ALEXANDRE SANTOS DE MOURA

CATEPSINAS B VITELOLÍTICAS

DE *Culex quinquefasciatus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

São Paulo
2013

ALEXANDRE SANTOS DE MOURA

CATEPSINAS B VITELOLÍTICAS

DE *Culex quinquefasciatus*

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Dra. Alcira Tania Bijovsky de Katzin

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Moura, Alexandre Santos de.

Catepsinas B vitelolíticas de *Culex quinquefasciatus* / Alexandre Santos de Moura. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Alcira Tania Bijovsky de Katzin.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biologia celular de mosquitos hematófagos.

Versão do título para o inglês: Vitellolytic cathepsins B of *Culex quinquefasciatus*.

1. *Culex quinquefasciatus* 2. Catepsina B 3. Proteína de vitelo
4. Cisteíno protease 5. Ovo 6. Vitelogênese I. Katzin, Profa. Dra.
Alcira Tania Bijovsky de II. Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da
Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0194/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Alexandre Santos de Moura.

Título da Dissertação: Catepsinas B vitelolíticas de *Culex quinquefasciatus*.

Orientador(a): Profa. Dra. Alcira Tania Bijovsky de Katzin.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **092** nas fls. **131** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Alcira Tânia Bijovsky de Katzin**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Enzimas vitelogênicas de Culex quinquefasciatus*" do qual participam o(s) aluno(s) **Alexandre Santos de Moura**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **31.07.2012**, com validade de 4 anos.

São Paulo, 31 de julho de 2012.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice-Coordenador-CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

À minha família que sempre me incentivou
aos estudos e a minha futura esposa pela
companhia e amor.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à grande doutora, professora, orientadora, amiga Alcira Tania Bijovsky de Katzin, por permitir que eu desenvolvesse este trabalho e estar sempre ao meu lado seja na orientação profissional como pessoal.

Agradeço ao meu grande amigo e, posso dizer co-orientador, Dr. André Franco Cardoso pelas ajudas na bancada, na discussão dos experimentos e resultados, e pelos seus “rush’s”.

Agradeço ao Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin pelos ensinamentos de bioquímica e pelas aulas de história durante nossa excursão pela Espanha. Aos amigos MS. Rodrigo Sussman, MS. Heloísa Berta, Dra. Emilia Kimura, Valnice e ao grande homem e churrasqueiro Alexandre Saito (Fé irmão!).

Agradeço aos grandes amigos culequentos que fiz durante esses 11 anos, que me auxiliaram em experimentos e seus resultados, Dr. Fábio de Almeida, Renato Leme Cres, Felipe Bopp, Patrícia Yogi, Larissa Almeida e a minha primeira IC, Juliana Barreto.

Agradeço ao meu grande amigo Dr. André Luis da Costa da Silva pela grande ajuda nas discussões em biologia molecular e evolução, e pela poucos encontros para “fazermos um bom som”. Às discussões sobre bioquímica e biologia molecular com a Profa. Dra. Margareth de Lara Guimarães Capurro. Também agradeço a todos os amigos que fiz no laboratório MGM, Danilo, Diego, Ediane, Flávia, Karina, Isabel. Rafaella.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Winter (Prof. Inverno) pelas horas que passamos em sua sala discutindo “sei lá o que”, mas que de alguma forma me ajudaram muito em meu trabalho.

Agradeço à Profa Dra. Andréa Cristina Fogaça, à Dra. Claudia Angeli e ao CEFAP (Centro de Facilidades de apoio à Pesquisa – ICB/USP) pela ajuda nos experimentos de espectrometria de massas.

Agradeço aos amigos Prof. Dr. Mauro Cortês, pelas conversas científicas e pelas jogadas no futebol de terça feira. A Juliana Ávilla pelas conversas sobre todos os assuntos, aos alunos que dividimos as bancas e assuntos dos mais diversos, Albert, Andreas, Ismael, Lina, Natalia e Viviane.

Agradeço ao Prof. Dr. Arthur Gruber pelo auxílio na análise inicial das sequências.

Agradeço ao Dr. Pedro Ismael, do Instituto Butantã pela ideia da PCR individual das fêmeas.

Agradeço ao Prof. Dr. Ednildo Machado, da UFRJ, por pagar um refrigerante no Arthromint, para discutirmos sobre as enzimas presente durante a embriogênese e como fazer a curva de pH.

Agradeço a Profa. Dra. Aparecida Tanaka, da Unifesp, pela discussão dos resultados da atividade enzimática.

Agradeço à banca pelo aceite do convite e me dar o prestígio destes professores doutores de engrandecer o meu trabalho.

Agradeço a todos os amigos do Departamento de Parasitologia deste instituto.

Agradeço a meus pais Ana e Osvaldo, por sempre me incentivar aos estudos e ao trabalho.

Aos meus irmãos André e Angélica que, só após 11 anos de USP, me perguntaram o que de fato eu fazia, mas sempre me apoiaram, independentemente do que estivesse fazendo. E a toda minha família.

Agradeço a (neste momento) minha noiva Luciene e futura esposa, pela paciência, compreensão, amor e pelos dias de insetário coletando pupas.

E ao apoio financeiro da FAPESP.

“Na ausência de fatos, a dúvida é a opinião do sábio”.

Allan Kardec

RESUMO

Moura AS. Catepsinas B vitelolíticas de *Culex quinquefasciatus*. [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Apesar de *Culex quinquefasciatus* ser um eficiente vetor de doenças tais como a filariose linfática, febre do Nilo Ocidental e outras várias neuroviroses, poucas pesquisas sobre sua fisiologia têm sido conduzidas. Como em todos os animais ovíparos, o desenvolvimento embrionário dos mosquitos depende da degradação dos nutrientes armazenados no ovo, sendo a catepsina B uma protease que tem sido identificada e caracterizada em vários insetos como envolvida nesta função. Neste trabalho identificamos, por espectrometria de massas, duas catepsinas B de *Culex quinquefasciatus*, parcialmente purificadas por autoproteólise de extrato total de ovos. Segundo a anotação de suas sequências no banco de dados específico para vetores, o VectorBase, elas são enzimas parálogas e suas sequências apresentam 77% de homologia. Denominadas neste trabalho como CatB1 e CatB2, ambas são expressas simultaneamente no corpo gorduroso de todas as fêmeas vitelogênicas de nossa colônia e sua atividade pode ser detectada nos ovários vitelogênicos, sugerindo sua origem materna. A transcrição de ambas as enzimas se inicia após o repasto sanguíneo (ARS), alcançando o pico de expressão às 36 h ARS, de forma bastante semelhante à da vitelogenina. Curiosamente, enquanto esta última apresenta uma drástica queda às 48 h ARS, a CatB2 mostra esta redução às 72 h ARS e a CatB1 só apresenta essa queda às 84 h ARS, momento em que as fêmeas de nossa colônia estão aptas para a oviposição.

Palavras-chave: *Culex quinquefasciatus*. Catepsina B. Proteínas de vitelo. Cisteíno protease. Ovo. Vitelogênese.

ABSTRACT

Moura AS. Vitellolytic cathepsins B of *Culex quinquefasciatus*. [dissertation (Masters thesis in Biology of Host-Pathogen Interactions)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Despite *Culex quinquefasciatus* be an efficient vector of diseases such as lymphatic filariasis, West Nile fever and other various neurotrophic viruses, little research on its physiology have been conducted. As in all oviparous animals, embryonic development of mosquitoes depends on the degradation of the nutrients stored in the egg. Cathepsin B is a protease that has been identified and characterized in a number of insects as involved in this function. In this work we have identified, by mass spectrometry, two cathepsins B of *Culex quinquefasciatus*, partially purified by self-proteolysis of total egg extract. According to the annotation of their sequences in the specific vector database, the VectorBase, they are paralogue enzymes and their sequences have 77% homology. Named in this work as CatB1 and CatB2, both are expressed simultaneously in the fat body of all vitellogenic females of our colony and its activity can be detected in vitellogenic ovaries, suggesting a maternal origin. The transcription of both enzymes starts post blood meal (PBM), reaching their peak of expression at 36 h PBM, quite similar to vitellogenin. Interestingly, while the latter shows a drastic decrease at 48 h PBM, CatB2 shows this reduction at 72 h PBM and CatB1 only shows this fall at 84 h PBM, at which time the females of our colony are suitable for oviposition.

Keywords: *Culex quinquefasciatus*. Cathepsin B. Yolk protein. Cystein protease. Egg. Vitellogenesis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa:	Aminoácidos
ARS:	Após repasto sanguíneo
BSA:	Albumina sérica bovina (<i>Bovine serum albumin</i>)
CA-074:	N-(L-3.trans-propylcarbamoxyloxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline
CatB1:	Catepsina B1
CatB2:	Catepsina B2.
cDNA:	Ácido desoxirribonucleico complementar
Ct:	Ciclo limiar (<i>Threshold cycle</i>)
DEPC:	Dietilpirocarbonato
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DNAse:	Desoxirribonuclease
dNTPs:	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT:	Ditiotreitol
E-64:	N-[N-(L-3-trans-carboxyirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatine
EDTA:	Ácido etilenodiamino tetracético
ET:	Extrato total de ovos pretos
kDa:	Quilodalton.
LC-MS/MS:	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
pb:	Pares de bases
PBS:	Tampão fosfato salino
PCR:	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PM:	Padrão de massa
PMSF:	Fenilmetilsulfonil Fluoreto
PR:	Produto da proteólise
PTC:	Feniltiocarbamida

