

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Centro de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

A UDP-*N*-acetilglicosamina pirofosforilase de *Rhodnius prolixus*
como possível alvo da ação do Jaburetox

Dissertação de Mestrado

Monique Siebra Krug

Porto Alegre, agosto de 2016

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Centro de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

A UDP-*N*-acetilglicosamina pirofosforilase de *Rhodnius prolixus*
como possível alvo da ação do Jaburetox

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Monique Siebra Krug

Orientadora: Dra. Fernanda Stanisçuaski

Co-orientador: Dr. Leonardo Luis Fruttero

Porto Alegre, agosto de 2016

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Proteínas Tóxicas, localizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBiot/UFRGS), sob orientação da Dra. Fernanda Stanisçuaski e co-orientação do Dr. Leonardo Luis Fruttero. Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Banca Examinadora

Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira

Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Dr. Carlos Peres Silva

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal
de Santa Catarina

Dr. Charley Christian Staats

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul

Dr. Rodrigo Ligabue-Braun

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul
(Revisor e membro suplente)

Dedicatória

Ao Gabriel Cury Perrone, por tudo e muito mais.

À Dagny Taggart, que me ensinou que tudo só acaba quando termina.

À amiga Bruna Dalcin Baldasso. Valeu de novo, guria.

Ao grande amigo Lucas Amaral Santurio, por me mostrar que heróis existem de verdade.

Às mulheres fortes da minha vida – minha mãe, Sizéli, e minhas avós Anita, Zilé e Maria Aparecida –, por terem me fornecido a garra genética e cultural, que espero levar para sempre comigo.

Agradeço às minhas orientadoras, as Professoras Fernanda Staniçuaski e Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini, e aos meus co-orientadores, Leonardo Luis Fruttero, Rafael Real-Guerra e Natalia Moyetta (embora os dois últimos não oficialmente) pela oportunidade e pela orientação durante esses dois anos.

Agradeço também aos colegas do Laprotox, em especial às Dras. Fernanda Cortez Lopes e Anne Helene Martinelli, ao Dr. Rodrigo Ligabue-Braun e ao Vander Chagas (vulgo Tinoko) pelas inúmeras consultas que fiz, e que foram sempre muito bem recebidas.

À Natalia Sommer, muito obrigada por toda ajuda durante esse tempo.

Aos colegas do CBiot, que frequentemente nos quebram galhos e que mantêm o CBiot funcionando.

Meu sincero muito obrigada à minha mãe (mais uma vez) e ao meu pai, Sebastião. Obrigada por estarem comigo de novo nessa.

Aos meus segundos pais, Selma e Luiz Francisco Perrone, por todas as longas conversas, pela convivência e por terem comemorado comigo desde o início dessa história.

À Ana Cláudia Mércio Loredo. Demos boas risadas juntas. Meu sincero muito obrigada.

À Simone Contu, que também comemorou comigo e me ajudou no caminho de mais essa vitória.

Não que eu estivesse esquecendo, mas chegou a hora de vocês na lista: aos colegas Gabriela Prado Paludo e Fábio Carrer Andreis. Obrigada pela companhia novamente.

Aos amigos Josiane Salazar e Gabriel Moraes: muito obrigada pela companhia ao longo do caminho.

Às minhas irmãs de criação, Sophia Gabellini Bohne e Ana Carolina Thomé Lutz: adoro dividir vitórias rindo com vocês. Amo as duas <3

Por fim, aos Colegas de LabCel, Carine Beatrici, Aline Lütz, Gisele Campos, Gabriel Perrone (novamente), e João Dinis. Afinal de contas, isso começou com vocês.

13
Vln. 

17
Vln. 

20
Vln. 

Kristen Anderson-Lopez e Robert Lopez

Sumário

Lista de abreviaturas	ix
Lista de figuras e tabelas	x
Resumo.....	xii
Abstract	xiv
1. Introdução	16
1.1. Jaburetox e suas origens	16
1.2. UAP.....	19
1.3. <i>Rhodnius prolixus</i>	23
2. Objetivos	26
2.1. Objetivos Gerais	26
2.2. Objetivos Específicos.....	26
3. Materiais e Métodos	27
3.1. Insetos.....	27
3.2. Ensaio de alimentação.....	27
3.3. Dissecção	28
3.4. Atividade enzimática específica da UAP	28
3.5. Extração de RNA total	29
3.6. Síntese de cDNA para expressão gênica	30
3.7. Análise da expressão gênica.....	30
3.8. Síntese de cDNA e primers para clonagem	31
3.9. Processo de clonagem e análise da expressão.....	32
3.10. Sequências.....	35
3.10.1. cDNA.....	35
3.10.2. Aminoácidos.....	35
3.11. Análises filogenéticas	36
3.12. Análises estatísticas.....	36
4. Resultados e discussão	37
4.1. Determinação da dose de toxinas ingerida pelos barbeiros.....	37
4.2. Atividade específica da UAP em órgãos de barbeiros.....	39
4.3. Análise da expressão gênica.....	41
4.4. Clonagem da UAP de <i>R. prolixus</i>	50
4.5. Análise filogenética da UAP de insetos	55
5. Conclusões finais	58

6. Perspectivas	59
7. Referências bibliográficas	60
8. Apêndice.....	71
8.1. Anotação de sequências da UAP de insetos no UniProt.....	71
8.2. Alinhamento das sequências utilizadas na análise filogenética.....	73

Lista de abreviaturas

cDNA: DNA complementar

cGMP: Monofosfato de guanidina cíclico

CNTX: Canatoxina

E.C.: Classificação enzimática (*Enzyme Commission number*)

Jbtx: Jaburetox

JBU: Urease majoritária de *Canavalia ensiformis* (do inglês *jack bean urease*)

JBURE-II: Isoforma de urease de *Canavalia ensiformis* (do inglês *Jack bean urease II*)

GPI: Glicosilfosfatidilinositol livres

GPIA: Âncoras de glicosilfosfatidilinositol

PCR: Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

qPCR: PCR quantitativo

rUAP: UAP recombinante

SNC: Sistema nervoso central

UAP: UDP-*N*-acetilglicosamina pirofosforilase

UDP-GlcNac: UDP-*N*-acetilglicosamina

UTP: Trifosfato de uridina

Lista de figuras e tabelas

Figura 1. *Canavalia ensiformis*.

Figura 2. Rota da biossíntese de quitina.

Figura 3. Estágios de desenvolvimento do triatomíneo *Rhodnius prolixus*.

Figura 4. Processo de alimentação de *R. prolixus*.

Figura 5. Processo de alimentação artificial de *R. prolixus*.

Figura 6. Massa dos barbeiros *R. prolixus* antes e após alimentação com salina.

Figura 7. Atividade enzimática da enzima UAP em órgãos de *R. prolixus*.

Figura 8. Perfil de expressão gênica da UAP em órgãos de *R. prolixus*.

Figura 9. Efeito do Jbtx na expressão da UAP em órgãos de *R. prolixus*.

Figura 10. Efeito da JBU na expressão da UAP em órgãos de *R. prolixus*.

Figura 11. Perfil de expressão gênica da quitina sintase em órgãos de *R. prolixus*.

Figura 12. Efeito do Jbtx na expressão da quitina sintase em órgãos de *R. prolixus*.

Figura 13. Efeito da JBU na expressão da quitina sintase em órgãos de *R. prolixus*.

Figura 14. Confirmação da clonagem do gene da UAP no vetor pET-15b.

Figura 15. Mutações entre as sequências da UAP.

Figura 16. Análise da purificação da rUAP por SDS-PAGE.

Figura 17. Árvore filogenética das UAPs de insetos.

Tabela 1. Comparação entre as estruturas das três ureases de *C. ensiformis*.

Tabela 2. Sequência dos primers utilizados nos experimentos de qPCR em tempo real.

Tabela 3. Sequência dos primers utilizados na clonagem da UAP de *R. prolixus*.

Tabela 4. Anotação de sequências de *Aedes aegypti* e *R. prolixus* no VectorBase.

Tabela S1. Lista final de sequências da UAP utilizadas na análise filogenética.

Resumo

Jaburetox (Jbtx) é um peptídeo de 10 kDa derivado de uma das isoformas de urease de *Canavalia ensiformis*. Em um estudo anterior realizado com o triatomíneo vetor da doença de Chagas *Triatoma infestans*, esse peptídeo foi encontrado interagindo com a proteína UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase (UAP), alterando também sua atividade enzimática no sistema nervoso central, *in vivo* e *in vitro*. A UAP já foi encontrada em eucariotos, bactérias e vírus, estando relacionada com as rotas de produção de quitina, N-glicosilação e síntese de glicoinositolfosfolipídeos. Assim, o presente trabalho tem três objetivos: i) investigar o efeito de Jbtx sobre a atividade enzimática e a expressão gênica da UAP do inseto modelo *Rhodnius prolixus*, ii) clonar e expressar a UAP e iii) estudar a UAP filogeneticamente. Para a primeira parte, foram avaliados, no triatomíneo *R. prolixus*, a atividade enzimática da UAP e o perfil de expressão dessa enzima e da quitina sintase em insetos controles e alimentados com Jbtx. Para a segunda, o cDNA da enzima de *R. prolixus* foi clonado em vetor pET-15b e expressado em *Escherichia coli* Rosetta 2. A purificação da enzima recombinante foi feita por cromatografia de afinidade a níquel. Para a terceira parte, foram buscadas sequências de aminoácidos homólogas às da UAP de *R. prolixus* no servidor pHmmer e foi construída uma árvore filogenética com o método de Máxima Verossimilhança. Os resultados obtidos indicam que o Jbtx aumenta a atividade enzimática da UAP em glândulas salivares, corpo gorduroso e epiderme, enquanto diminui a expressão da UAP em intestino médio anterior, túbulos de Malpighi, glândulas salivares, corpo gorduroso, epiderme e sistema nervoso central, assim como a expressão da quitina sintase nos mesmos órgãos e no intestino médio posterior. Foi obtida uma UAP recombinante de 56 kDa, compatível com peso molecular previsto *in silico*. A árvore filogenética construída contém 40 sequências, sendo 38 de insetos e 2 sequências de grupo externo. A árvore segue o padrão de evolução dos insetos e foi identificado um novo organismo com potenciais dois genes codificantes de UAP. Esse trabalho apresenta a primeira evidência de que Jbtx altera a expressão gênica em *R. prolixus*. O resultado obtido pela análise filogenética indica que a UAP é uma enzima ancestral à diversificação em Insecta.

Palavras-chave: UDP-*N*-acetilglicosamina pirofosforilase, UAP, Jaburetox, *Rhodnius prolixus*.

Abstract

Jaburetox (Jbtx) is a 10 kDa peptide derived from a urease isoform of *Canavalia ensiformis*. In a previous work with the triatomine vector of Chagas' disease *Triatoma infestans*, this peptide was found interacting with the protein UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase (UAP), also increasing the UAP enzymatic activity in the central nervous system *in vivo* and *in vitro*. UAP has been described in eukaryotes, bacteria and virus, and is involved in chitin production, N-linked glycosylation and glyco inositol phospholipids synthesis pathway. Thus, the present work has three main aims: i) to understand the effect of Jbtx on this enzyme on the model insect *Rhodnius prolixus*, ii) to clone and express UAP and iii) to study UAP from a phylogenetic point of view. Firstly, UAP enzymatic activity and its expression profile, as well as the chitin synthase expression, were analysed in the triatomine *R. prolixus* in saline- or Jbtx-fed insects. Secondly, the cDNA from *R. prolixus*' UAP was cloned into the pET-15b vector and expressed in *Escherichia coli* Rosetta 2. The recombinant enzyme was purified through a nickel affinity chromatography. Thirdly, homolog sequences to *R. prolixus*' UAP were searched in pHmmer database and a phylogenetic tree was built using the Maximum Likelihood method. The results obtained indicate that Jbtx increases UAP enzymatic activity in salivary glands, fat body and epidermis, while decreasing UAP's expression in the anterior and posterior midgut, Malpighian tubules, salivary glands, fat body, epidermis and central nervous system, as well as the chitin synthase expression in the same organs and the posterior midgut. A 56 kDa recombinant UAP was obtained, in agreement with the *in silico* estimated size. The phylogenetic tree built has 40 sequences, from which 38 are from insects and 2 are from mammals (external group). The tree follows the insect evolution patterns and a new organism containing two potential UAP coding genes was identified. This work presents the first evidence that Jbtx is able to interfere in the gene expression in *R. prolixus*. The results obtained through phylogenetic analysis shows that UAP is an enzyme ancestral to the diversification in Insecta.

Key words: UDP-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylase, UAP, Jaburetox, *Rhodnius prolixus*.

1. Introdução

1.1. Jaburetox e suas origens

Jaburetox (Jbtx) é um peptídeo recombinante derivado de uma das isoformas de urease da planta *Canavalia ensiformis* - o popular feijão-de-porco (Figura 1) (*Jack Bean* em inglês) (Stanisçuaski e Carlini 2012). Ureases (E.C. 3.5.1.5) são enzimas que catalisam a hidrólise de ureia em amônia e dióxido de carbono e estão presentes em plantas, fungos e bactérias, mas não em animais (Carlini e Ligabue-Braun 2016). *C. ensiformis* possui pelo menos três isoformas dessa enzima: a urease majoritária (JBU, do inglês *Jack bean urease*), a canatoxina (CNTX) e JBURE-II (isoforma II de urease de *Canavalia ensiformis* - do inglês *Jack bean urease II*). Estas isoformas apresentam características distintas, como tamanho, estado de oligomerização e interação com outras moléculas (Sumner 1926; Carlini e Guimarães 1981; Takishima et al. 1988; Pires-Alves et al. 2003; Carlini e Ligabue-Braun 2016).



