applied on a BPTI-Sepharose column, the bound protein was eluted with 0.5 M KCl solution pH 2.0. The proteolytic activity was monitored with tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA. (B) Active material from BPTI-Sepharose was applied to a Resource S column. Proteins were eluted with a NaCl linear gradient (0–1 M). (C) Purified trypsin by ion exchange chromatography was applied to a C₈ Sephasil column and the protein eluted with an acetonitrile linear gradient (0–90%). The purified trypsin was submitted to N-terminal amino acid sequencing. (D) SDS–PAGE (12%). 1. Active material after ion exchange chromatography. 2. Purified trypsin after reverse phase chromatography. The bars in the chromatographies peaks represent the fractions containing activities. (E) ClustalW alignment of trypsin-like enzymes amino acid sequences with high similarity from *Ae. aegypti* identified by amino acid sequencing of the N-terminal region. The asterisks represent the basis in common among the sequences.

Table 1. Amino acid sequences of hypothetical trypsin-like enzymes identified in the *Ae. aegypti* 4th instar larvae midgut.

Access n ^o *	Amino acid sequence	Frequency (%) **
AAEL005607	IVGGNEVSIAFPYQLSLRHNGNHICGASVISSNWALSAAHCTVAPVSA	29.3
	GSATLRGGSSSRLTGGVIFAVAQIVNHPQYNANTINNDVSVLRSTTSFA	
	GANISPITIVPSGTNFAAGTRSVVSGWGLTTPGGSLPTNLRAVDIPVVT	
	LATCRNQWGAARITDSMVCAGEPGRDSCNGDSGGPLVTGGRQFGIVSWG	
	ATQCGGNLAGVYANIGAAVIRNFISSNTGV	
AAEL006371	IIGGTPATLGEFPSKVSQTQNSAHFCGGTLLTLRHVLTAAHCITDIQ	20
	GVPMSVSRIQAMADDLNLVLPKMGSAQRQVRQVKSNIHDKYNPSTLAND	
	LAIVSLEKEFTKTNTLYPSKRASSAPPPGQLCALAGWGVTAENSQSISP	
	SLQRVNLEVISFEHCNTAYQGALVKGMMCASAPGRDACQGDSCGALICQ	
	NRVAGVVSFGSGCAHPTFPGVYMDITHYEKWIGKALNGVDSLVGGSMT	
AAEL008097	IVGGFPASQQATVHQVSIRVKSNDLKAFGSGHICGGSLINNRTVLTAAH	6.6
	CLVDSSNRKRSADYFRVVGSLNRTVTSNTILDVSQVVIHQRYNPVNF	
	DNDVGLLILSSIVSANHATLRPINMAATKPNPGVLCQTSWGTPIFGEP	
	IKTSVLMAVNVTVPTEICNGTSSYNGFIKNGMFCAGDVQGYRDACQGD	
	SGGPLVCNGQLAGIVSNGKDCGLAAYPGIYADVAYYRGWILTNGAGQRT	
AAEL005609	IVGGNEVSIAFPYQLSLRHNGNHICGASVISSNWALSAAHCTVSPVTA	1.3
	GSATLRGGSANRLSGGVIFAVAQIVNHPQYNSNNLNNDVSVLRSTTSFS	
	GANISPITLVPSGTNFAAGTRSVVSGWGLTTPGGSLPTTLRAVDIPVVA	
	IATCRSQWGAAGITDNMVCAGEPGRDSCNGDSGGPLVTGGRQFGIVSWG	
	ATQCGGPLAGVYANVGAASVRNFISSNTGV	

*Access number from *Ae. aegypti* genome data.

**Frequency of each sequence in a random screening of a small DNA fragment library.

Table 2. Dissociation constants (K_i) for purified native trypsin from *Ae. aegypti* larvae of different serine protease inhibitors.

Inhibitor	K _i (nM)
AaTI	0.009
HiTI	0.160
BPTI	17.500*

* IC₅₀ – Inhibitor concentration which inhibits 50% of purified trypsin-like activity.