qRT-PCR:	PCR em tempo real quantitativo
RNAse:	Ribonuclease
rp49:	Proteína Ribossomal 49
RT:	Transcrição reversa
SAC:	Sacarose
SDS:	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE:	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
TBE:	Tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA.
TRIS:	Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol.
UTR:	Região não codificante (<i>Uncoding transcript region</i>)
Vg:	Vitelogenina.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica das espécies do complexo pipiens.	18
Figura 2. Cinética enzimática do extrato total de ovos pretos (24 h após a oviposição) sobre Z-Arg-Arg-NHMec.	33
Figura 3. Atividade enzimática do extrato total de ovos pretos (24 h após a oviposição) sobre Z-Arg-Arg-NHMec em diferentes pHs.	34
Figura 4. Perfil eletroforético (SDS PAFE) de extrato total de ovos pretos, antes (ET) e depois (PR) da incubação a 27 °C por 18 h.	35
Figura 5. Porcentagem (%) de atividade enzimática do extrato total de ovos pretos (24 h após a oviposição, ET) e do produto de proteólise (PR) de ovos pretos sobre o substrato Z-Arg-Arg-NHMec.	35
Figura 6. Perfil eletroforético (SDS PAFE) do extrato total de ovos pretos, incubado a 27 °C por 18 h na presença de inibidores específicos de diferentes proteases.	36
Figura 7. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de ovários 84 h ARS e ovos brancos antes (ET) e depois (PR) da incubação a 27 °C por 18 h. Foram aplicados 2 µg de proteína total em cada canaleta.	37
Figura 8. Perfil eletroforético (SDS PAFE) de extrato total de ovos pretos, antes (ET) e depois (PR) da incubação a 27 °C por 18 h.	38
Figura 9. Alinhamento das sequências aminoacídicas deduzidas dos genes de catepsinas B de diversas espécies.	40
Figura 10. Alinhamento entre as sequências aminoacídicas deduzidas dos genes de catepsina B de Cx. quinquefasciatus CatB1 (CPIJ015761) e CatB2 (CPIJ015762).	42
Figura 11. Alinhamento entre as sequências nucleotídicas dos genes de catepsina B de Cx. quinquefasciatus: CatB1 (CPIJ015761) e CatB2 (CPIJ015762).	43
Figura 12. Alinhamento entre as sequências nucleotídicas da região 3' UTR de CatB1 (CPIJ015761) e CatB2 (CPIJ015762) de Cx. quinquefasciatus.	44
Figura 13. Perfil de transcrição de CatB1 e CatB2 de 10 indivíduos fêmeas de Cx. quinquefasciatus 24 h ARS. C	45
Figura 14 Localização gênica das catepsinas B1 (CPIJ015761) e B2 (CPIJ015762), segundo banco de dados VectorBase.	45
Figura 15. Perfil de expressão dos genes de Catepsina Bq (CatB1), Catepsina B2 (CatB2) e Vitelogenina (Vg) de corpo gorduroso de fêmeas de Cx. quinquefasciatus em diferentes tempos após o repasto sanguíneo.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das endopeptidases de acordo com seu aminoácido catalítico. _____21

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de PCR. _____28

Tabela 3. Identificação dos peptídeos contidos na banda A do produto de proteólise pela análise SEQUEST[®] dos dados do MS/MS contra o banco de dados VectorBase. _____39

Tabela 4. Porcentagem de similaridade entre as sequências aminoacídicas de catepsinas B de diferentes espécies. _____41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Gênero <i>Culex</i>	17
1.2 <i>Culex quinquefasciatus</i>	18
1.3 Vitelogênese em insetos	19
1.4 Proteases	20
1.5 Catepsinas	21
1.6 Catepsinas B-like de artrópodes	22
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Animais	24
3.2 Extrato total de ovos	24
3.3 Quantificação de proteína total	24
3.4 Determinação de atividade de catepsina B	25
3.4.1 Atividade enzimática	25
3.4.2 Determinação do pH ótimo	25
3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)	25
3.7 Purificação parcial das enzimas por proteólise	26
3.8 Inibição da atividade proteolítica	26
3.9 Espectrometria de massas	26
3.9.3 Extração dos peptídeos	27
3.9.4 Análise dos resultados	28
3.10 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores	28
3.11 Extração de DNA genômico	29
3.12 Extração de RNA total	30
3.13 Tratamento com DNase	30
3.14 Síntese de DNA complementar (cDNA)	30
3.15 RT-PCR	30
3.16 Eletroforese de DNA em gel de agarose	31
3.17 Reação de sequenciamento	31
3.18 Análise das sequências	32
3.19 PCR em tempo real quantitativo relativo (qRT-PCR)	32

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Atividade enzimática	33
4.2 Proteólise	34
4.3 Espectrometria de massas	37
4.4 Análise <i>in silico</i> das sequências de catepsinas B de <i>Cx. quinquefasciatus</i>	39
4.5 Perfil transcricional dos genes das catepsinas B de <i>Cx. quinquefasciatus</i>	44
5 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXO A - Tabela completa do resultado obtido pela espectrometria de massas.	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Culex*

Dentre os três principais gêneros de mosquitos hematófagos, o gênero *Culex* (do latim: *culex* = mosquito) apresenta a maior diversidade, com cerca de 780 espécies (WRBU, 2013). Este gênero ainda é dividido em 26 subgêneros (número de espécies entre parênteses): *Acallegeomyia* (1), *Acallyntrum* (8), *Aedinus* (4), *Afrocullex* (1), *Allimanta* (1), *Anoediopora* (12), *Barraudius* (4); *Belkinomyia* (1), *Carrollia* (18), *Culex* (198), *Culicomyia* (55), *Eumelanomyia* (77), *Kitzmilleria* (1), *Lasiosiphon* (1), *Lophoceraomyia* (112), *Maillotia* (9), *Melanoconion* (160), *Micraedes* (8), *Microcullex* (33), *Neocullex* (26); *Nicaromyia* (1); *Oculeomyia* (19), *Phenacomyia* (3), *Phytotelmatomyia* (4), *Sirivanakarnius* (1), *Tinolestes* (3). De todas as espécies, as pertencentes do subgênero *Culex* são as mais estudadas por serem vetores de diversos patógenos e serem encontradas em todas as regiões zoogeográficas, desde os trópicos até as regiões temperadas frias, mas não se estendem para as latitudes extremas do norte (Farajollahi et al., 2011; WRBU, 2013).

A taxonomia deste gênero é muito complicada e muito controversa segundo alguns autores, devido aos indivíduos possuírem morfologia muito semelhante (Cornel et al., 2003; Harbach, 2012). Outro motivo é que seus indivíduos estão geograficamente presentes em todo o mundo e, em alguns casos, habitando as mesmas regiões e gerando muitos híbridos (Arensburger et al., 2010; Farajollahi et al., 2011; Harbach, 2012). Estes fatores levaram à criação de alguns complexos de espécies entre os que se encontra o complexo *pipiens*, criado em 1967 por Mattingly e Laven (Jupp, 1978).

Complexo *pipiens*: Os mosquitos pertencentes a este complexo, conhecidos popularmente como pernilongos, apresentam as seguintes espécies: *Culex pipiens* (Linnæus, 1758), *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823), *Culex australicus* (Dobrotworsky, Drummond, 1953) e *Culex globocoxitus* (Dobrotworsky, 1953). Os indivíduos da espécie *Cx. pipiens* ainda são divididos em duas subespécies, *Cx. pipiens pipiens* (Linnæus, 1758), distribuída entre o norte da Europa e o sul da África e *Cx. pipiens pallens* (Coquillett, 1898), distribuída no oeste da Ásia. Também, em *Cx. pipiens pipiens*, são reconhecidas duas formas, “*pipiens*” e “*molestus*” (*Cx.*

mollestinus, Forskål 1775), sendo esta última a única forma autógena do complexo. Indivíduos das espécies *Cx. globocoxitus* e *Cx. australicus* são encontrados somente na Austrália, sendo a última espécie localizada mais frequentemente ao sul do país (Cornel et al., 2003; Farajollahi et al., 2011; Fig.1).

Cx. quinquefasciatus (Say, 1823) habita toda a região tropical e subtropical do mundo. Juntos, *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. pipiens* estão presentes na maioria das áreas habitadas do mundo, extremamente associados à transmissão de diversos vírus e parasitas (Farajollahi et al., 2011; Fig. 1). Ainda há uma área onde são encontrados híbridos dessas duas espécies (Fig. 1).

Figura 1. Distribuição geográfica das espécies do complexo pipiens.

Fonte: Farajollahi et al., 2011.

1.2 *Culex quinquefasciatus*

Culex quinquefasciatus (do latim: *quinque* = cinco, *fasciae* = listras), também conhecido como *Culex fatigans* (Harbach, 2012) é a espécie encontrada em todo o território brasileiro. É um mosquito de tamanho médio, de cor parda, cosmopolita, de hábitos noturnos, altamente antropofílico e completamente adaptado às condições urbanas (Rey, 2008).

É o principal vetor de *Wuchereria bancrofti*, agente da filariose linfática, e também um competente vetor de agentes de diversas patologias humanas e veterinárias como os vírus das encefalites de *Saint Luis* e do Oeste do Nilo, a febre

de *Rift Valley* e o Sindbis (Turell, 2012). Seu zumbido causa grande incômodo noturno e suas picadas podem causar alergias, principalmente em crianças (Malafronte et al., 2003).

São animais holometábolos e iniciam sua vida em ambientes aquáticos, geralmente em coleções de água poluída, onde os ovos são depositados em forma de jangada. As larvas que eclodem dos ovos completam seu desenvolvimento em aproximadamente oito dias, passando por quatro estágios e tornando-se pupas. Após dois dias, o mosquito adulto emerge da pupa e em aproximadamente quatro dias as fêmeas estão aptas a realizar o repasto sanguíneo. Em 84 horas, é realizada a oviposição (Patrícia S. Yogi, dados não publicados).

1.3 Vitelogênese em insetos

Os ovários dos mosquitos estão dispostos dorso-lateralmente na região posterior do abdômen e são compostos por unidades funcionais menores, denominadas ovaríolos (Clements, 1992). O amadurecimento e crescimento dos ovócitos se dão no *vitellarium*, ou zona de crescimento, localizada caudalmente ao *germarium*. No *vitellarium* é formado o folículo, composto por um ovócito rodeado por uma monocamada de células epiteliais, as células foliculares, que são unidas entre si por pontes intercelulares. Quando existentes, as células auxiliaadoras (*nurse cells*) completam o folículo e são responsáveis pela síntese de ribossomos e RNA mensageiro, que são transferidos para o ovócito através de pontes citoplasmáticas (Clements, 1992). A cada ciclo gonotrófico, um número variável de folículos maduros é formado, sendo seus ovócitos posteriormente revestidos pelo córion, composto por estruturas protéicas produzidas pelas células foliculares (Clements, 1992; Forattini, 1996). A entrada do espermatozoide no ovócito é realizada através de um pequeno poro, a micrópila.