Figura 1. *C. ensiformis*. Em A, partes aéreas e vagens da planta madura e, em B, as sementes. Fonte: A <https://feijaodeporco.wordpress.com/2012/05/30/plantas-feijao-de-porco/> e B. <http://www.ufrgs.br/laprottox/o-que-fazemos/linhas-de-pesquisa/canatoxina>.

Inicialmente, Carlini e Guimarães começaram investigando as propriedades de uma toxina da *C. ensiformis*: a CNTX, uma proteína de 88 kDa que, quando injetada em camundongos, apresentava uma ação tóxica, ao contrário de quando esses animais

eram alimentados com essa toxina. Os animais injetados intraperitonealmente apresentavam diversas alterações neurológicas causadas pela administração da toxina, tais como dispneia, ataxia, hipotermia, coma, convulsões e morte (Carlini e Guimarães 1981). Ainda, animais injetados intravenosamente apresentavam os efeitos em menor tempo e animais submetidos a um procedimento para impossibilitar a ligação do Sistema Nervoso Central (SNC) com a medula não apresentavam efeitos convulsivos, sugerindo fortemente a atuação dessa toxina no SNC (Carlini et al. 1984).

Carlini e colaboradores continuaram investigando possíveis mecanismos de ação da CNTX, mostrando que esta é capaz de se ligar a gangliosídeos, ativar e agregar plaquetas de coelhos, porquinhos-da-índia e humanos através da via das lipoxigenases (Carlini et al. 1985). Além disso, foi demonstrado que a injeção intravenosa de CNTX, tanto em ratos quanto em camundongos, altera significativamente os níveis de glicose no sangue dos animais, o que foi posteriormente relacionado com o efeito tóxico que a CNTX tem no SNC (Ribeiro-DaSilva et al. 1986). Plaquetas, ilhotas pancreáticas e sinaptossomos de coelhos apresentam alterações de funcionamento quando tratadas com CNTX, efeito revertido por inibidores da via das lipoxigenases (Barja-Fidalgo et al. 1991). A CNTX causa edema em patas de rato, salientando o papel dose-dependente e inflamatório da toxina, o qual se mostrou diretamente relacionado com a migração de macrófagos e neutrófilos em ratos (Barja-Fidalgo et al. 1992; Benjamin et al. 1992). Posteriormente, demonstrou-se que a CNTX impede o acúmulo de cálcio no retículo sarcoplasmático (Alves et al. 1992) e causa influxo desses íons para ativar a via das lipoxigenases em plaquetas de coelho (Ghazaleh et al. 1997).

Além da atividade neurotóxica da CNTX demonstrada em mamíferos, esta proteína também apresenta atividade inseticida. Carlini et al. (1997) investigaram pela primeira vez a ação tóxica da CNTX em insetos, mostrando que somente insetos que possuem enzimas do tipo catepsinas em seu trato digestório são susceptíveis à CNTX, enquanto insetos com enzimas digestórias do tipo tripsina são resistentes. A ativação proteolítica da toxina por enzimas do tipo catepsina foi demonstrada, sugerindo fortemente que o principal efeito inseticida era causado por uma porção da toxina, e não por ela intacta (Carlini et al. 1997). Novas evidências sobre a ativação da CNTX por enzimas do tipo catepsinas foram relatadas por Ferreira-DaSilva e colaboradores. Nesse

estudo, os autores mostraram que podiam-se encontrar peptídeos derivados da CNTX na hemolinfa de *Rhodnius prolixus* após administração oral da toxina. A digestão *in vitro* da CNTX com enzimas de *Callosobruchus maculatus* produziu peptídeos entre 8 e 12 kDa que eram tóxicos inclusive quando injetados em *R. prolixus*, o que não ocorria com a CNTX íntegra, confirmando que a toxicidade e letalidade da CNTX era causada por seus peptídeos derivados (Ferreira-DaSilva et al. 2000). Ainda, um peptídeo de 10 kDa derivado da CNTX, bem como a toxina íntegra, mostrou-se letal para o hemíptero *Dysdercus peruvianus*, ressaltando a importância de peptídeos derivados no mecanismo de toxicidade da CNTX (Stanisçuaski et al. 2005). Existem evidências de que a JBU é encontrada intacta e enzimaticamente ativa na hemolinfa de insetos alimentados, o que leva à mecanismos de ação diferentes dos mediados pelos peptídeos derivados (Stanisçuaski et al. 2010).

Em 2007, foi desenvolvido um peptídeo recombinante homólogo ao peptídeo tóxico (10 kDa) derivado da CNTX, chamado Jaburetox (Jbtx), que foi amplificado a partir da sequência N-terminal da isoforma JBURE-II. Esse peptídeo recombinante apresenta atividade tóxica para insetos, inclusive aos não suscetíveis a JBU e CNTX (Mulinari et al. 2007; Tomazetto et al. 2007). Posteriormente, estudos começaram a elucidar os possíveis mecanismos pelos quais Jbtx exercia sua toxicidade, descrevendo que esse peptídeo atuaria como desestabilizador de membranas biológicas (Barros et al. 2009; Piovesan et al. 2014), além de afetar vias metabólicas envolvendo cálcio, eicosanoides, serotonina e cGMP (monofosfato de guanidina cíclico), causando, através dessas vias, uma desregulação no balanço hídrico em túbulos de Malpighi, quando testado *in vitro* (Stanisçuaski et al. 2009; Defferrari et al. 2014a; 2014b). Esse efeito se mostrou independente da sinalização por peptídeos anti-diuréticos (Paluzzi et al. 2012).

Jbtx pode ser dividido estruturalmente em três regiões: N-terminal, grampo beta e C-terminal, dos quais apenas a porção N-terminal relaciona-se com os mecanismos de entomotoxicidade ou com a alteração de membranas (Martinelli et al. 2014). Através de experimentos envolvendo bicamadas lipídicas planares e ensaios eletrofisiológicos, foi mostrado que a formação de canais membranares pelo peptídeo é voltagem-dependente e que seus mutantes com domínios deletados (os mesmos utilizados no trabalho de Martinelli) apresentam atividade diferentes do peptídeo íntegro (Piovesan

et al. 2014). Esses dois estudos reforçam a importância do Jbtx como peptídeo que interage com membranas. Lopes e colaboradores, em 2015, publicaram as primeiras evidências baseadas em modelagem *in silico*, dicroísmo circular e ressonância magnética nuclear de que o peptídeo Jbtx seria intrinsecamente desordenado quando em solução, mas possivelmente assumiria uma estrutura específica quando em contato com algum alvo molecular (Lopes et al. 2015).

Galvani e colaboradores injetaram barbeiros da espécie *Triatoma infestans* com Jbtx. Observando os efeitos, os pesquisadores notaram alterações nos movimentos de patas e antenas, o que poderia estar relacionado com a ação neurotóxica desse peptídeo em áreas específicas do SNC. Em ensaios de imunohistoquímica no SNC de animais injetados, a presença de Jbtx foi constatada próxima a área dos lobos antenais, e, ao realizarem uma co-immunoprecipitação com anticorpos para Jbtx seguida de eletroforese bidimensional, foi identificada uma proteína de 59 kDa que foi submetida a análise por espectrometria de massas. Esta análise identificou a enzima UDP-*N*-acetilglicosamina pirofosforilase (UAP). Homogeneizados de SNC tratados com Jbtx *in vivo* ou *in vitro* apresentaram atividade aumentada para a UAP em uma maneira dose dependente. No mesmo trabalho, os autores também identificaram que Jbtx diminui a atividade da enzima óxido-nítrico-sintase, envolvida na sinalização nitrinérgica (Galvani et al. 2015).

1.2. UAP

UAPs (E.C. 2.7.7.23) são enzimas responsáveis por realizar a catálise de uridina trifosfato e *N*-acetilglicosamina fosfato para formar o composto UDP-*N*-acetilglicosamina (UDP-GlcNac - a forma biologicamente ativa de *N*-acetilglicosamina) com liberação de um pirofosfato, em uma proporção de um para um. Essas enzimas já foram encontradas em vírus, bactérias e eucariotos (Maruyama et al. 2007; Stokes et al. 2008; Fang et al. 2013; Piacente et al. 2014) e desempenham papel chave na produção de quitina, glicosilação de proteínas, produção de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e metabólitos secundários, estando relacionadas com a viabilidade de fungos, bactérias, protozoários e insetos (Mio et al. 1998; 1999; Tønning et al. 2006; Maruyama

et al. 2007; Stokes et al. 2008; Arakane et al. 2011; Fang et al. 2013; Liu et al. 2013; Urbaniak et al. 2013; Yang et al. 2015).

A produção de quitina é um processo extremamente complexo, cuja rota (Figura 2) é bastante conservada entre os organismos (Merzendorfer 2011). Fungos e insetos, em particular, são dependentes dessa rota para sua sobrevivência, sendo que, em fungos, a quitina forma a base da parede celular e, em insetos, a quitina é encontrada

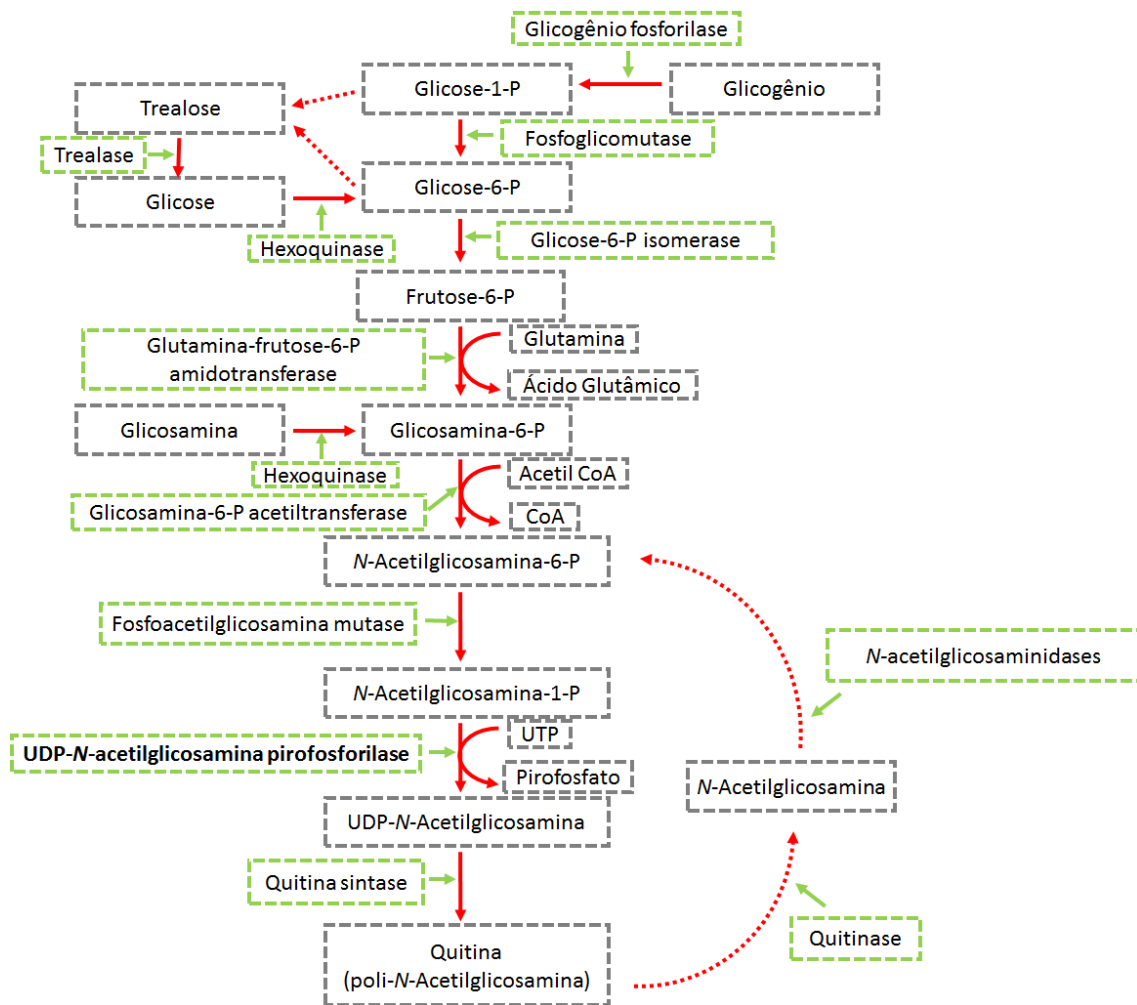


Figura 2. Rota da biossíntese de quitina. As caixas em cinza representam os metabólitos envolvidos na rota. Setas vermelhas indicam conversão de um metabólito para outro e setas vermelhas pontilhadas indicam a presença de mais passos nos processos que descrevem. As caixas em verde indicam as enzimas responsáveis por cada processo, bem como as setas em verde mostram o passo pelo qual a enzima é responsável. A enzima UAP está destacada em negrito. Figura adaptada de Merzendorfer, 2011.

na cutícula e é secretada por epitélios de origem ectodérmica (exoesqueleto, revestimento cuticular das traqueias, do intestino anterior, do intestino posterior e membrana peritrófica) (Merzendorfer 2006; 2011). Na maior parte dos organismos, a enzima determinante para a velocidade de produção de quitina parece ser tanto a quitina sintase – enzima que polimeriza os monômeros de UDP-*N*-acetilglicosamina, produzidos pela UAP –, quanto a glutamino-frutose-6-P amidotransferase, mas, em *Drosophila melanogaster*, Tonning e colaboradores mostraram que a UAP era determinante na velocidade de produção de quitina, apresentando papel vital no desenvolvimento embrionário dessas moscas (Tonning et al. 2006; Merzendorfer 2011).