Fig 1

AAEL005614	252	TGTCCGCTGCTCACTGTACCGTTGCTCCAGTTT-----CCGCTGG	///	TTGCAACGGAGATAGCGG	644
AAEL005607	250	TGTCCGCTGCTCACTGTACCGTTGCTCCAGTTT-----CCGCTGG	///	TTGCAACGGAGATAGCGG	642
AAEL005609	250	TGTCCGCTGCTCACTGTACCGTATCTCCAGTTA-----CCGCTGG	///	CTGCAACGGAGATAGCGG	642
AAEL005603	244	TGTCCGCTGCTCACTGTACCGTTGCTCCAGTTA-----CTGTGAA	///	TTGCAATACTGACAGTGG	636
AAEL005611	261	TTTCGGCCGCTCACTGTACTCATCCATTGCCAA-----ACGTTGC	///	TTGCAATGGTGATAGCGG	653
AAEL005616	281	TCACCGCAGCACATTGTGTCTTCCCTCAACGCG-----AGCTTCG	///	GTGCAACGGAGACAGTGG	673
AAEL012852	250	TAACCGCTGCCCCTGCGCC---CTACTACCG-----CTAAGCCA	///	CTGCCAGGGTGACTCCGG	648
AAEL007818	247	TGACAGCAGCTCACTGCACCA---CGAATACAG-----ATCCTGCG	///	TTGCCAGGGGAGACTCCGG	648
AAEL013713	223	TGACCGCTGGTCACTGTGCCA---GCCCTAGAG-----AC---CAT	///	TTGCCAGGGTGATTCCGG	621
AAEL010202	234	TGACCGCTGGTCACTGTGCCA---GCCCTAGAG-----AC---CAT	///	TTGCCAGGGTGATTCCGG	632
AAEL013712	246	TGACTGCTGGCCACTGTGCAG---CTTCTGGTC-----AA---ACA	///	TTGCCAGGGTGATTCCGG	644
AAEL010203	229	TGACTGCTGGACACTGTGCAT---TCTCTGGGC-----AA---ACA	///	TTGCCAGGGTGATTCCGG	627
AAEL010195	229	TGACTGCTGGACATTGTGCAT---CCTCTGGTC-----AA---ACA	///	TTGCCAGGGTGATTCCGG	609
AAEL010196	244	TGACTGCTGGCCACTGTGCGG---CTTCTGGCC-----AA---CCA	///	TTGCCAGGGTGATTCCGG	642
AAEL013715	243	TGACGGCTGGGCATTGTGCCG---GTAGCAGCG-----AAGATCCA	///	TTGCCAGGGGAGATTCCGG	644
AAEL013707	232	TGACGGCTGCGCATTGTGCCG---CTACTAGCG-----AAGATCCA	///	TTGCCAGGGGAGATTCCGG	633
AAEL007601	260	TGACAGCTGCGCATTGTGCCT---CCAGTAGCG-----AAGATCCA	///	TTGCCAGGGGAGATTCCGG	661
AAEL004996	247	TAACGGCAGCCCCTGCTACTAAAGGAATTACCA-----ATGCATCG	///	CTGTCAGGGTGACTCCGG	648
AAEL011549	217	TGACCGCAGCCCCTGCTATAGAAGAGGGAACATA-----	///	CTGCCAGGGTGACTCCGG	615
AAEL005689	178	TGACCGCAGCCCCTGCTATAGAAGAGGGAACATA-----	///	CTGCCAGGGTGACTCCGG	576
AAEL013703	253	TGACGGCAGCTCATTGTATTGGAGATCCAACCA-----GT---ACG	///	GTGCAACGAAGACTCCGG	657
AAEL006425	267	TGACGGCAGCACATTGTACGG---ATGGAGCAT-----CCGCGTCG	///	CTGCCAGGGGAGATTCTGG	668
AAEL006903	208	TAACGGCAGCGCATTGTACCG---ATGACACAA-----TCCCACGC	///	GTGTCAAGGCGATTTCAGG	597
AAEL013623	310	TGACGGCTGCCCCTGCTGGTGAACGAGGAGG-----CGAGCTACTTCC	///	TTGCCAGGGTGATTCCGG	720
AAEL008093	217	TGACGGCTGCCCCTGCTGGTGAACGAGGAGG-----CGAGCTACTTCC	///	TTGCCAGGGTGATTCCGG	627
AAEL008085	245	TGACGGCTGCCCTCTGCTGGTGAACGAGGAGGGCAAGCGTCGTGTTGCGAGCTACTTCC	///	TTGCCAGGGTGATTCCGG	670
AAEL006429	196	TAACGGCTGCGCATTGCTGGTAGGTGAAACTC-----CAGAC	///	TTGCCAAGGTGACTCGGG	588
AAEL006427	196	TTACGGCTGCGCATTGCTTAGTCGGTGAAACGC-----CAGAC	///	TTGCCAAGGTGACTCGGG	588
AAEL006430	190	TGACGGCAGGTCACCTGCGTGTGGGATAAAAAGC-----CTGCC	///	ATGCCAAGGAGATTTCAGG	585
AAEL006414	178	--ACGGCAGCCCATTGCGTTTATCATAGAAAAC-----CTTCT	///	CTGCCAAGGAGATTTCGGG	576
AAEL015638	319	TTTCAGCGGGCCCATTGCTTCAGGTCATGGTTCAACAACC-----CGCGGTACTTCA	///	GTGCAGTGGAGATTTCGGG	729
AAEL001234	223	TTTCGGCGGGCCCATTGCTTCAGGTCATGGTTCAATAACC-----CGCGGTACTTCA	///	GTGCAGTGGAGATTTCGGG	633
AAEL000190	259	TGACGGCAGCACATTGCTTGGTGGCCGAAACAA-----CCGAT	///	TTGCAAGGGTGATTTCGGG	651
AAEL006371	769	TGACGGCAGCGCACTGCATTACCGATATTCAAGGGGTTCCGATGAGCGTTTCTCGGATCC	///	CTGTCAGGGTGATTTCGGG	1185
AAEL011553	205	TGACAGCGGGCCCATTGCGTATACTACACAAATG-----TAGAACCTACC	///	CTGCCAGGGGAGATTTCGGG	606
AAEL006418	220	TAACGGCTGCACACTGTTTCTATGGCCACGAAG-----CGATTATGAA	///	CTGCGTCGGTGATTTCGGG	645