Após a ingestão de sangue inicia-se o processo vitelogênico, ativado pelo hormônio juvenil e a 20-hidroxiecdisona. As células principais do corpo gorduroso, os trofócitos, sintetizam diversos nutrientes que são transportados pela hemolinfa e armazenados no ovócito.

Em *Ae. aegypti* a vitelogenina é a proteína mais abundante encontrada na hemolinfa durante este período e corresponde a 75% do total das proteínas do ovo

(Hagedorn, Judson, 1972; Raikhel e Lea, 1983; Clements, 1992; Tufail, Takeda, 2008). Ela é uma fosfolipoproteína glicosilada oligomérica, com massa molecular variando entre 200 e 600 kDa, sintetizada pelos trofócitos do corpo gorduroso sofre diversas modificações como glicosilação, fosforilação e clivagem em duas ou mais subunidades (Clements, 1992; Dhadialla, Raikhel, 1990). Então ela é transportada pela hemolinfa, atravessa os espaços existentes entre as células foliculares e se liga aos receptores específicos localizados na membrana do ovócito, sendo incorporada por endocitose (Roth e Porter, 1964; Clements, 1992; Snigirevskaya et al., 1997; Sappington e Raikhel, 1998).

Quando internalizada, a vitelogenina é armazenada em grânulos de vitelo na forma cristalizada denominada vitelina (Hays, Raikhel, 1990; Snigirevskaya et al., 1997). Ela será hidrolisada durante a embriogênese por diversas proteases que descreveremos mais adiante.

1.4 Proteases

Estas enzimas são classificadas de acordo com o tipo de reação que catalisam e possuem nomenclatura internacional segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, NC-IUBMB). Esta nomenclatura é feita utilizando as iniciais EC (**E**nzyme **C**ommission number)) seguidas de um ou mais números, de acordo com sua classe, que são seis: 1. oxirredutases, 2. transferases, 3. hidrolases, 4. liases, 5. isomerases e 6. ligases; havendo em cada uma das classes subdivisões de acordo com a especificidade da reação.

Dentro da classe das hidrolases estão as enzimas que atuam sobre ligações peptídicas, denominadas proteases, proteinases ou peptidases. Ainda são subdividas de acordo com a região das proteínas em que a ligação será quebrada, sendo endopeptidases as que agem no meio das proteínas e exopeptidases as que agem nas extremidades. As exopeptidases ainda são subdivididas em aminopeptidases e carboxipeptidases, segundo a extremidade de ação (Barret, 1994).

Diferentemente das exopeptidases, as endopeptidases são classificadas de acordo com o tipo de aminoácido (aa) catalítico presente em sua sequência (Tabela 1). Cada enzima possui dois ou três aminoácidos que são responsáveis pela ação catalítica sendo denominados de díade ou tríade catalítica, respectivamente. No entanto, apenas um dos aminoácidos, extremamente reativo, é capaz de agir, atacando a ligação peptídica da proteína a ser degradada, enquanto os outros aminoácidos auxiliam na estabilização da ligação entre a enzima e a proteína.

Tabela 1. Classificação das endopeptidases de acordo com seu aminoácido catalítico.

Aminoácido catalítico	Classificação
Serina	Serino protease
Cisteína	Cisteíno protease
Aspartato	Aspartil protease

A diferença das anteriores, as metaloproteases possuem um mecanismo diferente, pois no lugar de um aminoácido catalítico existe um íon metálico, geralmente um zinco (Barret, 1994).

1.5 Catepsinas

As catepsinas (do grego: *Kathépseim* = digerir) foram descritas em 1928 por Willstätter e Bamann como enzimas tissulares que degradam proteínas em pH levemente ácido. Em 1940, três tipos de catepsinas foram descritos em tecido de baço de boi, sendo então nomeadas, de acordo com sua ação proteolítica, como: catepsina I, uma exopeptidase; catepsina II, uma endopeptidase e catepsina III, uma exopeptidase (Fruton et al., 1940). No ano seguinte foi descrita em baço e rim de boi e rim de suíno outra exopeptidase então denominada de catepsina IV (Fruton et al., 1941). Em 1952, Tallan e colaboradores fizeram a renomeação das catepsinas: a catepsina I foi chamada de catepsina A; a II de catepsinas B e C; a catepsina III de leucina aminopeptidase e a catepsina IV de carboxipeptidase (Tallan et al., 1952).

A catepsina B é a mais estudada dentre as catepsinas humanas; ela pertence à família da papaína, por possuir uma cisteína (que contém grupo sulfidril como

nucleófilo) como aminoácido catalítico e atividade em pHs entre 4,0 e 6,0 (Barret et al., 2008, Greenbaum, Fruton, 1957). É sintetizada na forma de pré-pró-enzima com 339 aa que, após a remoção de 17 resíduos do peptídeo sinal, transforma-se em uma pré-enzima que perde mais 62 resíduos após sua ativação, assim liberando o acesso do substrato à cisteína catalítica e a uma histidina que auxilia na ligação com o substrato (Barret et al., 2008).

São enzimas consideradas lisossomais que atuam em diversos processos biológicos intracelulares e são responsáveis por algumas doenças (Barret et al., 2008; Bouma, Gruber, 1964; McDonald, Ellis, 1975; Turk et al., 2012).

1.6 Catepsinas B-like de artrópodes

Diferentemente da catepsina B lisossomal, as catepsinas B-like vitelolíticas de insetos são produzidas no corpo gorduroso materno, secretadas à hemolinfa e transportadas para os ovócitos, onde são internalizadas.

Em 1949 foi reportada a existência de proteases em ovos do gafanhoto *Dociostaurus maroccanus* por Lichthenstein e colaboradores (Lichthenstein, et al., 1949) e só em 1969 foi descrita a presença de vitelogenina em insetos (Pan et al., 1969). Somente na década de oitenta houve a primeira evidência de uma enzima responsável pela degradação de vitelo de *Artemia salina*, descrita como uma catepsina B-like (Garesse et al., 1980; Perona, Vallejo, 1982). Em 1988, Medina e colaboradores sugeriram a existência de uma catepsina B-like em ovos de *Drosophila melanogaster* (Medina et al., 1988). Em *Ae. aegypti* foi descrito um precursor de 44 kDa, muito semelhante à catepsina B (Cho et al., 1999). Price e colaboradores descreveram que, após o repasto sanguíneo ocorre o aumento da transcrição desta enzima no corpo gorduroso de *Ae. aegypti* (Price et al., 2011). Em *Musca domestica*, uma catepsina é a principal responsável pela hidrólise da vitelogenina (Ribolla et al., 1993). Ela foi detectada na forma de pró-enzima nos grânulos de vitelo (Ribolla et al., 2001) e é ativada pela diminuição do pH dentro do grânulo durante a embriogênese (Ribolla, de Bianchi, 1995).

Neste trabalho, nós descrevemos a presença de duas catepsinas B em ovários e ovos de *Cx. quinquefasciatus* que são simultaneamente transcritas no corpo gorduroso de todas as fêmeas após o repasto sanguíneo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterização das enzimas envolvidas na hidrólise das proteínas de vitelo de *Culex quinquefasciatus*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar a atividade enzimática em ovos de aproximadamente 24 h após a oviposição (ovos pretos);
- ✓ Purificar as enzimas por autoproteólise do extrato de ovos pretos de *Cx. quinquefasciatus*;
- ✓ Determinar o perfil de inibição da atividade proteolítica do extrato de ovos pretos por diferentes inibidores de proteases;
- ✓ Examinar por espectrometria de massas o produto da autoproteólise;
- ✓ Fazer a análise *in silico* das enzimas encontradas na espectrometria;
- ✓ Estudar a expressão temporal das enzimas antes e depois do primeiro repasto sanguíneo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Mosquitos *Culex quinquefasciatus* (cepa PIN; Bracco et al., 1999) foram mantidos a 26 °C e umidade relativa de 70-80% com fotoperíodo de 12h luz/12 h escuridão. As larvas foram alimentadas com comida para peixes (Sera[®]Vipan, Heinsberg, Alemanha) e os adultos com provisão *ad libitum* de solução de sacarose 10% (m/v). Quando necessário, as fêmeas foram alimentadas com sangue em camundongos BALB/c sedados com 0,3 mg/kg de cloridrato de xilazina (Calmiun, Agener União, Brasília, DF, Brasil) mais 30 µg/kg de acepromazina (Acepran, Univet S.A., São Paulo, SP, Brasil).

3.2 Extrato total de ovos

Cerca de 1.500 ovos, de fêmeas de 1º ciclo gonotrófico, coletados aproximadamente 24 h após a oviposição (ovos pretos, na metade da embriogênese) foram homogeneizados em tubo de microcentrífuga com um Pellet Pestle[®] Motor (Kimble Kontes, Vineland, Nova Jersey, EUA), no gelo, em 200 µl de tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0. Após rápida centrifugação a 10.000 xg por 5 s, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o sedimento foi ressuspendido em 200 µl do mesmo tampão. Após nova centrifugação o sobrenadante foi adicionado ao anterior, obtendo-se um volume final de 400 µl.

3.3 Quantificação de proteína total

A quantificação proteica foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se como referência uma curva padrão de albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*, BSA), em tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0. As amostras foram colocadas em microplacas de 96 poços contendo 40 µl de *Comassie Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, Filadélfia, Pensilvânia, EUA) em tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0 para um volume final de 200 µl por poço. A leitura da absorvância, a 592 nm, foi realizada em espectrofotômetro Multiskan[®] EX (Thermo

Scientific, São José, Califórnia, EUA) e a concentração calculada com relação à curva de BSA.