A glicosilação de proteínas também é um processo complexo, envolvendo mais de uma organela e dezenas de enzimas específicas, que não existem em todos os organismos. Uma dessas enzimas específicas seria a UAP (Maruyama et al. 2007; Stokes et al. 2008; Wang et al. 2015; Yang et al. 2015). Em *D. melanogaster*, as moscas que não expressam a UAP apresentam defeitos na glicosilação de proteínas, embora ainda sejam encontradas proteínas glicosiladas (Tonning et al. 2006). Em um trabalho com *Tribolium castaneum*, foi mostrado que a UAP era expressa também nos tecidos que não produziam quitina, o que foi relacionado com a participação dessa enzima nos processos de glicosilação de proteínas. Ao contrário do ocorrido para as moscas, os indivíduos com defeitos nesse processo morriam (Arakane et al. 2011). Em humanos, a UAP é essencial para a N-glicosilação e há uma superexpressão dessa enzima em células de câncer de próstata tratadas com fármacos inibidores de glicosilação, atuando como um mecanismo de defesa para o tumor (Itkonen et al. 2014). O parasita *Trypanosoma brucei* também parece ter seus processos de glicosilação altamente ligados com a atividade da UAP, além de não serem viáveis sem a participação dessa enzima no seu metabolismo (Stokes et al. 2008).

Âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPIA) são moléculas compostas por fosfolipídeos, resíduos de açúcares e um grupamento inositol, encontradas ancoradas na membrana plasmática celular, geralmente na face externa. Proteínas ancoradas à membrana por GPIA podem desempenhar diversas funções celulares, servindo como receptoras específicas, moléculas de adesão ou catalisadoras de processos que ocorrem na membrana (Tartakoff e Singh 1992; Kinoshita 2014). Estudos indicam que

Trypanosoma spp. fazem amplo uso desse recurso para funções mais diversas, como, por exemplo, comunicar-se com o sistema imune do organismo, além de também utilizarem moléculas de glicosilfosfatidilinositol em estado livre como mensageiros (De Lederkremer e Bertello 2001; DosReis et al. 2002; Hong e Kinoshita 2009; Serna et al. 2014). Nos poucos artigos lidando com o assunto na literatura, especula-se que a UAP seja essencial para a síntese dessas GPIA. Stokes e colaboradores mostraram que a atividade da UAP é essencial para a produção de GPIA em *T. brucei* e que a rota de síntese desses metabólitos é priorizada em condições de privação de GlcNac (Stokes et al. 2008).

A relevância biológica de UDP-GlcNac não está restrita apenas às três rotas já descritas (síntese de quitina, proteínas glicosiladas ou GPIA). O protozoário *Giardia intestinalis* possui intensa atividade da UAP devido à necessidade de UDP-GlcNac para a formação da parede do cisto, condição obrigatória para o processo de infecção no hospedeiro (Macechko et al. 1992; Bulik et al. 1998; Bulik et al. 2000; Lopez et al. 2003; Mok et al. 2005; Mok e Edwards 2005). UAPs também foram descritas como enzimas capazes de ser reconhecidas como antígenos pelo sistema imunológico em quadros de sarcoidose (Yorozu et al. 2015) e como reguladoras de senescência e defesa em arroz (Wang et al. 2015). Estas muitas características da UAP a tornaram um possível alvo para controle biológico, principalmente no caso de micro-organismos (Maruyama et al. 2007; Stokes et al. 2008; Fang et al. 2013; Santos Junior et al. 2013; Edwards et al. 2015; Patin et al. 2015).

As UAPs são enzimas vitais na fisiologia dos insetos. Geralmente, insetos apresentam uma única cópia funcional do gene da UAP, mas já foram descritas duas espécies contendo mais de uma sequência codificante: *T. castaneum* e *Locusta migratoria* (Arakane et al. 2011; Liu et al. 2013). Em *L. migratoria*, foram encontradas duas isoformas diferentes de UAP, uma essencial para o desenvolvimento do organismo e a outra não, conforme foi confirmado por experimentos de silenciamento gênico (Liu et al. 2013). Em *T. castaneum*, também foram encontradas duas cópias que, quando silenciadas, eram letais para os indivíduos. Isso foi relacionado com o fato de as duas isoformas mostrarem padrões distintos de expressão tecidual e uma certa especialização de funções, estando *TcUAP1* mais relacionada com a produção de quitina

para a cutícula e a matriz peritrófica, enquanto TcUAP2 estaria mais relacionada com processo de glicosilação e metabólitos secundários (Arakane et al. 2011). Outras evidências mostram que UAP tem íntima relação com o desenvolvimento e funcionamento dos insetos e seus defeitos geralmente são letais para estes (Yang et al. 2015).

1.3. *Rhodnius prolixus*

R. prolixus é um inseto hemíptero da família Reduviidae e subfamília Triatominae. Triatomíneos, em geral, têm grande importância como vetores da doença de Chagas (Ons 2016), o que acontece devido a seus hábitos de alimentação hematófagos. Esses insetos, facilmente encontrados, acabaram ganhando diversos nomes populares, como “barbeiro”, “bicudo”, “chupança”, entre muitos outros nomes. Na língua inglesa, são popularmente conhecidos como *kissing bugs* (insetos beijoqueiros), o que remete a seus hábitos de alimentação (Schofield e Galvão 2009).

A distribuição geográfica do *R. prolixus* é bastante difusa, com presença do centro da América do Sul até o México (Galvão et al. 2003; Panzera et al. 2010; Gourbière et al. 2012). Uma das razões que leva essa espécie a ter uma dispersão tão grande é a sua adaptabilidade a ambientes domésticos (interior de casas e estruturas de construção humana) e silváticos (ambientes intermediários ao doméstico e ao selvagem), o que torna possível que esses barbeiros transitem facilmente entre regiões (Gourbière et al. 2012). Para que se desenvolvam corretamente, esses insetos precisam de climas úmidos e com temperaturas variando entre 20 °C e 28 °C, estando presentes em ambientes de gramíneas e solos de florestas. Essa espécie apresenta fortes hábitos noturnos e permanece escondida de predadores durante o período de luz (Lorenzo 2013).

Esses insetos são hemimetábolos, ou seja, apresentam um desenvolvimento gradual sem apresentarem o estágio de pupa (Figura 3). Para os triatomíneos, o desenvolvimento ocorre em sete etapas: ovo, ninfas de primeiro a quinto estágio e adulto, que possui dois pares de asas e sistema reprodutivo, ambos funcionais (Gourbière et al. 2012).

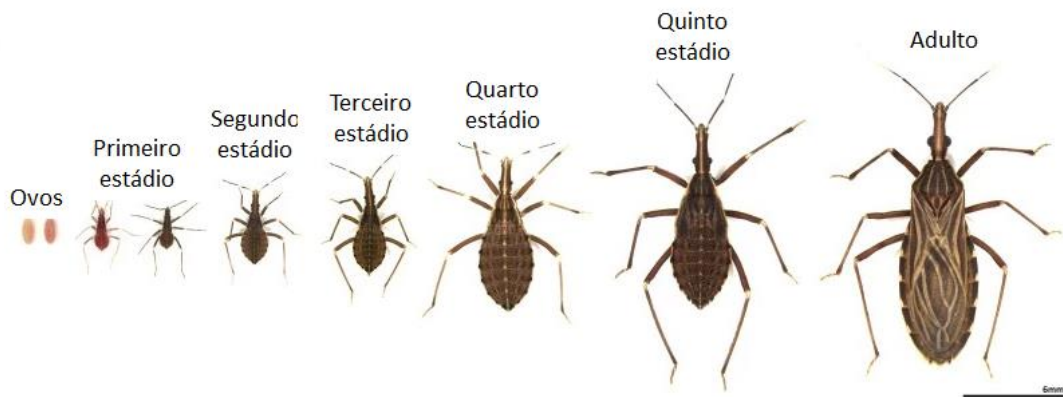


Figura 3. Estágios de desenvolvimento do triatomíneo *R. prolixus*. Da esquerda para direita, ninfa de primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto estágio e adulto, respectivamente. Modificado de <http://science-explained.com/blog/project/egg-immunity-in-the-kissing-bug-the-carrier-of-chagas-disease/>

Os ovos eclodem em ninfas de primeiro estágio e, para que possam trocar de estágio, os insetos precisam de pelo menos uma refeição de sangue, na qual podem ingerir mais de cinco vezes o seu peso, sendo que a capacidade relativa de ingestão varia a cada estágio (Figura 4) (Maddrell 1963). Em seguida à alimentação, os insetos excretam uma mistura de fezes e líquido, processo que pode se repetir mesmo após o processo de muda. A muda ocorre geralmente entre duas e três semanas, com variações dependendo do estágio, da linhagem utilizada, da procedência do sangue e aspectos ambientais (Lima Gomes et al. 1990).

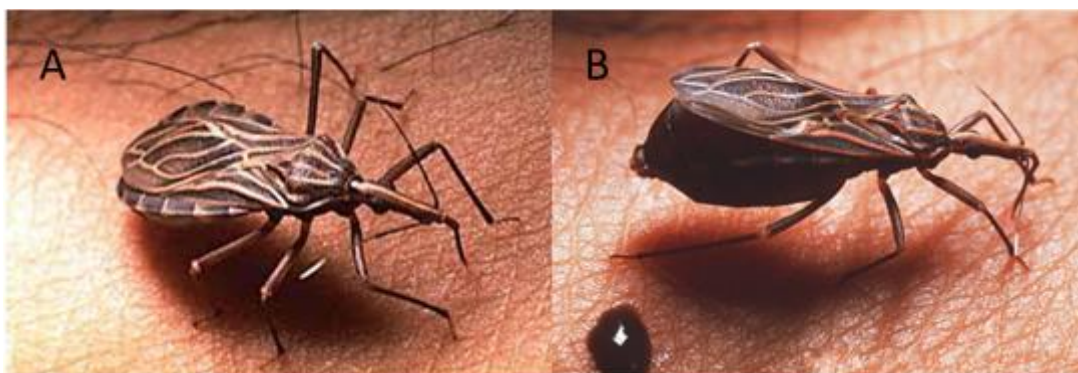


Figura 4. Alimentação de um *R. prolixus*. Em A, o inseto começa o processo de alimentação, de modo que o abdômen se encontra em um formato achatado e as asas encostadas no dorso do animal. Em B, após alguns minutos se alimentando, o abdômen do inseto se expande com o volume de líquido ingerido e a ponta das asas não encosta no dorso do animal. Fonte: A. <http://www.jyi.org/issue/the-fight->

for-recognition-chagas-disease-meets-controversy/ e B. <https://www.utm.utoronto.ca/main-news/research-excellence-award-winner-shares-his-findings-kissing-bug>.

Mais de um motivo fez com que essa espécie tivesse a importância que tem hoje. Primeiramente, essa espécie de barbeiro é um dos vetores mais relevantes na transmissão da Doença de Chagas, doença tropical causada pelo parasita *T. cruzi* que causa cardiomiopatia, megaesôfago e megacólon (Dias et al. 2002, Morrot et al. 2016). Além disso, há uma grande quantidade de estudos utilizando esses animais como modelos de pesquisa, pois é um inseto com um tamanho razoável e um ciclo de vida rápido (quando comparados a outros triatomíneos) (Lorenzo 2013; Ons 2016). Assim, podemos dizer que o *R. prolixus* é considerado um modelo para estudos de fisiologia de insetos há mais de 50 anos (Wigglesworth 1934; Wigglesworth 1936; Wigglesworth 1940; Wigglesworth 1940). *R. prolixus* foi o primeiro vetor de doenças parasitárias não díptero a ter seu genoma sequenciado (Mesquita et al. 2016). Usando-se essa espécie como modelo, foram desenvolvidos diversos estudos sobre neuropeptídeos de insetos (Ons 2016), comportamento e comunicação via ferômonios, ritmos circadianos (Steel e Vafopoulou 2006; Lorenzo 2013), mecanismos de transporte de íons e água (Coast 2009; Mesquita et al. 2016), gametogênese (Mesquita et al. 2016), diurese (Martini et al. 2007; Coast 2009; Paluzzi 2012) e estratégias de controle biológico (Hashimoto e Schofield 2012; Mougabure-Cueto e Picollo 2015).

Atualmente, nosso grupo tem utilizado o *R. prolixus* como modelo para entender os mecanismos de toxicidade do peptídeo Jbtx. Resultados preliminares mostraram que homogeneizados de glândulas salivares e SNC de *R. prolixus* incubados com Jbtx apresentaram um aumento da atividade da UAP, de acordo com o observado para *D. peruvianus* (Galvani et al. 2015).

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

O objetivo geral deste trabalho é compreender como a enzima UAP se relaciona com os mecanismos de toxicidade apresentados pelo Jbtx em insetos, além de realizar a caracterização desta enzima.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos são:

- Investigar o perfil de atividade enzimática da UAP em órgãos de *R. prolixus*;
- Analisar a expressão gênica da UAP e quitina-sintase de diferentes órgãos de *R. prolixus*;
- Investigar o efeito de Jbtx na atividade e expressão da UAP de *R. prolixus*;
- Clonar e expressar a UAP de *R. prolixus*;
- Analisar filogeneticamente a UAP.

3. Materiais e Métodos

3.1. Insetos

R. prolixus (Stal 1859) de todos os estágios foram gentilmente fornecidos pelo Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira e pelo Dr. Hatisaburo Masuda (Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro) e pela Dra. Patrícia Azambuja (Instituto Oswaldo Cruz). Os insetos foram mantidos em ambiente fechado, com temperatura de 27 ± 1 °C, umidade relativa 60%, com fotoperíodo de 12 horas em claro, 12 horas em escuro e alocados no Laboratório de Proteínas Tóxicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram separados de acordo com o seu estágio e alimentados com sangue humano (contendo 200 µL/10 mL de sangue de uma solução de 18,4 % de glicose, 16,5 % de citrato de sódio e 6 % de ácido cítrico m/v) (Garcia & Garcia 1977) em intervalos regulares de três semanas. Machos e fêmeas foram mantidos juntos.

O sangue foi coletado de voluntários hígidos que deram seu consentimento verbal, de acordo com o protocolo C.A.A.E. 12574513.5.0000.5347 (aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP).