* * * * *

* * * * *

Fig 2.

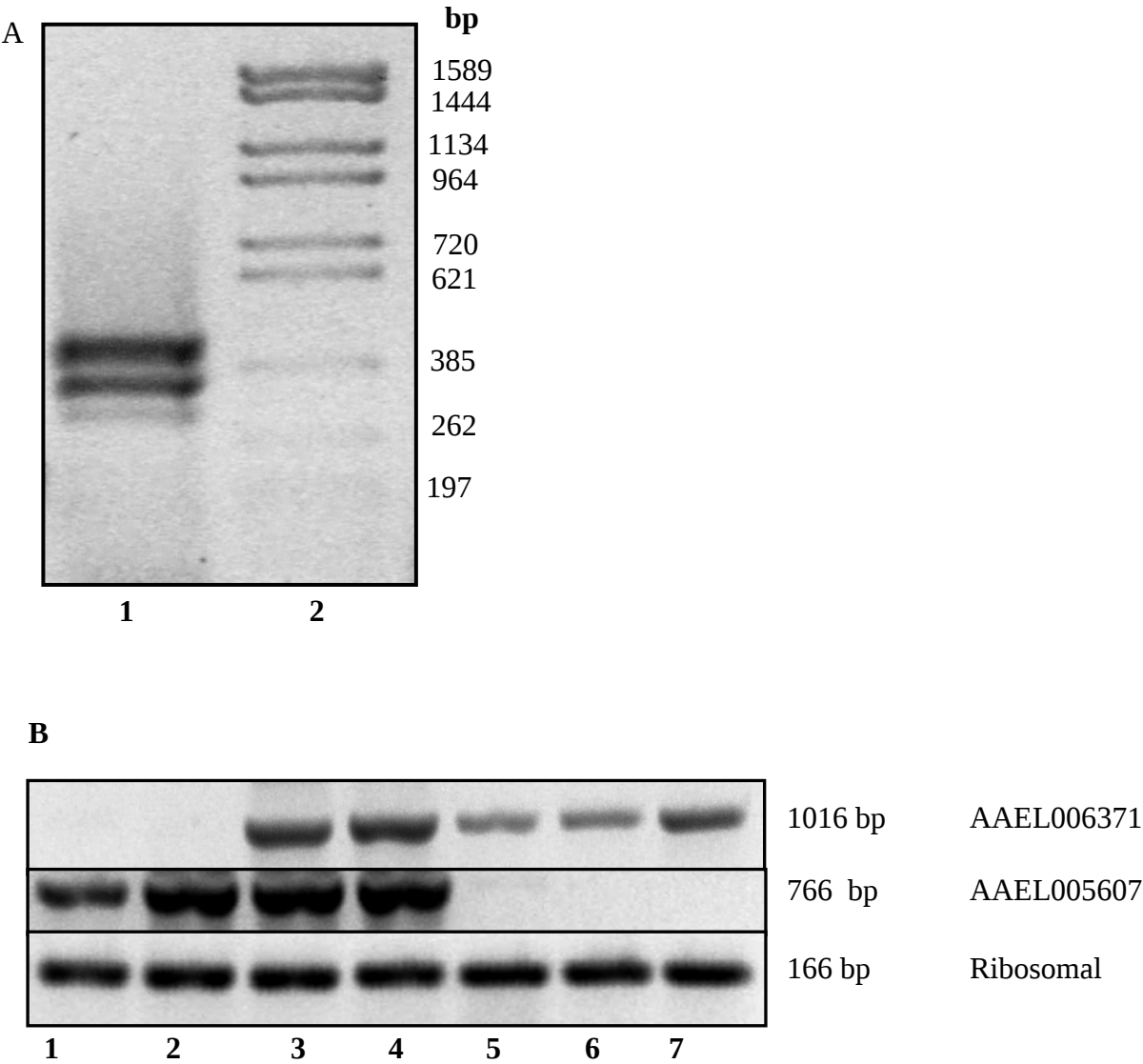


Fig 3.