3.4 Determinação de atividade de catepsina B

3.4.1 Atividade enzimática

Para análise da presença de atividade de catepsina B foi realizada cinética enzimática utilizando 20 µM do substrato Z-Arg-Arg-NHMec (benziloxycarbonil-L-arginina-L-arginina 4-metil-coumaril-7-amida), 2 mM de DTT (ditiotreitól), 1 mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) e 0,2 ng de proteína em tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0. Após a adição da amostra, o produto fluorescente, o 7-amino-metil-cumarina, liberado pela reação enzimática foi pesquisado a cada 10 minutos durante 50 minutos a 27 °C, no fluorímetro Fluoroskan Ascent Microplate Fluorometer® (Thermo Scientific), em comprimento de onda de excitação de 360 nm e de emissão de 450 nm. O controle foi realizado acrescentando 50 µM de E-64 (*N*-[*N*-(*L*-3-*trans*-carboxyirane-2-carbonyl)-*L*-leucyl]-agmatine), inibidor específico de cisteíno proteases (Barrett et al., 1982).

3.4.2 Determinação do pH ótimo

Para a determinação do pH foram utilizados 0,2 ng de extrato de ovos na presença 20 µM do substrato Z-Arg-Arg-NHMec, incubado por 30 minutos a 27 °C em tampão de atividade, que foi uma mistura de: glicina 10 mM, acetato de sódio 10 mM, citrato de sódio 10 mM, Tris (tris(hidroximetil)aminometano) 10 mM possibilitando a obtenção de diferentes pHs entre 3,0 e 8,0.

Para a confirmação do resultado, o ensaio foi repetido utilizando tampão acetato de sódio 10 mM na faixa de pHs entre 4,5 e 5,5.

3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra (DTT 50 mM; 0,2% de SDS (*sodium dodecyl sulfate*); 10% de glicerol; 0,01% de azul de bromofenol; Tris

62 mM pH 6,8) e submetidas à eletroforese em gel descontinuo de poliacrilamida a 12% contendo 0,1% de SDS (Laemmli, 1970) com voltagem constante de 100 V (Mini-PROTEAN®, Bio-Rad Laboratories). Os géis foram corados com 0,125% de *Coomassie brilliant blue* R-250 em metanol:ácido acético:água (50:10:40, v/v/v) e descorados com etanol:ácido acético:água (23:7:70, v/v/v).

As massas moleculares foram estimadas utilizando marcadores padrão: fosforilase b (101,4 kDa); albumina de soro bovino (87,5 kDa); ovoalbumina (52,7 kDa); anidrase carbônica (35,8 kDa); inibidor de tripsina de soja (27,8 kDa) e lisozima (18,8 kDa) (Bio-Rad Laboratories).

3.7 Purificação parcial das enzimas por proteólise

O extrato total de ovos pretos foi incubado a 27 °C por 18 h em tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0 adicionado de PTC (*phenylthiocarbamide*) 0,5 mM. O perfil de degradação das proteínas do ovo foi analisado por SDS-PAGE. A atividade enzimática para catepsina B do produto da incubação foi determinada como descrito no item 3.4.

3.8 Inibição da atividade proteolítica

Diferentes inibidores de proteases foram adicionados ao extrato total de ovos antes da incubação para avaliar a inibição da reação: E-64 50 µM (cisteíno proteases); PMSF (fenilmetilsulfonil fluoreto) 1 mM (serino proteases); EDTA 2 µM (metalo proteases), pepstatina 10 µM (aspartil proteases) e CA-074 (*N.(L-3.trans-propylcarbamoyloxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline*) 1mM (inibidor específico de catepsina B) (Murata et al., 1991). O controle foi incubado sem inibidores.

Os produtos foram analisados por SDS-PAGE.

3.9 Espectrometria de massas

As bandas de polipeptídeos de interesse presentes no gel de eletroforese do produto da proteólise foram recortadas e colocadas individualmente em tubos de microcentrífuga. Os fragmentos de géis foram reidratados com 150 µl de NH_4HCO_3

0,1 M e, após 15 minutos, adicionados de igual volume de acetonitrila e agitados até a descoloração total. O material foi lavado com água bidestilada, seguido de centrifugação a 1.600 xg por 5 min e incubado em bicarbonato de amônio 200 mM por 20 min a temperatura ambiente.

3.9.1 Redução e alquilação das proteínas

Os fragmentos de géis foram cortados em frações menores e a redução das pontes dissulfeto foi realizada com a adição de DTT 10 mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min a 56 °C. A alquilação foi realizada em iodocetamida 55 mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 20 min a temperatura ambiente, protegida da luz. A seguir, as amostras foram lavadas em bicarbonato de amônio 100 mM, incubadas com 100% de acetonitrila por 10 min e secas a vácuo por centrifugação (Centrifuga Vácuo Eppendorf Concentrator 5301; Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

3.9.2 Digestão *in gel* das proteínas

As amostras foram ressuspensas em solução de bicarbonato de amônio 50 mM e cloreto de cálcio 5 mM contendo 12,5 ng de tripsina, e incubadas sob agitação por 45 min a 37 °C. Após a adição de mais 50 µl de bicarbonato de amônio 50 mM, foram incubadas por mais 16 h a 37 °C.

3.9.3 Extração dos peptídeos

Após a incubação com tripsina, os peptídeos foram extraídos incubando as amostras por 15 min a 37 °C em solução de bicarbonato de amônio 25 mM. A seguir, foi adicionada acetonitrila para uma concentração final de 25% e as amostras foram reincubadas por 15 minutos a 37 °C sob agitação.

O material foi centrifugado a 1.600 xg por 5 min a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e transferido para novo tubo. Ao sedimento adicionou-se ácido fórmico a 5%, incubou-se sob agitação por 15 min a 37 °C e adicionou-se o mesmo volume de acetonitrila 100%, seguido de nova incubação nas mesmas condições. Centrifugou-

se a 1.600 xg por 5 min a temperatura ambiente, o sobrenadante foi adicionado ao coletado anteriormente e secado a vácuo.

Os fragmentos trípticos foram ressuspensos em acetonitrila 80% contendo ácido trifluoroacético 2%, dessalinizados por Zip-Trip (Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA) e submetidos a um nano HPLC-MS/MS (LCQDuo ion trap mass spectrometer; Finnigan, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, EUA).

3.9.4 Análise dos resultados

Os espectros de digestão obtidos foram analisados utilizando o programa Sequest[®] (Thermo Fisher Scientific Inc.) com os bancos de dados não redundantes do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e confirmados pelo banco de dados, específico de vetores, VectorBase (*NIAID Bioinformatics Resource Center* - <http://www.vectorbase.org/index.php>). As sequências foram, manualmente, validadas utilizando como parâmetros a presença de no mínimo dois peptídeos encontrados com probabilidade menor que 1×10^3 , XCorr igual ou maior que 1,5, 2,0 e 2,5 para peptídeos com carga 1, 2 e 3, respectivamente, Delta CN igual ou maior que 0,05.

3.10 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 2) para amplificação dos transcritos da proteína ribossomal 49 (rp49) e da vitelogenina foram desenhados pelo programa Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>; Untergasser et al., 2012) e para a amplificação dos transcritos da catepsina B1 e da catepsina B2 foram desenhados manualmente.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de PCR.

Gene	Nº de acesso (VectorBase)	Iniciadores
Proteína Ribossomal 49 (rp49)	CPIJ001220	F- 5' AGGTATCGACAACCGAGTGC 3' R- 5' ACAATCAGCTTGCGCTTCTT 3'

Vitelogenina	CPIJ010190	F- 5' CGTATGCCCCGTAAGTGGACT 3' R- 5' ACTGGCAGAAGCGTTCAGAT 3'
Catepsina B (CatB1)	CPIJ015761	F- 5' TGGGGTGAGGACTGG 3' R-5' CTGGTTGATTTTAATGAGCTGTATTTT 3'
Catepsina B (CatB2)	CPIJ015762	F- 5' TGGGGTGAGGACTGG 3' R- 5' CTTCAGCACTTCTTTATTATGCCC 3'

3.11 Extração de DNA genômico

Cinco fêmeas adultas inteiras foram homogeneizadas em 600 µl de tampão de extração (Tris 100 mM pH 8,0, EDTA 100 mM, 0.5% de SDS) e incubadas com RNase 0,005% por 45 min a 37 °C. Posteriormente, o material foi incubado com proteinase K 0,01% por 3 h a 50 °C.

Após esta incubação, foram adicionados 600 µl de fenol saturado (Amresco, Solon, Ohio, EUA) e misturados por agitação suave durante 5 min. As amostras foram centrifugadas a 8.500 xg durante 5 min a temperatura ambiente. 500 µl do sobrenadante foram transferidos a um novo tubo ao que se adicionou o mesmo volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 v/v/v) e foram misturados por agitação suave durante 5 min. Após centrifugação a 8.500 xg por 5 min a temperatura ambiente, 400 µl do sobrenadante foram transferidos a um novo tubo. Adicionou-se o mesmo volume de clorofórmio, misturou-se por agitação suave durante 5 min e a amostra foi centrifugada a 8.500 xg por 5 min a temperatura ambiente.

300 µl do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo e foram adicionados 30 µl de acetato de sódio 0,3 M e 600 µl de etanol 100% gelado. O produto resultante foi mantido por 24 h a -20 °C.

A precipitação do DNA foi realizada por centrifugação a 8.500 xg por 10 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi centrifugado a temperatura ambiente uma vez com etanol 100% gelado e duas vezes com etanol 70% gelado. O precipitado resultante foi ressuspenso em 100 µl de tampão TE (EDTA 1 mM em Tris 10 mM pH 8,0).

3.12 Extração de RNA total

O RNA total de corpo gorduroso e/ou de mosquitos inteiros foi extraído de fêmeas adultas alimentadas com sacarose (SAC) e em diferentes tempos (12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h e 84 h) após o repasto sanguíneo (ARS). Os tecidos foram homogeneizados em tubos de microcentrífuga com um Pellet Pestle[®] Motor (Kimble Kontes, EUA), no gelo, em Trizol[®], conforme instruções do fabricante (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, EUA). O RNA foi ressuspenso em 30 µl de H₂O contendo 0,1% de dietilpirocarbonato (H₂O-DEPC) e armazenado a -70 °C.