3.2. Ensaios de alimentação

Para os ensaios de alimentação, ninfas do quinto estágio em jejum de 3 semanas, foram alimentados com solução salina de *R. prolixus* (cloreto de sódio 15 mM, cloreto de potássio 0,86 mM, cloreto de cálcio 0,2 mM, cloreto de magnésio 0,85 mM, HEPES 0,5 mM, bicarbonato de sódio 0,4 mM e glicose 34 mM), suplementada com 1 mM de ATP acrescida ou não de Jbtx ou JBU (dose de 0,1 µg/mg de inseto) (Martinelli et al. 2014). Esses ensaios foram realizados em placas de acrílico contendo a solução, cobertas com parafilme e aquecidas a 37 °C em mesa térmica. O recipiente contendo os insetos era coberto por um tecido e dispunham de 1 hora para se alimentar (Figura 5).

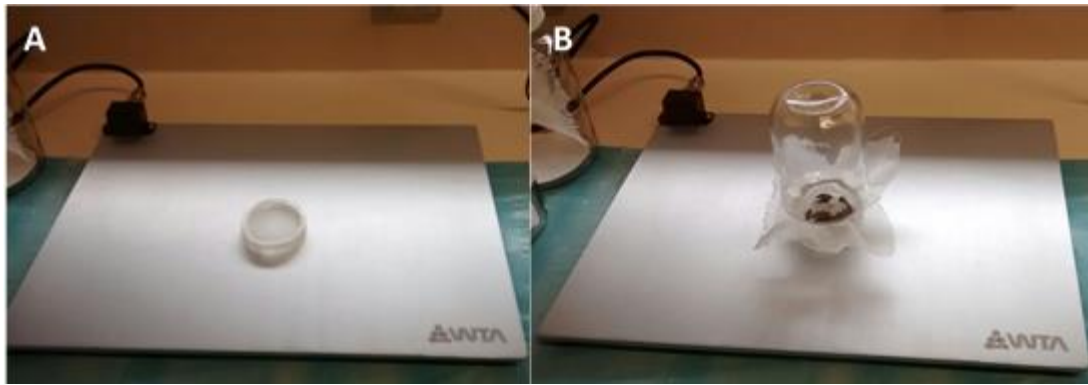


Figura 5. Processo de alimentação artificial. Em A, uma placa preparada para a alimentação. Em B, insetos se alimentando.

Para o acompanhamento estatístico, os insetos foram pesados individualmente imediatamente antes e após a alimentação.

3.3. Dissecção

Dezoito horas após o processo de alimentação, os insetos foram imobilizados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e esterilizados em álcool 70%. A dissecção foi feita separando-se o intestino médio anterior, o intestino médio posterior, túbulos de Malpighi, glândulas salivares, corpo gorduroso juntamente com epiderme e o sistema nervoso central. Durante a dissecção, os órgãos eram mantidos úmidos com uma solução de Tris, 0,1 M, estocados na mesma solução a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para os ensaios envolvendo a extração de RNA e armazenados com o coquetel de inibidores de protease *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma Aldrich), para os ensaios envolvendo atividade enzimática.

3.4. Atividade enzimática específica da UAP

Os órgãos de cinco insetos foram lavados 3 vezes com tampão A (Tris 500 mM, MgCl_2 100 mM, pH 7,5) com coquetel inibidor de protease, sendo posteriormente macerados em micro *potter* em 150 μL de tampão A a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O homogeneizado foi

centrifugado a 5000 x *g* por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante recuperado, remacerado e centrifugado novamente a 5000 x *g* por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e a quantificação de proteínas foi feita por absorbância em 280 nm, em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific).

A atividade enzimática da UAP foi feita seguindo o protocolo descrito por Mio et al (1998) com algumas modificações (Galvani et al. 2015). Sucintamente, 5 µg (em 10 µL) de proteína total de cada órgão foram colocados em quintuplicata em placas de 96 poços. A esses poços, foram adicionados 90 µL de uma mistura contendo tampão A (Tris 50 mM, MgCl₂ 10 mM), DTT (1 mM), glicerol (10% v/v), UTP (0,025 mM), *N*-acetilglicosamina (0,02 mM) e a enzima pirofosfatase (0,04 U/mL). A reação foi incubada a 37 °C por 15 minutos, seguida da adição de 100 µL de uma solução contendo malaquita verde (0,015%), molibdato de amônio (0,02%), Triton x-100 (0,025%) e ácido clorídrico (0,35 M). Após adicionada a solução de malaquita, a placa foi novamente incubada a 37 °C por 5 minutos e a absorbância monitorada em 655 nm. Uma unidade de UAP é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma absorbância de 1,00 A₆₅₅ em 20 minutos a 37 °C. Os brancos desse experimento foram feitos sem proteína ou sem UTP e *N*-acetilglicosamina.

3.5. Extração de RNA total

O RNA total foi extraído de órgãos de seis insetos utilizando-se o kit comercial PureLink® RNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific), seguindo-se as recomendações do fabricante. Brevemente, os órgãos foram lavados com PBS 1X e macerados em micro *potter* em 1,2 mL de tampão de lise a 4 °C. O macerado foi agitado em vórtex por 2 minutos e centrifugado a 12000 x *g* por 2 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi colocado na coluna de ligação para separação e eluição de RNA total, como recomendado pelo fabricante. O RNA total foi eluído pela adição (duas vezes) de 50 µL de água livre de RNase, quantificado por absorbância em 260 nm e estocado a -20 °C para posterior uso.

3.6. Síntese de cDNA para expressão gênica

Para a síntese de cDNA destinada aos experimentos de qPCR em tempo real, foi utilizado o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante, com primers Oligo dT₁₉. Resumidamente, foi adicionado a um tubo 100 ng de RNA total (em um volume correspondendo a 28,4 µL), 4 µL de primers Oligo dT a 5 µM, 4 µL de Buffer 10X, 1,6 µL de mix de dNTPs a 100 mM e 2 µL de transcriptase reversa a 50 U/µL, totalizando uma reação de 40 µL. A reação foi incubada por 10 minutos a 25 °C, 120 minutos a 37 °C e 5 minutos a 85 °C. O volume total da reação foi diluído 5 vezes e armazenado a -20 °C para uso posterior.

3.7. Análise da expressão gênica

A análise da expressão gênica foi feita no equipamento Eco Real-Time PCR System e *software* Eco (Illumina). Para esse experimento, 8 µL de cDNA diluído 5 vezes foram adicionados a cada poço, juntamente com 1 µL de primer *forward*, 1 µL de primer *reverse* e 10 µL de mix (kit *GoTaq® qPCR Master Mix*, Promega), contendo todos os reagentes necessários para a reação. Todas as amostras foram analisadas em quadruplicata com os seguintes parâmetros: um ciclo inicial de desnaturação (95 °C, por 2 minutos), seguido por 40 ciclos de desnaturação (95 °C, 10 segundos), anelamento (60 °C, 15 segundos) e extensão (72 °C, 15 segundos), e terminando em uma curva de *melting* (55 – 95 °C, com incrementos de 0,1 °C por segundo).

As sequências da UAP e quitina-sintase de *R. prolixus* foram obtidas através do BLAST das sequências homólogas de *Aedes aegypti* presentes no VectorBase (<https://www.vectorbase.org/>) (Giraldo-Calderón et al. 2015) (tabela 4). Com as sequências de *R. prolixus* foram projetados primers utilizando-se o programa *online* Primer BLAST NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Ye et al. 2012). Os primers para os genes da actina e fator de alongação 1 foram baseados em literatura

disponível (Majerowicz et al. 2011; Deferrari et al. 2014). As sequências de cada primer estão descritas na tabela 2.

Tabela 2. Sequência dos primers utilizados nos experimentos de qPCR em tempo real.

GENE	SEQUÊNCIA FORWARD (5'→3')	SEQUÊNCIA REVERSE (5'→3')
ACTINA*	CAGAGAAAAGATGACGCAGATAATG	CGGCCAAATCCAATCG
FATOR DE ALONGAMENTO 1*	GATTCCACTGAACCGCCTTA	GCCGGGTTATATCCGATTTT
UAP	GCGGAGCTAAAGTTGTGGAG	CATCGTTGTTACGCATTTTCAGC
QUITINA-SINTASE	CATGAAAGCAATGGTGGATGTTGTAGCAATTG	ACTGAATGTTTAGAGACATAGTTCTCCACC

* genes de referência

3.8. Síntese de cDNA e primers para clonagem

Como foi descrito no item 3.7., a sequência da UAP de *A. aegypti* foi utilizada para encontrar a sequência homóloga de *R. prolixus* a partir de um BLAST, para então projetar os primers que seriam necessários para o processo de clonagem. Utilizando-se o Primer BLAST NCBI e a partir da sequência do cDNA da UAP de *R. prolixus*, foram projetadas primers que amplificassem toda a sequência codificadora da UAP. A essas sequências dos primers, também foram adicionados sítios de clivagem das enzimas de restrição *NdeI* (primer *forward*) e de *BamHI* (primer *reverse*), visando a inserção no vetor escolhido. A sequência final de cada primer pode ser vista na Tabela 3.

Tabela 3. Sequência dos primers utilizados na clonagem da UAP de *R. prolixus*.

Forward (5' → 3')	GGCGGCATATGTCGGATATAAGTGAAATTACTGGATTTTTAAAAAGCT
Reverse (5' → 3')	CGCCGGATCCTCAGTTATTGTCGGTGGGAATTGGAAG

Em vermelho, estão representadas sequências adicionais acessórias para clivagem das enzimas escolhidas. Em negrito, estão representados os sítios de clivagem das enzimas *NdeI* (sequência *forward*) e *BamHI* (sequência *reverse*).

O cDNA utilizado como molde para a PCR direcionada ao processo de clonagem foi sintetizado a partir de 2 µg do mRNA total extraído de 5 insetos não alimentados. A reação de síntese foi realizada com kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis* (ThermoFisher Scientific), conforme as recomendações do fabricante. Sucintamente, foram adicionados a um tubo 2 µg de RNA total (em um volume correspondendo a 11 µL), 1 µL de primers Oligo dT (fornecido pelo fabricante), 4 µL de Buffer 5X, 2 µL de mix de dNTPs a 10 mM, 1 µL de inibidor de RNase a 20 U/µL e 1 µL de enzima a 200 U/µL, totalizando uma reação de 20 µL. A reação foi incubada por 60 minutos a 42 °C e 5 minutos a 70 °C. A amostra sintetizada foi armazenada a -20 °C para uso posterior e teve sua qualidade conferida por eletroforese em gel de agarose 1%, submetido a uma voltagem de 50 V por 60 minutos. Foi utilizado o padrão molecular Gene Ruler 1 kb (ThermoFisher Scientific).

3.9. Processo de clonagem e análise da expressão

O gene da UAP de *R. prolixus* foi amplificado por PCR, com os primers projetados para esse fim. Resumidamente, em um tubo foram adicionados 7 µL de cDNA, 5 µL de primer *forward* 5 µM, 5 µL de primer *reverse* 5 µM, 1 µL de dNTP 10 mM, 10 µL de HF Buffer 5X (ThermoFisher Scientific), 1 µL de DMSO (ThermoFisher Scientific), 0,5 µL de enzima Phusion 2 U/µL (ThermoFisher Scientific) e 20,5 µL de água Milli Q, totalizando 50 µL. A reação foi de um ciclo inicial de 30 segundos a 98 °C; 35 ciclos de 10 segundos

a 98 °C, 20 segundos a 58 °C e 60 segundos a 72 °C; um ciclo final de 10 minutos a 72 °C. O tamanho do produto da PCR foi conferido utilizando um padrão de peso molecular *Gene Ruler 1 kb* (ThermoFisher Scientific), através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, submetido a uma voltagem 150 V por 50 minutos. A banda de tamanho equivalente ao cDNA da UAP (1,5 kb) foi recortada do gel e purificada através do kit comercial *EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction* (BioBasic), de acordo com as recomendações do fabricante, e quantificada por absorvância em 260 nm. Para as clivagens, 10 µL de DNA ou vetor (1,5 µg) foram colocados em um tubo, juntamente com 3 µL da enzima *NdeI* 10 U/ µL (ThermoFisher Scientific), 3 µL da enzima *BamHI* 10 U/ µL (ThermoFisher Scientific) e 4 µL de Buffer Tango 10X (ThermoFisher Scientific), totalizando 20 µL. Essa reação foi mantida a 37 °C por 270 minutos e os produtos clivados foram purificados com o *EZ-10 Spin Column PCR Purification* (Bio Basic), de acordo com as instruções do fabricante.

O produto da clivagem foi quantificado e ligado em vetor pET-15b (Novagen) nos sítios correspondentes a *NdeI* e *BamHI*. Descrevendo o processo, 1,2 µL (40 ng) de DNA clivado foram colocados em um tubo, juntamente com 3 µL (50 ng) de vetor, 0,5 µL da enzima T4 ligase (Ludwig Biotecnologia), 1 µL de Buffer 10X (Ludwig Biotecnologia) e 4,3 µL de água Milli Q, totalizando 10 µL. Essa reação foi mantida a 4 °C *overnight*.

A reação de ligação foi utilizada para transformação de *Escherichia coli* DH5α, por choque térmico (gelo por 30 minutos, 42 °C por 45 segundos e gelo por mais 10 minutos). Foi então adicionado 1 mL de meio LB (Acumedia) e as bactérias foram incubadas por 1 hora a 37 °C, sob agitação. Após esse processo, as bactérias foram plaqueadas em LB ágar (Acumedia) com 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 37 °C *overnight*.