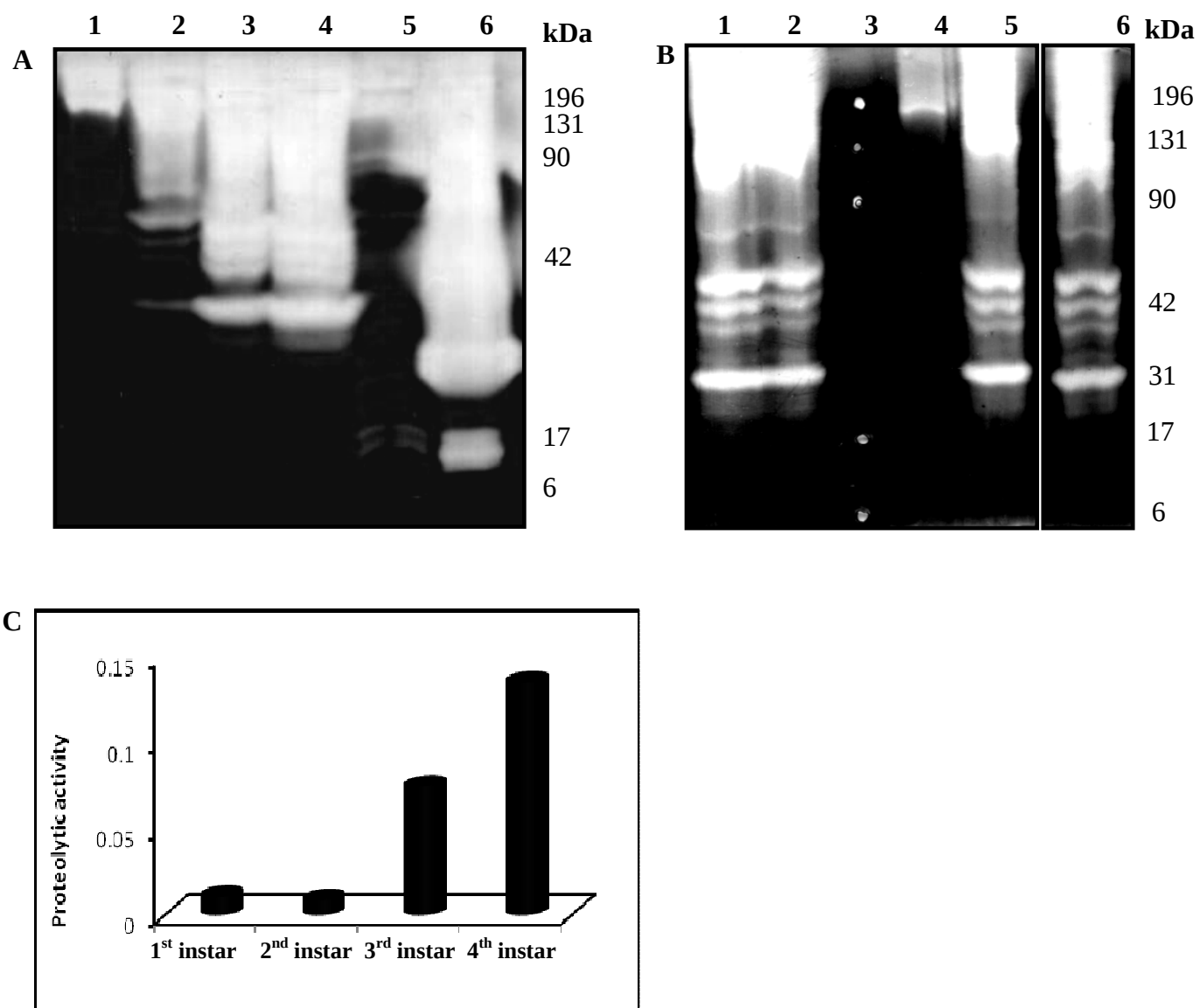


Fig 4.