O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) em um comprimento de onda de 260 nm, tendo a relação na absorbância entre DNA e proteína (260nm/280nm) maior que 1,8.

3.13 Tratamento com DNase

O RNA foi tratado com o kit DNase I *Amp grade* conforme instruções do fabricante (Invitrogen). Para verificar a eficiência do tratamento de purificação, 0,2 µg do RNA purificado foram utilizados como molde para reação de polimerase em cadeia (*polymerase chain reaction*, PCR), utilizando oligonucleotídeos iniciadores para o gene da proteína ribossomal 49 (rp49, Tabela 1). O produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% e corado com *GelRed*[®] (Uniscience, São Paulo, SP, Brasil). Somente os RNAs correspondentes às amostras que não apresentaram bandas no gel de agarose foram utilizados para a síntese de DNA complementar (cDNA).

3.14 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese do cDNA foi realizada utilizando os kits *Oligo dT* e SuperScript[®] II RNase *H*-reverse Transcriptase conforme instruções do fabricante (Invitrogen).

3.15 RT-PCR

A transcrição reversa (RT) foi feita em equipamento automático para PCR (Biometra, Horsham, Pensilvânia, EUA) em microtubos contendo, cada um deles, 2

mM de dNTPs, 2 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 2), 0,5 U de Taq Polimerase (Biotools, Madri, Espanha) e 1 μ l de cDNA ou 1 μ l de DNA genômico.

As amostras foram desnaturadas por 2 min a 94 °C e submetidas a 40 ciclos de 20 s a 94 °C, 20 s a 57 °C e 40 s a 72 °C.

3.16 Eletroforese de DNA em gel de agarose

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1% em TBE (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM pH 8,0). Foi adicionado às amostras 1/6 do volume de tampão de amostra (50% de glicerol, EDTA 1 mM, 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xilenocianol), e elas foram aplicadas no gel.

Após a eletroforese com voltagem constante de 100 V por 50 min, o DNA foi visualizado por tratamento com *Gel Red*[®] (Uniscience) e foto documentado no *Image Quant*[®] 300 (General Electric, Schenectady, Nova Iorque, EUA).

3.17 Reação de sequenciamento

Os produtos de PCR de interesse foram sequenciados utilizando *Big Dye*[®] *Terminator* v 3.1 (Applied Biosystems, São Francisco Sul, Califórnia, EUA) conforme as instruções do fabricante. Para cada reação foram utilizados 1 μ l de DNA, 2 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 1) em Tris 50 mM pH 9,0 e MgCl₂ 1 mM. As amostras foram desnaturadas por 1 min a 96 °C e submetidas a 30 ciclos de 15 s a 96 °C, 15 s a 50 °C e 4 min a 60 °C.

Ao produto da reação foi adicionado isopropanol para uma concentração final de 60% e foi incubado por 15 min a temperatura ambiente, centrifugado por 20 min a 12.000 xg a temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado.

Foi adicionado isopropanol para uma concentração final de 45% e novamente centrifugado por 10 min a 12.000 xg a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco por 10 min a 96 °C, protegido da luz.

As amostras foram ressuspensas em formamida Hi-Di[®] 3700 (Applied Biosystems) e as sequências foram obtidas no sequenciador capilar ABI 3100[®] (Applied Biosystems).

3.18 Análise das sequências

O cromatograma das sequências foi analisado utilizando o programa BioEdit® (Hall, 1999). As sequências foram alinhadas utilizando o programa ClustalW (Thompson et al., 1994) e analisadas com os algoritmos BLAST (*Basic local alignment search tool*) (Altschul et al., 1997) dos bancos de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e VectorBase (<http://cpipiens.vectorbase.org/Tools/BLAST/>). O peptídeo sinal foi determinado pelo programa SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>; Nielsen et al., 1997).

3.19 PCR em tempo real quantitativo relativo (qRT-PCR)

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o termociclador StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Foram utilizados Maxima SYBR® Green (Thermo Scientific), conforme as instruções do fabricante, contendo 2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 1) e 1 µl de cDNA.

As amostras foram desnaturadas por 10 min a 95 °C e submetidas a 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 1 min a 57 °C e 1 min a 60 °C. A especificidade das amplificações foi confirmada pelas curvas de dissociação geradas após os ciclos de replicação, de acordo com as instruções do fabricante. A análise dos dados foi feita com o programa StepOne™ Software (Applied Biosystems).

Os valores do ciclo limiar (*threshold cycle*, Ct) foram utilizados para quantificar a expressão do gene de interesse, usando o método de comparação do Ct ($\Delta\Delta Ct$ Method), de acordo com o modelo matemático descrito por Livak e Schmittgen (2001).

A expressão relativa dos genes de Vg, CatB1 e CatB2 foi calculada utilizando como gene normalizador o gene da rp49 e a expressão de fêmeas adultas alimentadas com sacarose como referência. A análise da expressão utilizando o gene de actina como normalizador também foi testada, mas houve grande variação de expressão deste gene nos tempos estudados.

Foi utilizada a análise estatística *one-way* ANOVA para comparar três amostras biológicas independentes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade enzimática

Baseado na cinética enzimática de atividade de catepsina B do extrato total de ovos pretos de *Cx. quinquefasciatus* (Fig. 2), foi estabelecido o tempo de incubação de 30 minutos, para as análises de atividade.

Figura 2. **Cinética enzimática do extrato total de ovos pretos (24 h após a oviposição) sobre Z-Arg-Arg-NHMec.** A atividade do material foi detectada a cada 10 min por 50 min a 27 °C em tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0. UAF: unidade arbitrária de fluorescência.

A seguir, foi determinado o pH ótimo, que está entre 5,0 e 5,5 (Fig. 3), como descrito para as catepsinas B de *Drosophila melanogaster* (Medina et al., 1988), *Musca domestica* (Ribolla, et al., 1993; Ribolla, de Bianchi, 1995) e *Aedes aegypti* (Cho et al., 1999).

Figura 3. **Atividade enzimática do extrato total de ovos pretos (24 h após a oviposição) sobre Z-Arg-Arg-NHMeC em diferentes pHs.** O material foi incubado durante 30 min a 27 °C em tampão glicina 20 mM, acetato de sódio 20 mM, citrato de sódio 20 mM, e Tris (tris(hidroximetil)aminometano) 20 mM. UAF/min.µg: unidade arbitrária de fluorescência por minuto vezes microgramas do produto. As barras indicam o erro padrão entre três testes independentes.

4.2 Proteólise

Foi realizada a incubação do extrato de ovos pretos na intenção de purificar parcialmente as enzimas por autoproteólise, como descrito por Ribolla e de Bianchi (Ribolla, de Bianchi, 1995).

O produto de proteólise mostrou uma drástica redução das proteínas totais quando comparado com o extrato total prévio à incubação tanto pelo método de Bradford como por SDS-PAGE (Fig. 4), se destacando a presença de uma banda de grande intensidade, de aproximadamente 30 kDa, tamanho de outras catepsinas B de dípteros descritas na literatura (Cho et al., 1999; Ribolla et al., 1993; Ribolla, de Bianchi, 1995). O produto de proteólise conserva atividade enzimática contra o Z-Arg-Arg-NHMeC, ainda que reduzida (Fig. 5).

Figura 4. **Perfil eletroforético (SDS PAFE) de extrato total de ovos pretos, antes (ET) e depois (PR) da incubação a 27 °C por 18 h.** Foram aplicados 2 µg de proteína total em cada canaleta. Os números à esquerda indicam as massas moleculares relativas em kiloDaltons (PM): fosforilase b (101,4 kDa); albumina de soro bovino (87,5 kDa); ovoalbumina (52,7 kDa); anidrase carbônica (35,8 kDa); inibidor de tripsina de soja (27,8 kDa) e lisozima (18,8 kDa) (Bio-Rad Laboratories).

Figura 5. **Porcentagem (%) de atividade enzimática do extrato total de ovos pretos (24 h após a oviposição, ET) e do produto de proteólise (PR) de ovos pretos sobre o substrato Z-Arg-Arg-NHMec.** Os materiais foram incubados em pH 5,0 a 27 °C por 30 min, em tampão acetato de sódio 10 mM.

A adição de inibidores específicos de diferentes tipos de proteases ao extrato total, antes da incubação, mostrou que a proteólise (Fig. 6) somente é inibida na presença de 50 µM de E-64, inibidor específico de cisteíno proteases (Barrett et al., 1982), ou de 1 mM de CA-074, inibidor específico de catepsina B (Murata et al.,

1991). Este resultado indicou que uma cisteíno protease, provavelmente uma catepsina B-like, é a principal responsável pela proteólise.

Figura 6. Perfil eletroforético (SDS PAFE) do extrato total de ovos pretos, incubado a 27 °C por 18 h na presença de inibidores específicos de diferentes proteases. Cada canaleta contém 2 µg de proteína total. ET: extrato total de ovos; E-64 (50 µM): cisteíno proteases; CA-074 (1 mM): catepsina B; PMSF (1 mM): serino proteases; EDTA (2 mM): metalo proteases; pepstatina (PEPS, 10 µM): aspartil proteases; S/I: sem inibidor. Os números à esquerda indicam as massas moleculares relativas em kiloDaltons (PM): fosforilase b (101,4 kDa); albumina de soro bovino (87,5 kDa); ovoalbumina (52,7 kDa); anidrase carbônica (35,8 kDa); inibidor de tripsina de soja (27,8 kDa) e lisozima (18,8 kDa) (Bio-Rad Laboratories).

O mesmo padrão de proteólise foi observado em ovários 84 h ARS e em ovos brancos (aproximadamente 2 h após a oviposição; Fig. 7), mostrando que a enzima responsável está armazenada no ovário vitelogênico, como descrito em *Ae. aegypti* (Snigirevskaya et al., 1997).

Figura 7. **Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de ovários 84 h ARS e ovos brancos antes (ET) e depois (PR) da incubação a 27 °C por 18 h.** Foram aplicados 2 µg de proteína total em cada canaleta. Os números à esquerda indicam as massas moleculares relativas em kiloDaltons (PM): fosforilase b (101,4 kDa); albumina de soro bovino (87,5 kDa); ovoalbumina (52,7 kDa); anidrase carbônica (35,8 kDa); inibidor de tripsina de soja (27,8 kDa) e lisozima (18,8 kDa) (Bio-Rad Laboratories).