Colônias foram testadas para a presença do gene da UAP por PCR (mesma reação de amplificação do cDNA) e confirmadas por gel de agarose. Colônias positivas foram inoculadas em 25 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e mantidas a 37 °C e 200 rpm *overnight*. No dia seguinte, 5 mL de cada inóculo foram utilizados para extração de DNA plasmidial com o kit comercial *Pure Link Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen). O DNA plasmidial obtido foi quantificado e submetido à sequenciamento

(método de Sanger, *ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer* - Applied Biosystems) pela empresa Ludwig Biotecnologia (<http://ludwigbiotec.com.br/site/>). Confirmada a sequência da UAP, 200 ng de DNA plasmidial foram utilizados para transformar *E. coli* Rosetta 2 por choque térmico, como descrito anteriormente. As bactérias foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina 100 µg/mL e cloranfenicol 40 µg/mL.

Colônias de Rosetta 2 contendo o plasmídeo recombinante foram inoculadas em 50 mL de meio LB contendo ampicilina e cloranfenicol, nas mesmas concentrações já utilizadas, e crescidas a 37 °C e 200 rpm *overnight*. Vinte mL desse cultivo foi inoculados em 200 mL de meio LB, e a densidade óptica (OD₆₀₀) foi acompanhada por espectrofotometria até que atingisse o valor de 0,6. A expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a uma concentração final de 500 µM. Alíquotas desse cultivo foram retiradas em 0, 3, 6 e 18 horas e congeladas para posterior análise da expressão por SDS-PAGE.

A purificação da proteína recombinante foi realizada em coluna de afinidade por Ni (*Chelating-Sepharose Fast Flow* – GE Lifesciences). As células da cultura de 18 h foram coletadas por centrifugação (5000 x *g* por 10 min), suspendidas em tampão de lise (50 mM fosfato de sódio pH 7,0, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% (v/v) glicerol, 0,5% (v/v) Triton X-100 e 10 mM imidazol), sonicadas e centrifugadas novamente (14000 x *g* por 20 min). O sobrenadante foi aplicado na coluna previamente equilibrada com tampão de ligação (50 mM fosfato de sódio pH 7,0, 400 mM NaCl, 100 e 10 mM imidazol). A coluna foi lavada com o tampão de ligação para remoção da fração não retida. Em seguida, a coluna foi lavada com tampão de lavagem (50 mM fosfato de sódio pH 7,0, 400 mM NaCl e 100 mM imidazol). A proteína recombinante foi eluída da coluna pela adição de 300 mM de imidazol.

3.10. Sequências

3.10.1. cDNA

As sequências de cDNA utilizadas neste trabalho como referência para o genoma de *R. prolixus* foram obtidas a partir de um BLAST da UAP ou quitina-sintase de *A. aegypti* no banco de dados VectorBase (<https://www.vectorbase.org/>) (Giraldo-Calderón et al. 2015), no qual o cDNA codificante do gene da UAP está anotado segundo o código de acesso RPRC015300, e o da quitina-sintase, no RPRC008031. Igualmente, a sequência de cDNA da UAP de *A. aegypti* foi retirada do VectorBase e está anotada segundo o código de acesso AAEL001627.

Tabela 4. Anotação de sequências de *A. aegypti* e *R. prolixus* no VectorBase.

Gene	Referência <i>A. aegypti</i>	Referência <i>R. prolixus</i>
UAP	AAEL001627	RPRC015300
Quitina-sintase	AAEL002718	RPRC008031

3.10.2. Aminoácidos

A sequência de aminoácidos da UAP de *A. aegypti* foi retirada do VectorBase e está anotada segundo o mesmo código de acesso do cDNA, AAEL001627. Partindo-se dessa sequência, se buscou a sequência homóloga de *R. prolixus*. Obtida esta sequência, foi feito um novo BLAST por domínio funcional através do servidor pHmmer (<http://hmmer.janelia.org/search/phmmer>) (Finn et al. 2011), buscando pelas sequências de insetos anotadas no banco de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/>)

(Bateman et al. 2015). As sequências da UAP de *Homo sapiens* e *Mus musculus* foram utilizadas como grupo externo. A lista final de sequências pode ser vista na Tabela S1.

3.11. Análises filogenéticas

Para o alinhamento das sequências de aminoácidos obtidas através do servidor pHmmer (Finn et al. 2015), foi utilizado o software MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net/>) (Tamura et al. 2013), utilizando o plug-in ClustalW, nas condições padrão (Larkin et al. 2007). O alinhamento pode ser visto no Apêndice. Para a árvore filogenética da UAP de insetos, foram utilizadas 47+2 (insetos + grupos externos) sequências, das quais 9 foram excluídas por não se enquadrarem no alinhamento, por encontrarem-se repetidas ou por encontrarem-se deletadas no UniProt (<http://www.uniprot.org/>) (Bateman et al. 2015). A árvore foi construída segundo o método de Máxima Verossimilhança, com deleção completa. O modelo evolutivo mais adequado para descrever o alinhamento foi identificado pelo MEGA6 como sendo LG+G+I. O grau de confiança da filogenia obtida foi calculado por 1000 pseudoreplicatas de bootstrap. Para a análise de identidade entre as sequências, foi utilizado o servidor Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers et al. 2011) e a sequência de *R. prolixus* foi usada como referência para as comparações.

3.12. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5 (<http://www.graphpad.com/>). Mais informações sobre os tipos de análise serão explicadas nos resultados.

4. Resultados e discussão

4.1. Determinação da dose de toxinas ingerida pelos barbeiros

Para que pudéssemos garantir o máximo de precisão na dose de Jbtx utilizada na alimentação dos barbeiros, foi determinada sua massa, individualmente, antes e imediatamente após a alimentação artificial. Os animais foram alimentados em grupos de 5, por um período de 1 hora e pesados assim que parassem de se alimentar. A pesagem precisou ser feita imediatamente após o término da alimentação, para que nenhum animal excretasse líquido e o volume ingerido anotado fosse incorreto. A partir dos dados obtidos nesse experimento, foi possível estabelecer o volume ingerido e padronizar a concentração de toxina para que cada animal consumisse a dose de toxina desejada ($0,1 \mu\text{g}/\text{mg}$ de animal). Na Figura 6, é mostrado um gráfico de dispersão de massa para cada critério, considerando-se uma amostra de 61 indivíduos.

A massa média dos animais era 32 ± 7 mg antes da alimentação (jejum de três semanas) e 270 ± 79 mg imediatamente após a alimentação, o que seria equivalente a $238 \pm 79 \mu\text{l}$ de salina consumida, ou seja, $8,0 \pm 3,4$ vezes a massa inicial.

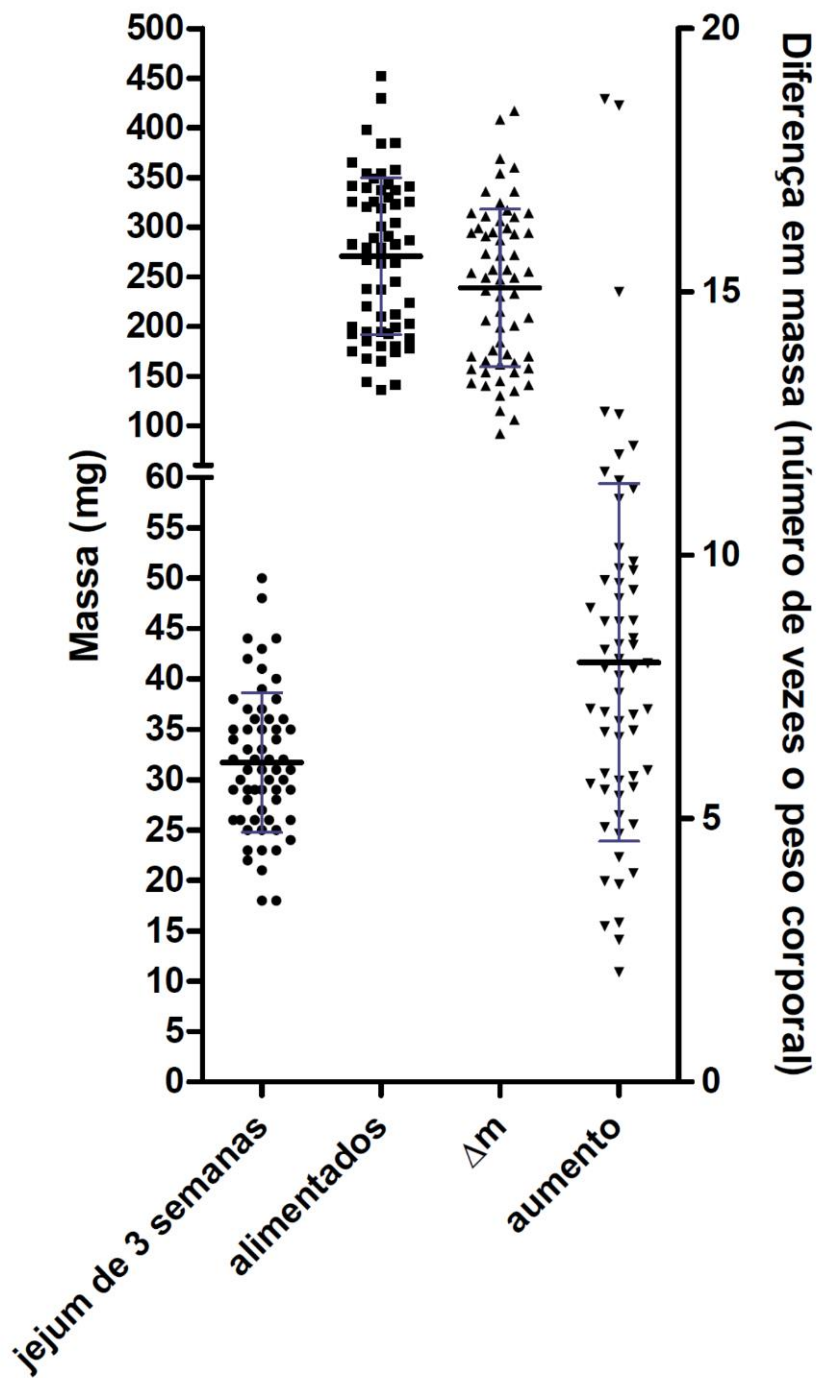


Figura 6. Massa dos barbeiros *R. prolixus* antes e após alimentação com salina. Os insetos foram alimentados com salina suplementada com 1 mM de ATP. A barra central em preto representa a média de cada grupo. Em azul, marcação de um desvio padrão. Δm : diferença de massa antes e imediatamente após o processo de alimentação, x massa: o número de vezes a massa do barbeiro que foi consumido.

4.2. Atividade específica da UAP em órgãos de barbeiros

Dezoito horas após alimentados com salina suplementada ou não com Jbtx os insetos foram dissecados a atividade da UAP foi verificada em diferentes órgãos (Figura 7).

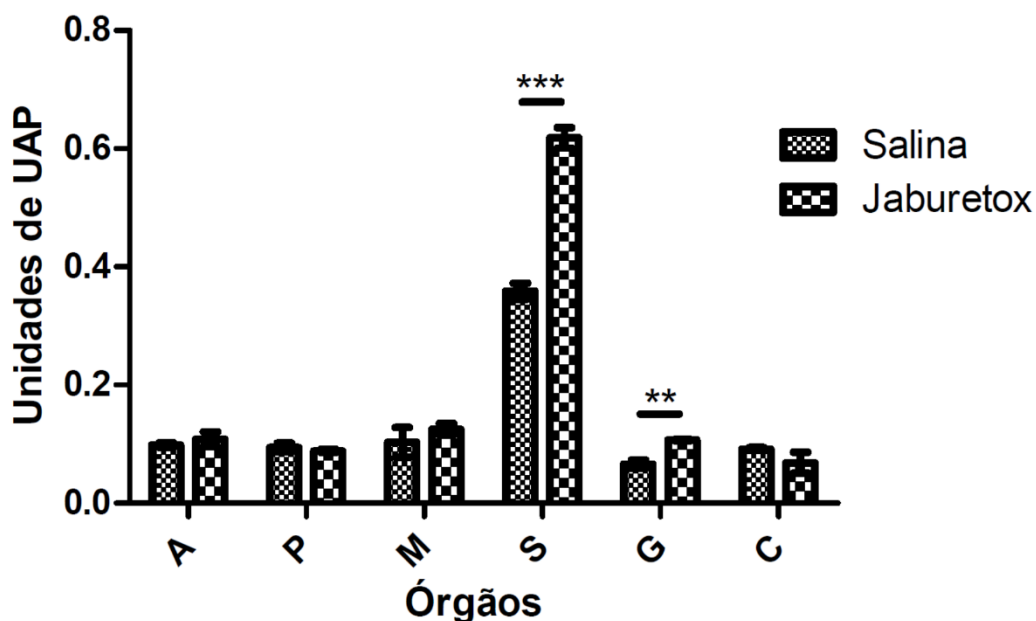


Figura 7. Atividade enzimática da enzima UAP em órgãos de *R. prolixus*. Atividade da enzima em 5 µg de proteína total, a partir de extrato bruto de diferentes órgãos de *R. prolixus* alimentados com salina ou Jaburetox. A: intestino médio anterior, P: intestino médio posterior, M: túbulos de Malpighi, S: glândulas salivares, G: corpo gorduroso e epiderme, C: sistema nervoso central. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão. Asteriscos indicam valores significativamente diferentes (** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$).

A atividade da UAP é homogênea em todos os órgãos, mas tem um grande aumento nas glândulas salivares. Ao contrário do que foi reportado por Galvani e colaboradores para homogeneizados de sistema nervoso central de *T. infestans* e *D. peruvianus* (Galvani et al. 2015), não encontramos alterações na atividade da UAP no mesmo órgão quando tratado com Jbtx. O peptídeo Jbtx foi, entretanto, capaz de aumentar a atividade enzimática da enzima UAP nas glândulas salivares e no corpo

gorduroso. A incubação de homogeneizados de glândulas salivares com Jbtx também mostrou aumento da atividade dessa enzima de maneira dose dependente (dados não publicados).

A alteração nos perfis de atividade da UAP em cada órgão pode estar relacionada com diferenças na expressão das enzimas, presença ou ausência de substratos, atuação de moduladores alostéricos, sendo que já foi relatado que a atividade da UAP pode ser alterada dependendo da concentração de UTP (Yamamoto et al. 1980; Fang et al. 2013). A evidência de que há, *in vivo*, uma interação física entre Jbtx e UAP juntamente com a capacidade do Jbtx em ativar a enzima *in vitro* sugerem que o peptídeo possa atuar como um possível modulador dessa enzima, pois não é possível alterar níveis de expressão da enzima ou seus substratos quando *in vitro*. Ainda não se sabe se a distribuição de Jbtx é homogênea em insetos alimentados, mas se sabe que esse peptídeo é capaz de atravessar o epitélio intestinal e alcançar a hemolinfa, o que possibilita que atue em outros órgãos. Dessa forma, os resultados mostrados na figura 7 indicam um possível direcionamento do Jbtx para glândulas salivares, corpos gordurosos e epiderme.

Conforme foi mostrado por Stokes e colaboradores, o metabólito UDP-GlcNac é obrigatório para o desenvolvimento e infecção do parasita *T. brucei*. Em baixas quantidades do metabólito, a síntese de GPIs livres e GPIAs são mantidas pelo parasita, enquanto processos de glicosilação de proteínas são diminuídos (Stokes et al. 2008). *R. prolixus* pode ser infectado por duas espécies de tripanossomatídeos: *T. rangeli* e *T. cruzi* (Gazos-Lopes et al. 2012). Ao contrário do *T. cruzi*, *T. rangeli* é um parasita exclusivo de espécies do gênero *Rhodnius*. *T. rangeli* coloniza o intestino dos insetos, mas pode alcançar a hemolinfa e colonizar glândulas salivares, para destas ser transmitido a outro organismo (Gazos-Lopes et al. 2012; Barreto-Santana et al. 2015; De Lima Ferreira et al. 2015). Já foi relatado que a comunicação entre parasita e triatomíneo, bem como a adesão do parasita, é altamente dependente de GPIs e proteínas ligadas a GPIA (Ferguson 1997; Gazos-Lopes et al. 2012). Dessa forma, o aumento da atividade basal da UAP em glândulas salivares pode ter sido uma resposta evolutiva a simbiose entre esses organismos, processo que ocorre devido ao fato de ambas espécies estarem intimamente ligadas (De Lima Ferreira et al. 2015). Ainda, sabe-se que glândulas

salivares de *R. prolixus* são altamente glicosiladas, o que também explicaria uma atividade basal da UAP muito maior, quando comparada com os outros órgãos (Gazos-Lopes et al. 2012).

O tegumento (membrana basal, epiderme e cutícula) é uma estrutura cuja função é proteger os órgãos dos insetos do meio externo. Sua composição apresenta grande quantidade de quitina, que serve como uma barreira hídrica e mecânica (Merzendorfer & Zimoch 2003). Quando Jbtx atravessa a membrana intestinal para a hemolinfa, o peptídeo pode entrar em contato com a epiderme, possibilitando que interaja com a UAP presente nesse órgão, aumentando sua atividade. Por fim, o corpo gorduroso é um órgão equivalente ao fígado e ao tecido adiposo dos mamíferos. Esse órgão é o principal responsável por produzir proteínas e metabólitos circulantes na hemolinfa, o que inclui diversas proteínas glicosiladas de secreção constante, como a vitelogenina e a lipoforina (Rodenburg et al. 2006; Tufail e Takeda 2008; Arrese e Soulages 2009). A importância fisiológica do corpo gorduroso e da epiderme os torna um bom alvo para respostas evolutivas envolvendo mecanismos de toxicidade, o que explicaria a alteração apresentada pelo tratamento com Jbtx.

4.3. Análise da expressão gênica

In vivo, uma possível atuação de Jbtx no controle dos níveis de expressão da UAP seria possível. Visando investigar esta hipótese, realizamos experimentos de qPCR em tempo real de tecidos de insetos alimentados com salina, com Jbtx ou com JBU. Em 18 horas após a alimentação, os insetos foram dissecados, com os órgãos separados para extração de RNA. As condições de diluição da amostra e parâmetros da reação foram previamente testadas e padronizadas para esse experimento.

Inicialmente, foi avaliado o perfil de expressão basal da UAP nos diferentes órgãos de *R. prolixus* após alimentação artificial com salina (Figura 8). O perfil de expressão nesta condição não demonstrou nenhuma alteração significativa nos níveis de expressão basal entre os diferentes órgãos. Em estudos anteriores com embriões de *D. melanogaster*, verificou-se que a expressão da UAP se mantém homogênea entre os

órgãos e estágios do desenvolvimento desse organismo, aumentando apenas nos períodos embrionários em que é necessário produzir, para o organismo ou órgão, a matriz extracelular, sugerindo que a UAP seja uma enzima *housekeeping* (Tonning et al. 2006). Os resultados obtidos na figura 8 corroboram com essa hipótese, salientando a importância da UAP para a fisiologia dos insetos.

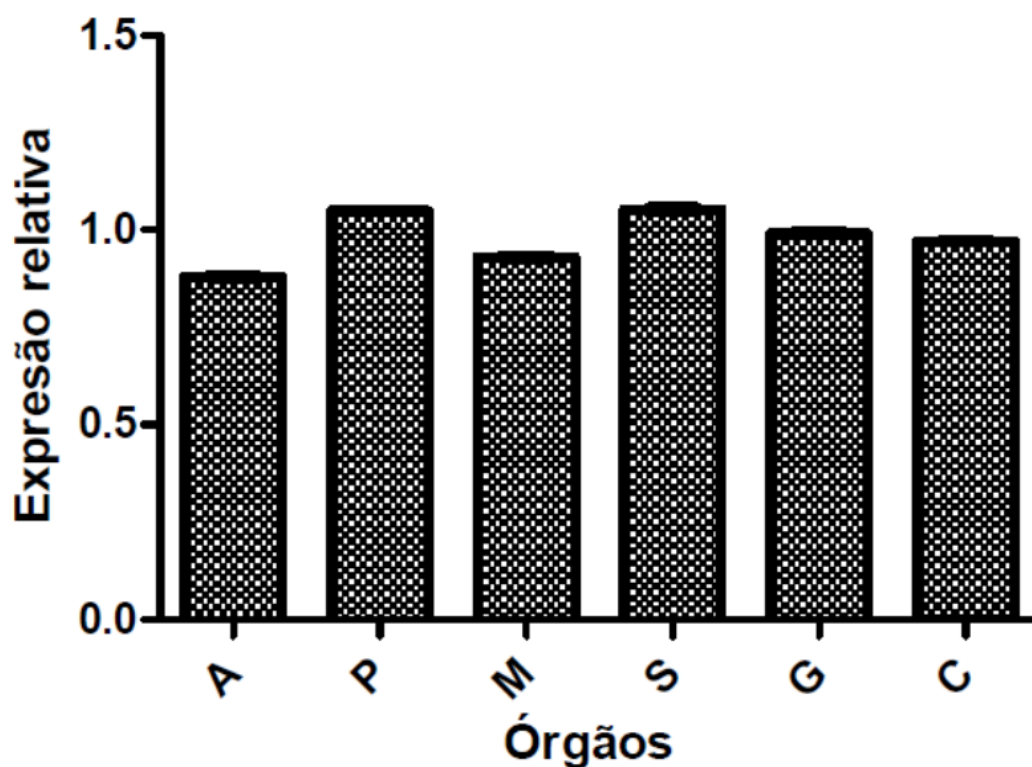


Figura 8. Perfil de expressão gênica da UAP em órgãos de *R. prolixus*. Actina foi utilizada como normalizador. A: intestino médio anterior, P: intestino médio posterior, M: túbulos de Malpighi, S: glândulas salivares, G: corpo gorduroso e epiderme, C: sistema nervoso central. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão de um experimento típico.

Insetos alimentados com Jbtx apresentaram um perfil de expressão da UAP distinto da condição controle, onde órgãos como o intestino médio anterior, túbulos de Malpighi, glândulas salivares e SNC apresentaram uma grande diminuição da expressão dessa enzima, enquanto o corpo gorduroso e a epiderme apresentaram uma diminuição moderada. A expressão do gene no intestino médio posterior não apresentou mudanças

significativas. Quando os resultados foram normalizados com um segundo gene (fator de alongação 1) o mesmo perfil foi mantido (dados não mostrados).

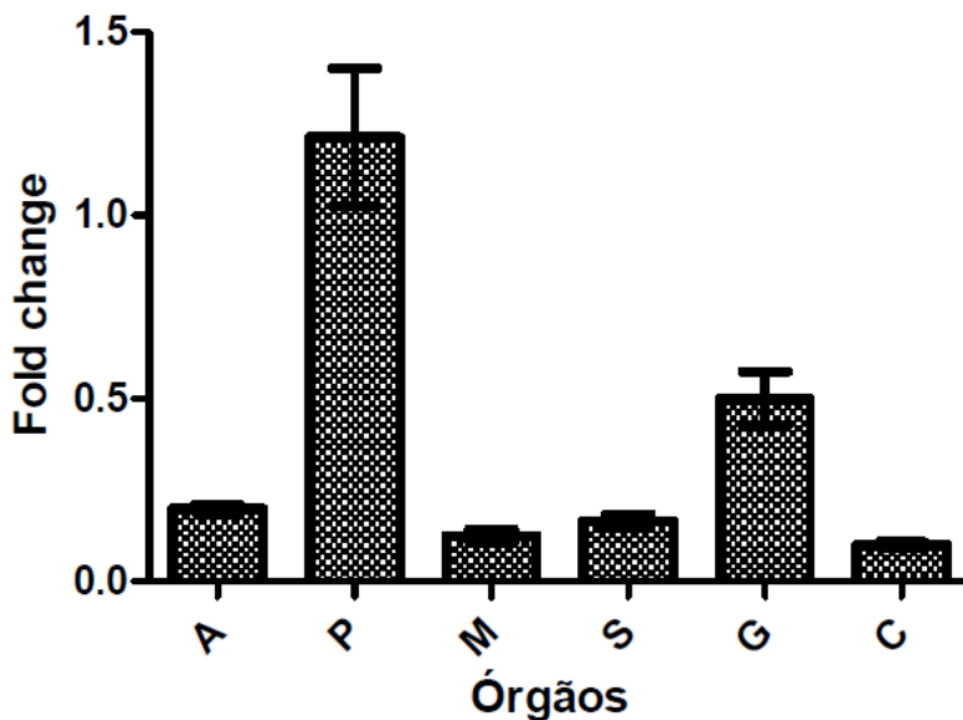


Figura 9. Efeito do Jbtx na expressão da UAP em órgãos de *R. prolixus*. Actina foi utilizada como gene normalizador. A expressão é relativa aos insetos alimentados apenas com salina. A: intestino médio anterior, P: intestino médio posterior, M: túbulos de Malpighi, S: glândulas salivares, G: corpo gorduroso e epiderme, C: sistema nervoso central. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão de um experimento típico.

Existem evidências de que a JBU é encontrada intacta e enzimaticamente ativa na hemolinfa de insetos alimentados, o que pode levar a mecanismos de ação diferentes dos mediados pelos peptídeos derivados (Stanisçuaski et al. 2010). Por isso, decidimos investigar se a JBU também causaria mudanças na expressão da UAP. Insetos alimentados com JBU (Figura 10) apresentaram um perfil de expressão da UAP completamente diferente, onde ambos os intestinos, glândulas salivares e SNC apresentaram uma grande diminuição da expressão, enquanto túbulos de Malpighi apresentaram uma diminuição moderada. A expressão do corpo gorduroso e epiderme não apresentaram mudanças significativas.

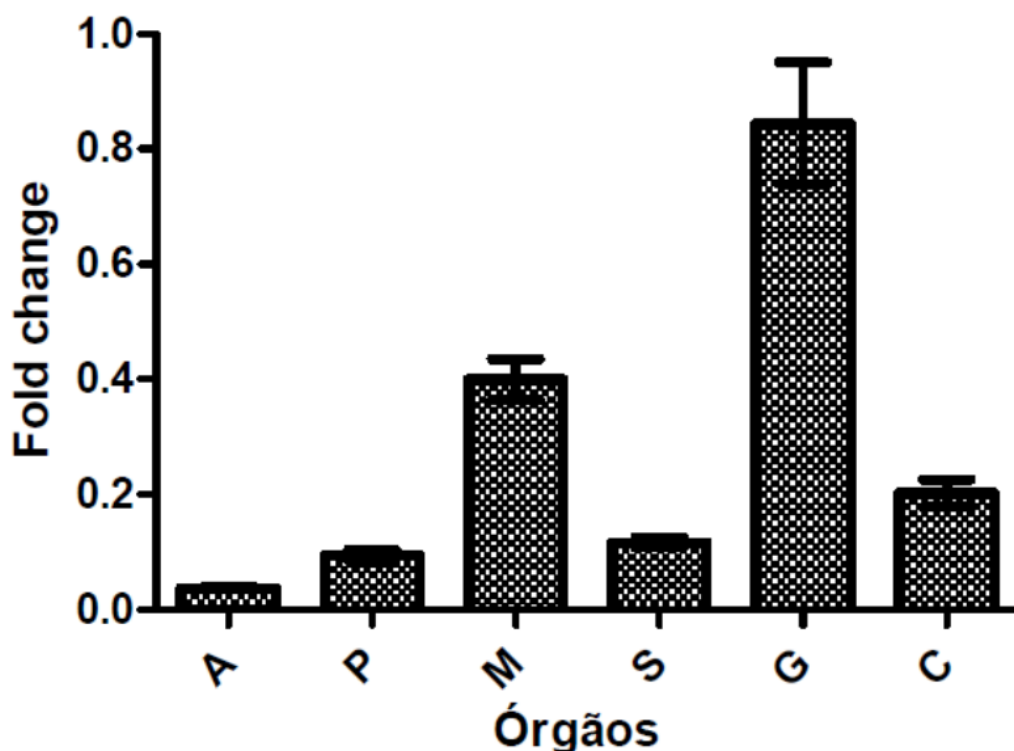


Figura 10. Efeito da JBU na expressão da UAP em órgãos de *R. prolixus*. Actina foi utilizada como gene normalizador. A expressão é relativa aos insetos alimentados apenas com salina. A: intestino médio anterior, P: intestino médio posterior, M: túbulos de Malpighi, S: glândulas salivares, G: corpo gorduroso e epiderme, C: sistema nervoso central. Resultados são apresentados como média e desvio padrão de um experimento típico.