A proteólise mostrou ser um método eficiente para a purificação parcial da catepsina B de *Cx. quinquefasciatus*. Por outro lado, a tentativa de purificação da enzima pelas metodologias clássicas, cromatografia por troca iônica ou gel filtração (Hays, Raikhel, 1990; Ribolla, de Bianchi, 1995), não foi bem sucedida, pois, em ambos os produtos não foi possível detectar atividade enzimática nas frações nem observar bandas do tamanho esperado no SDS-PAGE.

4.3 Espectrometria de massas

Como dito anteriormente, o perfil de eletroforese do produto de proteólise mostrou, na maior parte das vezes, a presença de uma banda (Figs. 4, 6 e 7) de tamanho aproximado aos 30 kDa. No entanto, em algumas eletroforeses do produto de proteólise, foi possível observar a presença de duas bandas majoritárias de massa molecular semelhante (Fig. 8). Estas bandas foram recortadas do gel e

submetidas a uma redução *in gel*, seguida de alquilação e tripsinização. Os peptídeos trípticos resultantes foram analisados individualmente por espectrometria de massas.

Figura 8. Perfil eletroforético (SDS PAFE) de extrato total de ovos pretos, antes (ET) e depois (PR) da incubação a 27 °C por 18 h. O produto de proteólise apresenta duas bandas (A e B) de massa aproximada a 30 kDa. Foram aplicados 2 µg de proteína total em cada canaleta. Os números à esquerda indicam as massas moleculares relativas em kiloDaltons (PM): fosforilase b (101,4 kDa); albumina de soro bovino (87,5 kDa); ovoalbumina (52,7 kDa); anidrase carbônica (35,8 kDa); inibidor de tripsina de soja (27,8 kDa) e lisozima (18,8 kDa) (Bio-Rad Laboratories).

A análise SEQUEST[®] (Eng et al., 1994) dos dados do LC-MS/MS, e após a validação do resultado, revelou que apenas a banda de maior massa molecular (banda A, Fig. 8) apresentou identidade com duas catepsinas B de *Cx. quinquefasciatus*, depositadas tanto no banco de dados não redundante do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) como no banco específico para vetores, o VectorBase (*NIAID Bioinformatics Resource Center* - <http://www.vectorbase.org/index.php>), neste com os códigos CPIJ015761 e CPIJ015762 (Tabela 3). Neste trabalho chamaremos CatB1 à de código CPIJ015761 e CatB2 à de código CPIJ015762. O resultado completo da análise sem a validação utilizando os parâmetros está no anexo 1.

Tabela 3. Identificação dos peptídeos contidos na banda A do produto de proteólise (Fig. 6) pela análise SEQUEST® (Eng et al., 1994) dos dados do MS/MS contra o banco de dados VectorBase.

	Transcrito	Nº Acesso VectorBase	Peptídeos	Probabilidade		Score	Coverage		MW
				P (pro)	P (pep)		XC	DeltaCn	
1	cathepsin B [<i>Culex quinquefasciatus</i>]	CPIJ 015762		3,23E-06		40,15	13,30		39412,9
			K.GVSSGGPYNSK.Q		4,22E-02	2,71	0,22		1021,1
			R.HVTGPLEGGHAIK.I		3,94E-05	2,81	0,29		1237,6
			R.VAYSVVADEHR.I		3,23E-06	2,38	0,31		580,9
			R.VAYSVVADEHR.I		3,68E-05	2,23	0,32		549,7
			K.EDIDLPEQFDAR.D		8,58E-06	3,09	0,27		888,2
2	cathepsin B [<i>Culex quinquefasciatus</i>]	CPIJ 015761		5,83E-05		40,14	9,70		38160,3
			R.VAYSVSQDEER.I		5,83E-05	2,62	0,28		595,9
			K.DHIVLPER.F		8,19E-03	2,22	0,00		588,0
			R.DRWPECTSLK.Q		2,03E-01	2,00	0,06		402,1
			K.DHIVLPERFDAR.D		6,11E-02	2,27	0,06		580,2

A validação das sequências se realizou utilizando como parâmetros a presença de, no mínimo, dois peptídeos encontrados com probabilidade menor que 1×10^{-3} , XCorr igual ou maior que 1,5, 2,0 e 2,5 para peptídeos com carga 1, 2 e 3, respectivamente.

4.4 Análise *in silico* das sequências de catepsinas B de *Cx. quinquefasciatus*

As sequências aminoacídicas reveladas pela espectrometria de massas foram alinhadas com as de outras catepsinas B já caracterizadas (Fig. 9). O alinhamento permitiu observar alta identidade (Tabela 4) das duas catepsinas B de *Cx. quinquefasciatus* com uma catepsina B lisossomal de *Homo sapiens* (AAH10240.1; Barrett, Kirschke, 1981) e com uma catepsina B-like de *Aedes aegypti* (AAEL007585; Cho et al., 1999; Price et al., 2011). A análise também permitiu identificar a díade catalítica, específica das cisteíno proteases, contendo uma cisteína e uma histidina (Barret et al., 2008).

Figura 9. Alinhamento das seqüências aminoacídicas deduzidas dos genes de catepsinas B de diversas espécies. Catepsina B lisossomal de *Homo sapiens* (AAH10240.1; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Barrett, Kirschke, 1981); catepsina B-like de *Aedes aegypti* (AAEL007585; Cho et al., 1999; Price et al., 2011), catepsina B1 de *Culex quinquefasciatus* (CPIJ015761; <http://cpipiens.vectorbase.org/Tools/BLAST/>) e catepsina B2 *Cx. quinquefasciatus* (CPIJ015762; <http://cpipiens.vectorbase.org/Tools/BLAST/>). Os blocos em preto apresentam os aminoácidos idênticos entre as seqüências; os asteriscos indicam os sítios catalíticos característicos das cisteíno proteases: cisteína (C) e histidina (H).

Tabela 4. Porcentagem de identidade entre as sequências aminoacídicas de catepsinas B de diferentes espécies.

Espécies	<i>H. sapiens</i>	<i>Ae. aegypti</i>	<i>Cx quinquefasciatus</i> B1	<i>Cx quinquefasciatus</i> B2
<i>H. sapiens</i>	-	45.15	43.77	44.85
<i>Ae. aegypti</i>	45.15	-	60.70	58.92
<i>Cx quinquefasciatus</i> B1	43.77	60.70	-	66.86
<i>Cx quinquefasciatus</i> B2	44.85	58.92	66.86	-

Catepsina B lisossomal de *Homo sapiens* (AAH10240.1; <http://ncbi.nlm.nih.gov/protein>, Barrett, Kirschke, 1981); catepsina B-like de *Aedes aegypti* (AAEL007585; <http://vectorbase.org>; Cho et al., 1999; Price et al., 2011), catepsina B1 de *Culex quinquefasciatus* (CPIJ015761; <http://vectorbase.org>) e catepsina B2 *Cx. quinquefasciatus* (CPIJ015762; <http://vectorbase.org>). Valores expressos em %.

O alinhamento das sequências aminoacídicas de CatB1 (342 aa) e CatB2 (353 aa) de *Cx. quinquefasciatus* apresentou identidade de 66,86% entre elas (Fig. 10).

Figura 10. Alinhamento entre as sequências aminoacídicas deduzidas dos genes de catepsina B de *Cx. quinquefasciatus* CatB1 (CPIJ015761) e CatB2 (CPIJ015762). Os blocos em preto apresentam os aminoácidos idênticos entre as sequências, as regiões sublinhadas apresentam os peptídeos sinais e os asteriscos indicam a díade catalítica: cisteína (C) e histidina (H).

A análise das sequências nucleotídicas dos genes das duas catepsinas B de *Cx. quinquefasciatus* mostrou identidade de 73% entre elas (Fig. 11), ocasionando bastante dificuldade para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores necessários para a análise de seu perfil transcricional.

Figura 11. Alinhamento entre as sequências nucleotídicas dos genes de catepsina B de *Cx. quinquefasciatus*: CatB1 (CPIJ015761) e CatB2 (CPIJ015762). Os blocos em preto apresentam os nucleotídeos idênticos entre as sequências.

Foram então analisadas as regiões não codificantes da porção 3' (região 3' UTR; Fig. 12) e aqui comprovamos a existência de diferenças significativas entre as duas sequências, que permitiram a síntese de oligonucleotídeos iniciadores reversos específicos para cada gene. A especificidade foi confirmada por sequenciamento dos produtos de PCR e pela curva de dissociação gerada pela PCR de tempo real quantitativo.

Figura 12. Alinhamento entre as sequências nucleotídicas da região 3' UTR de CatB1 (CPIJ015761) e CatB2 (CPIJ015762) de *Cx. quinquefasciatus*. As sequências dentro das caixas indicam os oligonucleotídeos reversos utilizados.

4.5 Perfil transcricional dos genes das catepsinas B de *Cx. quinquefasciatus*

A participação de catepsinas B na degradação de proteínas de vitelo já foi descrita em diversas espécies de insetos, porém, até onde nós sabemos, sempre foi relatada apenas uma única catepsina B presente em cada espécie. Price e colaboradores (Price et al., 2011) relataram a transcrição de quatro genes desta enzima no corpo gorduroso de fêmeas de *Ae. aegypti* após o repasto sanguíneo. Contudo, Snigirevskaya e colaboradores (1997) descreveram a presença de uma única catepsina B na periferia do grânulo de vitelo. Assim como a vitelogenina, a enzima é sintetizada pelo corpo gorduroso vitelogênico como um precursor de 44 kDa, secretada para a hemolinfa e capturada via receptores pelos ovócitos. Após a fertilização ela é ativada, pela acidificação do grânulo, gerando uma enzima ativa de 33 kDa (Cho et al., 1999; Snigirevskaya et al., 1997).