A diminuição da expressão do gene em glândulas salivares foi inesperada, pois, até a obtenção desse resultado, imaginávamos que o aumento da atividade da enzima em glândulas salivares, corpo gorduroso e epiderme poderia ser causado por um aumento na expressão do seu gene, mas os resultados mostrados nas figuras 7 e 9 indicam que o aumento da atividade enzimática nos órgãos em que ocorreu seria compensado pela diminuição da expressão da enzima. Nem sempre o aumento de expressão é refletido em aumento na quantidade de proteína, visto que inúmeros fatores podem influenciar esse processo. Em um trabalho, foi reportado que a proteína amina oxidase sensível a semicarbazida compensava um aumento na sua atividade com uma diminuição na expressão do seu gene, processo que possivelmente estaria acontecendo com a UAP (Nordquist et al. 2002). Assim, um aumento na atividade da

UAP não estaria exclusivamente relacionado com o aumento na quantidade de proteínas. Os dados obtidos indicam potencialmente a ação de Jbtx em diferentes níveis de regulação da UAP, tanto na sua atividade (ação direta sobre a enzima) quanto em sua expressão (ação indireta). Resultados anteriores haviam reportado que precursores da síntese de UDP-GlcNac, como UTP e glicosamina-6-fosfato, modulavam alostericamente a atividade da UAP (Yamamoto et al. 1980; Fang et al. 2013; Bulik et al. 2000), o que poderia explicar o aumento na atividade da proteína sem estar relacionado a um aumento na expressão gênica .

Em *D. melanogaster*, a UAP é uma proteína com importante função no desenvolvimento embrionário das moscas, atuando como sinalizadora para a ação correta de genes de desenvolvimento e levando a defeitos de formação nos mutantes nulos para esse gene. Ainda nessas moscas, evidências mostram que cada tecido reage de uma maneira diferente em resposta à perda da UAP, sendo que a formação da traqueia (que contém proteínas altamente glicosiladas e um grande número de proteínas ligadas a GPIA) e da cutícula apresentavam defeitos baseados em falta de quitina, enquanto o CNS apresentava defeitos que seriam provavelmente nos processos de glicosilação e defeitos que eram derivados da síntese incorreta de GPIA. Por fim, os autores relatam que a expressão da UAP é regulada pelo hormônio 20-hidroxiecdisona, que atua na muda dos insetos (Araújo et al., 2005; Schimmelpfeng et al., 2006; Tønning et al., 2006; Humphreys et al., 2013).

Em *L. migratoria*, existem duas UAPs que também apresentam padrões de expressão diferentes durante o desenvolvimento e em órgãos distintos. Segundo os autores, a diferenciação na expressão tecidual se deve ao fato de que as duas UAPs possuem funções específicas, sendo a UAP1 responsável pela síntese de quitina e a UAP2 responsável pelas outras funções da enzima. Órgãos como o integumento apresentaram maior expressão de UAP1 (o que é condizente com quantidade de quitina nesses órgãos), enquanto o intestino médio anterior e posterior, túbulos de Malpighi, músculos, traqueia e corpo gorduroso apresentavam um valor baixo para a expressão desse gene. A UAP2 era mais expressa em corpos gordurosos (Liu et al. 2013).

Em *T. castaneum*, também existem duas UAPs e elas possuem diferentes perfis de expressão de acordo com o desenvolvimento. Assim como em *L. migratoria*, a UAP1 está

relacionada com a produção de quitina, enquanto a UAP2 é responsável por outras funções. A expressão de UAP1 ocorre de maneira quase homogênea em intestino médio, carcaça, integumento e corpo gorduroso de larvas, com um pequeno aumento na expressão do intestino posterior, enquanto, em adultos, a expressão é homogênea nos dois intestinos e élitros, diminuída nas asas e integumento abdominal, aumentada nos ovários e testículos. A expressão da UAP2 é muito baixa em larvas, sendo que os órgãos que mais expressam são a carcaça, intestino médio e corpo gorduroso, enquanto, em adultos, os órgãos são o intestino médio, os ovários e a élitros (maior expressão), com fraca expressão no intestino posterior (Arakane et al. 2011).

R. prolixus possui apenas uma UAP, o que significa que a enzima precisa executar suas funções em todos os tecidos, ao contrário das UAPs especializadas de *L. migratoria* e *T. castaneum*. As análises da expressão da UAP revelam que o metabolismo dessa enzima apresenta flutuações derivadas de motivos distintos, como, no caso dos insetos, desenvolvimento, processo de muda e órgãos envolvidos (Araújo et al., 2005; Schimmelpfeng et al., 2006; Tønning et al., 2006; Arakane et al. 2011; Humphreys et al., 2013; Liu et al. 2013). Além disso, sabe-se também que a UAP responde ao tratamento com moléculas externas ao organismo, pois já foi relatado que células de câncer de próstata respondem com o aumento da expressão da UAP quando tratadas com compostos antitumorais (Itkonen et al. 2014) e, em *G. intestinalis*, o processo de encistamento também leva ao aumento da expressão da UAP, reforçando que essa enzima responde às condições ambientais com facilidade (Macechko et al. 1992).

Uma vez que Jbtx altera o funcionamento da UAP (seja em nível de atividade enzimática ou de expressão gênica), é interessante investigar se rotas dependentes desta enzima também seriam afetadas, como por exemplo, a síntese de quitina. Para isso, analisamos a expressão do gene quitina sintase. Assim como para o gene da UAP, o gene da quitina sintase também apresentou um perfil de expressão homogêneo entre os diferentes tecidos analisados (figura 11).

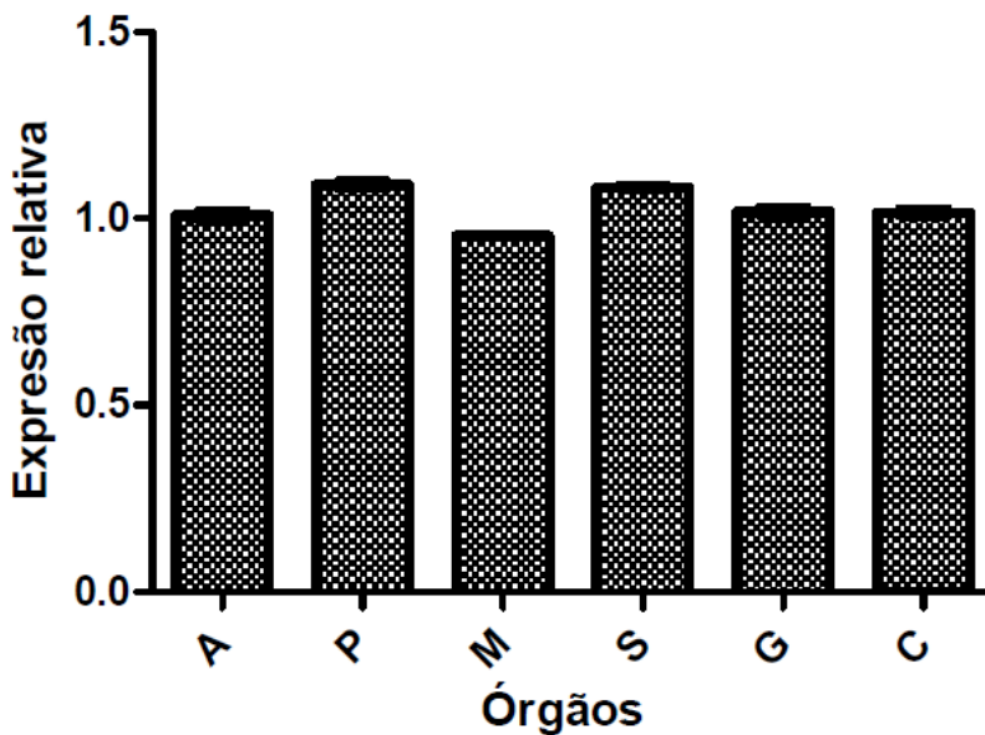


Figura 11. Perfil de expressão gênica da quitina sintase em órgãos de *R. prolixus*. Actina foi utilizada como normalizador. A: intestino médio anterior, P: intestino médio posterior, M: túbulos de Malpighi, S: glândulas salivares, G: corpo gorduroso e epiderme, C: sistema nervoso central. Resultados são apresentados como média e desvio padrão.

A expressão gênica da quitina sintase se mostrou fortemente alterada em insetos alimentados com Jbtx (Figura 12), sendo o intestino médio posterior o único órgão que apresentou um perfil de expressão quase inalterado.

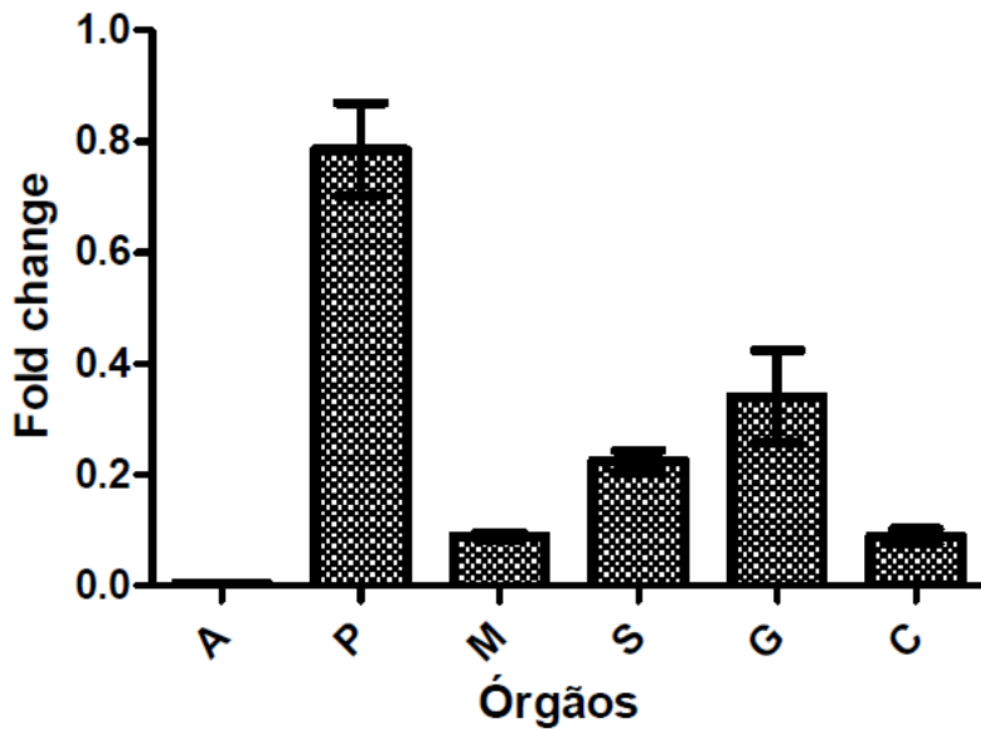


Figura 12. Efeito do Jbtx na expressão da quitina sintase em órgãos de *R. prolixus*. Actina foi utilizada como gene normalizador. A expressão é relativa aos insetos alimentados apenas com salina. A: intestino médio anterior, P: intestino médio posterior, M: túbulos de Malpighi, S: glândulas salivares, G: corpo gorduroso e epiderme, C: sistema nervoso central. Resultados são apresentados como média e desvio padrão de um experimento típico.

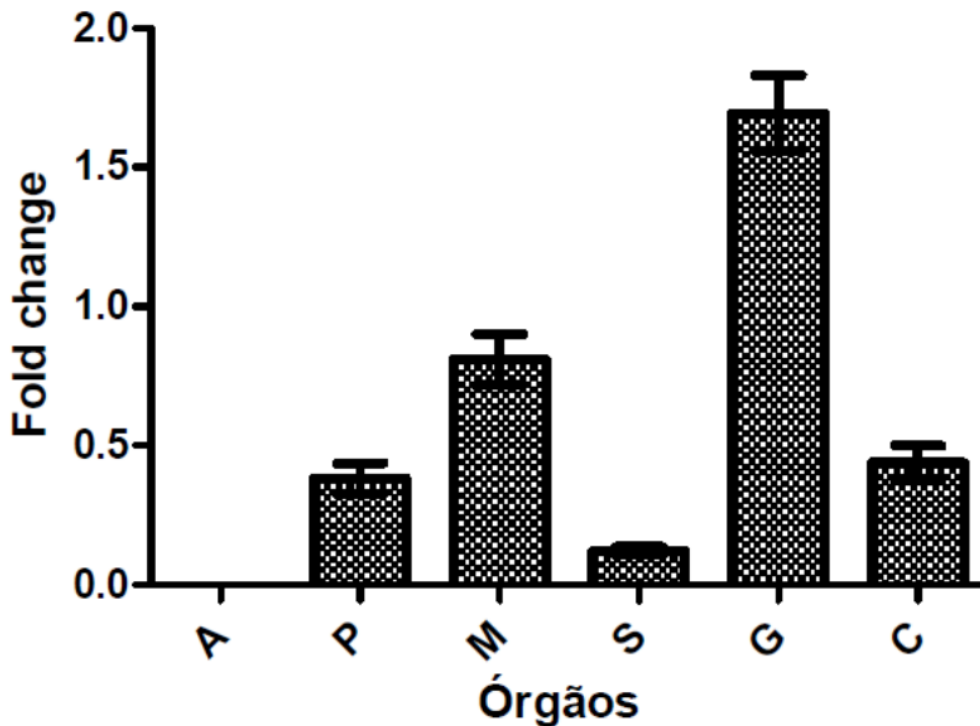


Figura 13. Efeito da JBU na expressão da quitina sintase em órgãos de *R. prolixus*. Actina foi utilizada como gene normalizador. A expressão é relativa aos insetos alimentados apenas com salina. A: intestino médio anterior, P: intestino médio posterior, M: túbulos de Malpighi, S: glândulas salivares, G: corpo gorduroso e epiderme, C: sistema nervoso central. Resultados são apresentados como média e desvio padrão de um experimento típico.