A existência de uma única catepsina B também foi descrita em outros dípteros como uma única enzima de 39 kDa em *Drosophila melanogaster* (Medina et al., 1988) e de 41 kDa em *Musca domestica* (Ribolla et al., 1993; Ribolla, de Bianchi, 1995), de 29 kDa em ortópteros como *Blattella germanica* (Liu et al., 1996) e de 30 kDa em lepidópteros como *Bombyx mori* (Yamamoto, Takahashi, 1993).

Isto nos levou a confirmar se os dois genes de catepsina B de *Cx. quinquefasciatus* eram expressos simultaneamente em todos os indivíduos. Para tanto, 10 fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* 24 h ARS foram testadas individualmente por RT-PCR mostrando que ambos os genes são expressos concomitantemente em todos os animais (Fig. 13). E por qRT-PCR foi observado uma razão de 1,2 na expressão entre CatB1 para CatB2.

Figura 13. **Perfil de transcrição de CatB1 e CatB2 de 10 indivíduos fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* 24 h ARS.** Cada poço contém 5 µl de produto da RT-PCR C+: controle positivo (DNA genômico de *Cx. quinquefasciatus*); C-: controle negativo (sem DNA); pb: pares de bases.

Segundo os dados do banco VectorBase as duas enzimas são parálogas (Koonin, 2005) e suas sequências estão localizadas no mesmo *contig*, mas em *loci* diferentes, (Fig. 14). Estes fatos sugerem fortemente que um dos genes seja produto de uma duplicação gênica bem sucedida (Neurath et al., 1967; Shimeld, 1999). São exemplos deste tipo de homologia e paralogia, mas pertencentes à outra classe de proteases, a tripsina e a quimotripsina (Neurath et al., 1967).

Figura 14 **Localização gênica das catepsinas B1 (CPIJ015761) e B2 (CPIJ015762), segundo banco de dados VectorBase.** Representação do sentido de leitura de expressão dos genes das catepsinas B1 e B2.

A nossa é uma colônia que vem sendo endocriada desde sua criação em 1995, quando em torno de 400 mosquitos foram coletados nas margens do rio Pinheiros em São Paulo, SP (Bracco et al., 1999). Este fato pode ter levado à ausência de pressão seletiva negativa, selecionado apenas os indivíduos que apresentaram tal duplicação, assim ambos os genes são transmitidos aos descendentes e a função catalítica é mantida (Neurath et al., 1967; Shimeld, 1999).

Além de ambas as enzimas serem simultaneamente expressas, a transcrição dos dois genes ocorre apenas após o repasto sanguíneo (Fig. 15) tendo ambos seus picos de expressão às 36 h ARS. Curiosamente, há uma drástica redução do mRNA da CatB2 às 72 h ARS (Fig. 15 B) enquanto que o mRNA da CatB1 só apresenta essa queda às 84 h ARS (Fig. 15 A), momento em que as fêmeas de nossa colônia

estão aptas para a oviposição (Patrícia S. Yogi, dados não publicados). O perfil das duas catepsinas B é semelhante ao perfil da vitelogenina (Fig. 15 C).

Figura 15. **Perfil de expressão dos genes de Catepsina Bq (CatB1), Catepsina B2 (CatB2) e Vitelogenina (Vg) de corpo gorduroso de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* em diferentes tempos após o repasto sanguíneo.** PCR em tempo real quantitativo relativo, valores expressos em escala logarítmica de base 10, de CatB1 (A), CatB2 (B) e Vg (C). Cada coluna representa a média de expressão $\pm$ o erro padrão de três experimentos biológicos independentes. Os asteriscos indicam os valores estatisticamente significativos quando comparados à condição padrão (SAC) pelo teste Two-way ANOVA (*: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$ e ***: $p < 0,0001$). SAC (sacarose): não alimentadas com sangue; 12, 24, 36, 48, 72, 84 h: horas após o repasto sanguíneo (ARS).

5 CONCLUSÕES

Foi observada a presença de atividade enzimática, específica para catepsina B, em extrato total de ovos, aproximadamente 24 h após a oviposição (ovos pretos).

A atividade foi parcialmente purificada por autoproteólise de extrato de ovos pretos (aproximadamente 24 h após a oviposição), após incubação por 18 h a 27 °C, em tampão acetato de sódio 10 mM, pH 5,0.

No produto de autoproteólise pode ser observada uma drástica redução da proteína total assim como do perfil proteico; mas a atividade enzimática continua presente, ainda que reduzida, quando comparada com o extrato total de ovos.

A reação de proteólise foi inibida quando adicionados inibidores específicos, como o E-64 (inibidor irreversível de cisteíno proteases) ou do CA074 (inibidor de catepsina B)

Estes resultados sugerem que esta enzima, uma catepsina B, tenha um papel importante na degradação das proteínas de vitelo.

Por análise das bandas resultantes da reação de autoproteólise por espectrometria de massas, , foi possível detectar a presença de duas catepsinas B.

Análises *in silico*, apontaram que as duas enzimas são parálogas, possuindo cerca de 67% de homologia entre as sequências aminoacídicas.

Os dois genes são simultaneamente expressos em todos os indivíduos testados 24 h após o repasto sanguíneo.

Ambos apresentam perfil de transcrição muito semelhante, com início após o repasto sanguíneo (ARS), alcançando o pico às 36 h ARS, assim como o gene da vitelogenina, principal proteína encontrada nos grânulos de vitelo.

Estas evidências indicam que possivelmente, ambas as catepsinas encontradas tenham um papel chave na degradação das proteínas de vitelo de *Culex quinquefasciatus*.

REFERÊNCIAS*

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 1997 Sep 1;25(17):3389-402.

Arensburger P, Megy K, Waterhouse RM, Abrudan J, Amedeo P, Antelo B, Bartholomay L, Bidwell S, Caler E, Camara F, Campbell CL, Campbell KS, Casola C, Castro MT, Chandramouliswaran I, Chapman SB, Christley S, Costas J, Eisenstadt E, Feschotte C, Fraser-Liggett C, Guigo R, Haas B, Hammond M, Hansson BS, Hemingway J, Hill SR, Howarth C, Ignell R, Kennedy RC, Kodira CD, Lobo NF, Mao C, Mayhew G, Michel K, Mori A, Liu N, Naveira H, Nene V, Nguyen N, Pearson MD, Pritham EJ, Puiu D, Qi Y, Ranson H, Ribeiro JM, Roberston HM, Severson DW, Shumway M, Stanke M, Strausberg RL, Sun C, Sutton G, Tu ZJ, Tubio JM, Unger MF, Vanlandingham DL, Vilella AJ, White O, White JR, Wondji CS, Wortman J, Zdobnov EM, Birren B, Christensen BM, Collins FH, Cornel A, Dimopoulos G, Hannick LI, Higgs S, Lanzaro GC, Lawson D, Lee NH, Muskavitch MA, Raikhel AS, Atkinson PW. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. *Science*. 2010 Oct 1;330(6000):86-8.

Barret AJ. Classification of peptidases. *Meth Enzymol*. 1994; 244 Pt C 1-15.

Barrett AJ, Kembhavi AA, Brown MA, Kirschke H, Knight CG, Tamai M, Hanada K. L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochemical Journal*. 1982 Jan 1;201(1):189-98.

Barrett AJ, Kirschke H. Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods in Enzymology*. 1981;80 Pt C:535-61.

Barret AJ, Rawling ND, JF Woessner. *Handbook of proteolytic enzymes*. London: Academic Press; 2008

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. Voet D, Voet JG, editors: Freeman and Co.; 2004.

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

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Bouma JM, Gruber M. The Distribution of Cathepsins B and C in Rat Tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1964 Sep 18;89:545-7.

Bracco JE, Barata JM, Marinotti O. Evaluation of insecticide resistance and biochemical mechanisms in a population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Sao Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999 Jan-Feb;94(1):115-20.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1-2):248-54.

Cho WL, Deitsch KW, Raikhel AS. An extraovarian protein accumulated in mosquito oocytes is a carboxypeptidase activated in embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991 Dec 1;88(23):10821-4.

Cho WL, Tsao SM, Hays AR, Walter R, Chen JS, Snigirevskaya ES, Raikhel AS. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *Journal of Biological Chemistry*. 1999 May 7;274(19):13311-21.

Clements AN. The biology of mosquitoes. Development, nutrition, and reproduction. New York and London: Chapman and Hall; 1992.

Coquillett DW. Report on a collection of Japanese Diptera, presented to the U.S. National Museum by the Imperial University of Tokyo. *Proceedings of the United States National Museum*. 1898;21(1146):301-40.

Cornel AJ, McAbee RD, Rasgon J, Stanich MA, Scott TW, Coetzee M. Differences in extent of genetic introgression between sympatric *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in California and South Africa. *Journal of Medical Entomology*. 2003 Jan;40(1):36-51.

Dhadialla TS, Raikhel AS. Biosynthesis of mosquito vitellogenin. *Journal of Biological Chemistry*. 1990 Jun 15;265(17):9924-33.

Dobrotworsky NV. The *Culex pipiens* group in south-eastern Australia. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*. 1953;77:357-60.

Dobrotworsky NV, Drummond FH. The *Culex pipiens* group in South-Eastern Australia South-Eastern Australia. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*. 1953;78:131-46.

Eng JK, McCormack AL, Yates JR. An Approach to Correlate Tandem Mass-Spectral Data of Peptides with Amino-Acid-Sequences in a Protein Database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 1994 Nov;5(11):976-89.

Farajollahi A, Fonseca DM, Kramer LD, Marm Kilpatrick A. "Bird biting" mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*. 2011;11(0):1577-85.

Forattini, O.P. *Culicidologia Médica*, volume 1. São Paulo: Edusp; 1996.

Forskål P. *Descriptiones animalium avium, amphibiorum, piscium, insectorum, vermium; quæ in itinere orientali observavit Petrus Forskål. Post mortem auctoris edidit Carsten Niebuhr. Adjuncta est materia medica Kahirina atque tabula maris rubri geographica: Hauniæ. (Möller); 1775.*

Fruton JS, Irving GW, Bergmann M. Preparation of d(-)-glutamic acid from dl-glutamic acid by enzymatic resolution. *Journal of Biological Chemistry*. 1940;133:703-5.

Garesse R, Perona R, Marco R, Vallejo CG. The Unmasking of Proteolytic Activity during the Early Development of *Artemia salina* - Identification of a Precursor after Hatching. *European Journal of Biochemistry*. 1980;106(1):225-31.

Gaunt MW, Sall AA, Lamballerie Xd, Falconar AKI, Dzhivanian TI, Gould EA. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *Journal of General Virology*. 2001 Aug 1;82(8):1867-76.

Greenbaum LM, Fruton JS. Purification and properties of beef spleen cathepsin B. *Journal of Biological Chemistry*. 1957 May;226(1):173-80.

Hagedorn HH, Judson CL. Purification and site of synthesis of *Aedes aegypti* yolk proteins. *Journal of Experimental Zoology*. 1972 Dec;182(3):367-77.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999;41:95-8.

Harbach RE. *Culex pipiens*: Species Versus Species Complex - Taxonomic History and Perspective. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2012 Dec;28(4):10-23.

Hays AR, Raikhel AS. A Novel Protein Produced by the Vitellogenic Fat-Body and Accumulated in Mosquito Oocytes. *Roux's Archives of Developmental Biology*. 1990;199(2):114-21.

Jupp PG. *Culex (Culex) pipiens pipiens* Linnaeus and *Culex (Culex) pipiens quinquefasciatus* Say in South Africa: morphological and reproductive evidence in favour of their status as two species. *Mosquito Systematic*. 1978;10:461-73.

Koonin EV. Orthologs, paralog, and evolutionary genomics. *Annual Review of Genetics*. 2005;39:309-38.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Lichthenstein N, Bodenheimer FS, Shulov A. Proteolytic enzymes of insects. II. Proteases of the eggs of the Moroccan locust (*Dociostaurus maroccanus* Thing.). *Enzymologia*. 1949;13:276-80.

Linnæus C. *Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis: Holmiæ. (Salvius)*. 1758.

Liu XD, McCarron RC, Nordin JH. A cysteine protease that processes insect vitellin - Purification and partial characterization of the enzyme and the proenzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 1996 Dec 27;271(52):33344-51.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

Malafronte RS, Calvo E, James AA, Marinotti O. The major salivary gland antigens of *Culex quinquefasciatus* are D7-related proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2003 Jan;33(1):63-71.

McDonald JK, Ellis S. On the substrate specificity of cathepsins B1 and B2 including a new fluorogenic substrate for cathepsin B1. *Life Sci*. 1975 Oct 15;17(8):1269-76.

Marzzoco A, Torres BB. *Bioquímica Básica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.

Medina M, León P, Vallejo CG. *Drosophila* cathepsin B-like proteinase: A suggested role in yolk degradation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1988;263(2):355-63.

Murata M, Miyashita S, Yokoo C, Tamai M, Hanada K, Hatayama K, Towatari T, Nikawa T, Katunuma N. Novel Epoxysuccinyl Peptides - Selective Inhibitors of Cathepsin-B, in vitro. *FEBS Letters*. 1991 Mar 25;280(2):307-10.

Neurath H, Walsh KA, Winter WP. Evolution of Structure and Function of Proteases - Amino Acid Sequences of Proteolytic Enzymes Reflect Phylogenetic Relationships. *Science*. 1967;158(3809):1638-44.

Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *International Journal of Neural Systems*. 1997 Oct-Dec;8(5-6):581-99.

Pan ML, Bell WJ, Telfer WH. Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. *Science*. 1969 Jul 25;165(3891):393-4.

Perona R, Vallejo CG. The Lysosomal Proteinase of *Artemia* - Purification and Characterization. *European Journal of Biochemistry*. 1982;124(2):357-62.

Price DP, Nagarajan V, Churbanov A, Houde P, Milligan B, Drake LL, Gustafson JE, Hansen IA. The fat body transcriptomes of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*, pre- and post- blood meal. *PLoS One*. 2011;6(7):e22573.

Raikhel, A.S.; Lea, A.O. Previtellogenic development and vitellogenin synthesis in the fat body of a mosquito: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Tissue Cell*. 1983;15: 281-300.

Rey L. *Parasitologia*. 4th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Ribolla PEM, Bijovsky AT, de Bianchi AG. Procathepsin and acid phosphatase are stored in *Musca domestica* yolk spheres. *Journal of Insect Physiology*. 2001 Mar;47(3):225-32.

Ribolla PEM, Daffre S, de Bianchi AG. Cathepsin B and acid phosphatase activities during *Musca domestica* embryogenesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 1993;23(2):217-23.

Ribolla PEM, de Bianchi AG. Processing of procathepsin from *Musca domestica* eggs. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 1995 Oct;25(9):1011-7.

Roth, T.F.; Porter, K.R. Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito *Aedes aegypti*. *L. J. Cell Biol*. 1964; 20: 3113-32.

Sappington TW, Raikhel AS. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 1998 May-Jun;28(5-6):277-300.

Say T. Descriptions of dipterous insects of the United States. *Journal of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. 1823;3:9–54.

Shimeld SM. Gene function, gene networks and the fate of duplicated genes. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 1999 Oct;10(5):549-53.

Snigirevskaya ES, Hays AR, Raikhel AS. Secretory and internalization pathways of mosquito yolk protein precursors. *Cell and Tissue Research*. 1997 Oct;290(1):129-42.

Snigirevskaya ES, Sappington TW, Raikhel AS. Internalization and recycling of vitellogenin receptor in the mosquito oocyte. *Cell and Tissue Research*. 1997 Oct;290(1):175-83.

Tallan HH, Jones ME, Fruton JS. On the proteolytic enzymes of animal tissues. X. Beef spleen cathepsin C. *Journal of Biological Chemistry*. 1952 Feb;194(2):793-805.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 1994 Nov 11;22(22):4673-80.

Tufail M, Takeda M. Molecular characteristics of insect vitellogenins. *Journal of Insect Physiology*. 2008;54(12):1447-58.

Turell MJ. Members of the *Culex pipiens* Complex as Vectors of Viruses. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2012 Dec;28(4):123-26.

Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, Turk D. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012 Jan;1824(1):68-88.

Willstätter R, Bamann E. Über die Proteasen der Magenschleimhaut. *Z. physiol. Chem.* 1928;180:127.

Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU). [cited 2013 oct 20]. Available from: <http://www.wrbu.org/>

Yamamoto Y, Takahashi SY. Cysteine proteinase from *Bombyx* eggs: role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 1993 Sep;106(1):35-45.

ANEXO A - Tabela completa do resultado obtido pela espectrometria de massas.

Banda A										
	Transcrito	N° Acesso Vector/Base	Peptídeos	Probabilidade		Score	Coverage		MW	Sp
				P (pro)	P (pep)		XC	DeltaCn		
1	cathepsin B [<i>Culex quinquefasciatus</i>]	CPUJ 015762	K.GVSSGGPYNSK.Q	3,23E-06		40,15	13,30		39412,9	
			R.HVTGPLEGGHAIK.I		4,22E-02	2,71	0,22		1021,1	
			R.VAYSVVADEHRI		3,94E-05	2,81	0,29		1237,6	
			R.VAYSVVADEHRI		3,23E-06	2,38	0,31		580,9	
			KEDIDLPEQFDAR.D		3,68E-05	2,23	0,32		549,7	
2	cathepsin B [<i>Culex quinquefasciatus</i>]	CPUJ 015761	R.VAYSVSQDEERI	5,83E-05		40,14	9,70		38160,3	
			K.DHIVLPER.F		5,83E-05	2,62	0,28		595,9	
			R.DRWPECTSLK.Q		8,19E-03	2,22	0,00		588,0	
			K.DHIVLPERFDAR.D		2,03E-01	2,00	0,06		402,1	
					6,11E-02	2,27	0,06		580,2	
3	ribose-5-phosphate isomerase [<i>Culex quinquefasciatus</i>]	CPUJ004258	K.AYFGLADGSVIER.S	3,07E-06		10,17	5,50		25372,3	
4	cathepsin I [<i>Aedes aegypti</i>]	AAEL006389	K.HGPLSIADAGHK.S	1,31E-04		20,18	4,30		61172,4	
			K.DELPESLDWRI		6,51E-04	2,47	-		774,1	
5	cathepsin I [<i>Culex quinquefasciatus</i>]	CPUJ017344	K.HGPLSIADAGHK.S	1,31E-04		20,18	3,80		61956,0	
6	Anopheles gambiae str. PEST AGAP012900-PA [<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST]	AGAP012900	R.NYYLWVR.Y			1,86	0,02		353,9	
			K.HGPLSIADAGHK.S	1,31E-04	10,18	9,60		15068,0		
7	cathepsin L [<i>Ochlerotatus atropalpus</i>]	ABE72974.1*	K.HGPLSIADAGHK.S	1,31E-04		10,18	4,20		35394,8	
8	Anopheles gambiae str. PEST AGAP012577-PA [<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST]	AGAP012577	K.HGPLSIADAGHK.S	1,31E-04		3,57	-		1387,3	
			K.HGPLSIADAGHK.S	1,31E-04	10,18	2,40		61985,9		
9	cathepsin I [<i>Culex tarsalis</i>]	ACJ64302.1*	K.HGPLSIADAGHK.S	1,31E-04		10,18	10,40		13790,6	
Banda B										
1	OV-16 antigen [<i>Culex quinquefasciatus</i>]	CPUJ010028	K.VSYASGVSVNEGNETPK.Q	4,54E-06		10,15	8,50		23234,8	
2	glutathione S-transferase 1-6 [<i>Culex quinquefasciatus</i>]	CPUJ002661	R.LFFDQGTLYQR.F	1,06E-04		20,13	3,20		82359,4	
			R.FADYFYPQIFAK.Q		1,23E-03	2,69	0,23		1168,2	
3	ribose-5-phosphate isomerase [<i>Culex quinquefasciatus</i>]	CPUJ004258		7,62E-04		2,50	-		495,6	
			K.AYFGLADGSVIER.S		7,62E-04	10,11	5,50		25372,3	
						2,22	0,29		695,5	