No caso da alimentação com JBU, o perfil de alteração da expressão gênica se mostrou igual ao do Jbtx para o intestino médio anterior e para as glândulas salivares. O intestino médio posterior e o SNC mostraram uma diminuição moderada, enquanto a expressão da quitina sintase nos túbulos de Malpighi se manteve quase inalterada e a expressão no corpo gorduroso e epiderme aumentou.

Os resultados mostrados nessa seção fornecem as primeiras evidências de que a alimentação com Jbtx causa alterações fisiológicas em nível de expressão gênica. Em ambas as análises, o único órgão que manteve os perfis de expressão quase inalterados foi o intestino médio posterior. Pouco se sabe sobre as vias pelas quais Jbtx exerce seus efeitos, menos ainda sobre a atuação desse peptídeo envolvendo UAP e quitina sintase. Stanisçuaski e colaboradores reportaram que cGMP (guanidina monofosfato cíclico) atua como um segundo mensageiro em mecanismos que levam a antidiurese em

túbulos de Malpighi, mostrando que segundos mensageiros podem desencadear cascatas bioquímicas complexas potencialmente levando a alterações na expressão gênica (Stanisçuaski et al. 2009). Concluindo, a análise da quantidade de quitina presente em intestinos tratados ou não com Jbtx poderia fornecer mais dados sobre a função da quitina sintase na toxicidade do Jbtx.

Assim como a CNTX, a JBU também é capaz de ser digerida por enzimas do tipo catepsinas (presentes em *R. prolixus*) e gerar um peptídeo tóxico de tamanho semelhante ao do Jbtx (Piovesan et al. 2008). Por isso, uma possível explicação para resultados distintos entre os perfis de expressão apresentados na alimentação com Jbtx ou JBU seria algum efeito resultante da digestão dos insetos, pois a toxicidade da JBU também depende dos peptídeos tóxicos derivados, além da atuação da toxina íntegra no organismo do inseto (Carlini e Ligabue-Braun 2016). Ainda, sabe-se que as vias pelas quais JBU e Jbtx exercem sua toxicidade são distintas, podendo cada uma das vias alterar a fisiologia dos insetos de maneira diferenciada, visto que Jbtx atua através de mudanças no potencial transepitelial e utilização de cGMP, e JBU atua através de alterações em níveis de cálcio e via dos eicosanoides (Stanisçuaski et al. 2009, Carlini e Ligabue-Braun 2016). Os resultados mostrados nesses experimentos de expressão gênica são uma nova evidência que reforça essas informações.

4.4. Clonagem da UAP de *R. prolixus*

A clonagem da UAP de *R. prolixus* foi feita a partir da amplificação, por PCR, da sua sequência codificante. Inicialmente, tentou-se clonar a sequência em vetor pGEM-T, para posterior subclonagem no vetor de expressão pET-15b. Devido a mutações geradas na reação de PCR, não foi possível obter uma sequência de rUAP que estivesse em fase de leitura correta. Continuaram-se as tentativas de clonagem, mas utilizando-se a enzima de alta fidelidade Phusion e clonagem direta no vetor pET-15b, pois a amplificação para clonagem em pGEM-T precisa ser feita com a Taq DNA polimerase. Após os processos de clonagem e extração plasmidial, foi realizada uma PCR (Figura 14) a partir do plasmídeo obtido (pET-15b:*uap*) e com primers para a sequência codificadora

completa da UAP e primers para o promotor e terminador T7, presentes no plasmídeo. O resultado dessa PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose (Figura 14).

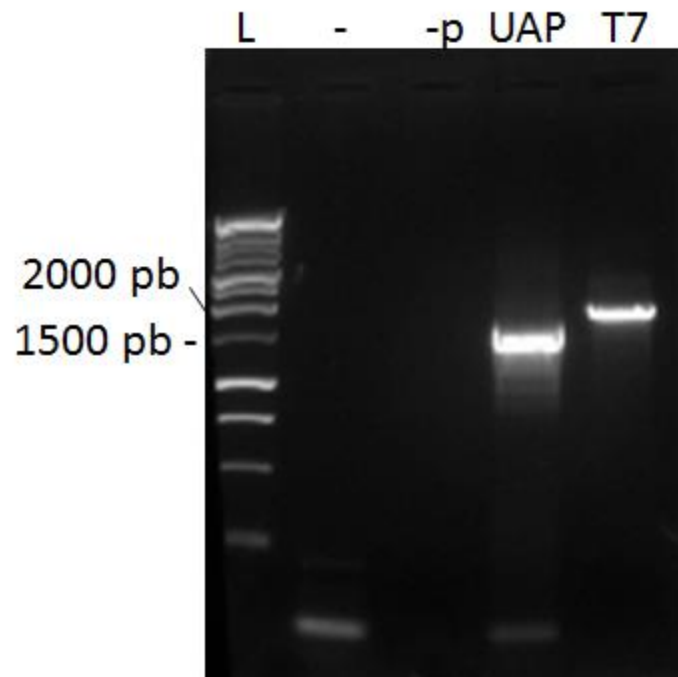


Figura 14. Confirmação da clonagem do gene da UAP no vetor pET-15b. L: marcador de peso molecular; -: PCR sem DNA molde; -p: PCR sem primers; UAP: PCR com primers para amplificação do gene da UAP; T7: PCR com primers para amplificação da região plasmidial entre o promotor e o terminador.

Conforme pode ser visto na figura acima, foi possível clonar a sequência codificante da UAP em pET-15b. A análise por eletroforese revelou a presença de uma sequência de aproximadamente 1500 pares de base quando clonada com seus primers específicos, o que é compatível para o tamanho predito (1467 pares de base).

O plasmídeo obtido foi sequenciado e foi constatado que a sequência da rUAP tinha duas mutações pontuais em relação a sequência do cDNA anotada no VectorBase. Uma das mutações acarretava em troca de uma valina para uma isoleucina na porção C-terminal da enzima e a outra se mostrou uma mutação sinônima. A comparação entre as duas sequências está mostrada na Figura 15.

A

1
 rpUAP ATGTCGGATA TAAGTGAAAT TACTGGATT TTA AAAAGCT ATGGACAGGA ACATATTTTA
 RUAP ATGTCGGATA TAAGTGAAAT TACTGGATT TTA AAAAGCT ATGGACAGGA ACATATTTTA

61
 rpUAP CATTTCGGG AGAAATTGAG TGATGATGAT AGGCACGAAC TTATTCAAGA CATCAAAACT
 RUAP CATTTCGGG AGAAATTGAG TGATGATGAT AGGCACGAAC TTATTCAAGA CATCAAAACT

121
 rpUAP ATTAATATTC CAGAGGTAAT ATCTTATTTT CAAAAAGCTA CTGAAAATGT ATCTAGTGAT
 RUAP ATTAATATTC CAGAGGTAAT ATCTTATTTT CAAAAAGCTA CTGAAAATGT ATCTAGTGAT

181
 rpUAP CAAGAGAAAT TGGATGACAG ATTA AAAACCT ATACCTTCTA GTCCTTTTGG CGCTGTATCA
 RUAP CAAGAGAAAT TGGATGACAG ATTA AAAACCT ATACCTTCTA GTCCTTTTGG CGCTGTATCA

241
 rpUAP AGAACAAACC CAGAGCTTTT GTTGTCCTAT GAGGAAGAGG GTTTGAAACA GATTT CAGAA
 RUAP AGAACAAACC CAGAGCTTTT GTTGTCCTAT GAGGAAGAGG GTTTGAAACA GATTT CAGAA

301
 rpUAP GGGCATGTGG GAGTGTACT AATGGCTGCT GGGCAAGGAA CAAGACTGGG TTCTACAGAC
 RUAP GGGCATGTGG GAGTGTACT AATGGCTGCT GGGCAAGGAA CAAGACTGGG TTCTACAGAC

361
 rpUAP CCTAAAGGAA TGTATGATGT TGGTTTACCT TCTCATAAAA GCCTTTATCA AATCCAAGCA
 RUAP CCTAAAGGAA TGTATGATGT TGGTTTACCT TCTCATAAAA GCCTTTATCA AATCCAAGCA

421
 rpUAP GAAAGAAATTA AAAAAGTAT GGAATTAGCT ACAGAAAGAT CGGGAAAGTC CTGCGTAATC
 RUAP GAAAGAAATTA AAAAAGTAT GGAATTAGCT ACAGAAAGAT CGGGAAAGTC CTGCGTAATC

481
 rpUAP ACTTGGTTTA TAATGACAAG TGAACACACC ATGGACCCTA CTATAGAATT TTTTAAAAAG
 RUAP ACTTGGTTTA TAATGACAAG TGAACACACC ATGGACCCTA CTATAGAATT TTTTAAAAAG

541
 rpUAP AATAATTACT TTGGGCTAGA GAAAAATAAC GTTGTGTGTT TCGAGCAAGG GCTTCTTCC
 RUAP AATAATTACT TTGGGCTAGA GAAAAATAAC GTTGTGTGTT TCGAGCAAGG GCTTCTTCC

601
 rpUAP TGTTTTACTT TTGATGGCAA AATTATCATG GATAAACCCT ATAAAAATTC TCTTGCTCCT
 RUAP TGTTTTACTT TTGATGGCAA AATTATCATG GATAAACCCT ATAAAAATTC TCTTGCTCCT

661
 rpUAP GATGGAAATG GTGGTCTATA CCGTGCCTA AGGGATAAGA AAGTCTAGA TATGATTGAA
 RUAP GATGGAAATG GTGGTCTATA CCGTGCCTA AGGGATAAGA AAGTCTAGA TATGATTGAA

721
 rpUAP AATAAAGGTA TAATGTACTT GCATGCTCAC AGTGTGGATA ATATACTTGT CAAGGTAGCA
 RUAP AATAAAGGTA TAATGTACTT GCATGCTCAC AGTGTGGATA ATATACTTGT CAAGGTAGCA

781
 rpUAP GATCCCATTT TTATTGGCTA TTGTGTTCTA AAAAGTGTG ATTGCGGAGC TAAAGTTGTG
 RUAP GATCCCATTT TTATTGGCTA TTGTGTTCTA AAAAGTGTG ATTGCGGAGC TAAAGTTGTG

841
 rpUAP GAGAAAGCTT TTCTACTGA AGCTTTAGGA GTGGTATGCA ATGTAGATGG AAAATATCAG
 RUAP GAGAAAGCTT TTCTACTGA AGCTTTAGGA GTGGTATGCA ATGTAGATGG AAAATATCAG

901
 rpUAP GTAGTGGAAAT ACAGTGAAAT AACATTGAAA ACTGCTGAAA TCGGTAAACA CGATGGGAGG
 RUAP GTAGTGGAAAT ACAGTGAAAT AACATTGAAA ACTGCTGAAA TCGGTAAACA CGATGGGAGG

961
 rpUAP CTAACCTTCT CTGCAGGCAA TATTTGCAAC CATTTTTCA CCACTGAATT TCTAAGGAGC
 RUAP CTAACCTTCT CTGCAGGCAA TATTTGCAAC CATTTTTCA CCACTGAATT TCTAAGGAGC

1021
 rpUAP GTAGCGAATA AGTATGAATG TGATTTAAAA CTTCAATGTTG CTAAGAAAAA AATCCCCTAC
 RUAP GTAGCGAATA AGTATGAATG TGATTTAAAA CTTCAATGTTG CTAAGAAAAA AATCCCCTAC

1081
 rpUAP ATTGATTTTG ATGGTAAACG TTGCAAACTT GAGAAACCAA ATGGAATTAA AATTGAAAAA
 RUAP ATTGATTTTG ATGGTAAACG TTGCAAACTT GAGAAACCAA ATGGAATTAA AATTGAAAAA

1141
 rpUAP TTTGTTTTTG ATGTATTICA ATTTACTAAA AAAC TAGCTG TTTGGGAAGT TAATCGTGAG
 RUAP TTTGTTTTTG ATGTATTICA ATTTACTAAA AAAC TAGCTG TTTGGGAAGT TAATCGTGAG

1201
 rpUAP GATGAATTCG GTGCTTTGAA AAATCTGAC GCTGCTGATA AGGATACACC TACAAC TGCC
 RUAP GATGAATTCG GTGCTTTGAA AAATCTGAC GCTGCTGATA AGGATACACC TACAAC TGCC

1261
 rpUAP AGAAAAGACT TGTTTTCAAT ACATAAAAAG TTTGTCGAAG AAGCAGGTGG CAAATTTGAA
 RUAP AGAAAAGACT TGTTTTCAAT ACATAAAAAG TTTGTCGAAG AAGCAGGTGG CAAATTTGAA

1321
 rpUAP CCGAGGATCTG TTGTTTGTGA AATTTACCCA TTGGTATCCT ACGCTGGTGA GGGCTTAAAG
 RUAP CCGAGGATCTG TTGTTTGTGA AATTTACCCA TTGGTATCCT ACGCTGGTGA GGGCTTAAAG

1381
 rpUAP TCAATTGTCC AAGGGAAAAA ATTTAAATCA CCTTACACA TATTCAAACC AAAAGAACAT
 RUAP TCAATTGTCC AAGGGAAAAA ATTTAAATCA CCTTACACA TATTCAAACC AAAAGAACAT

B

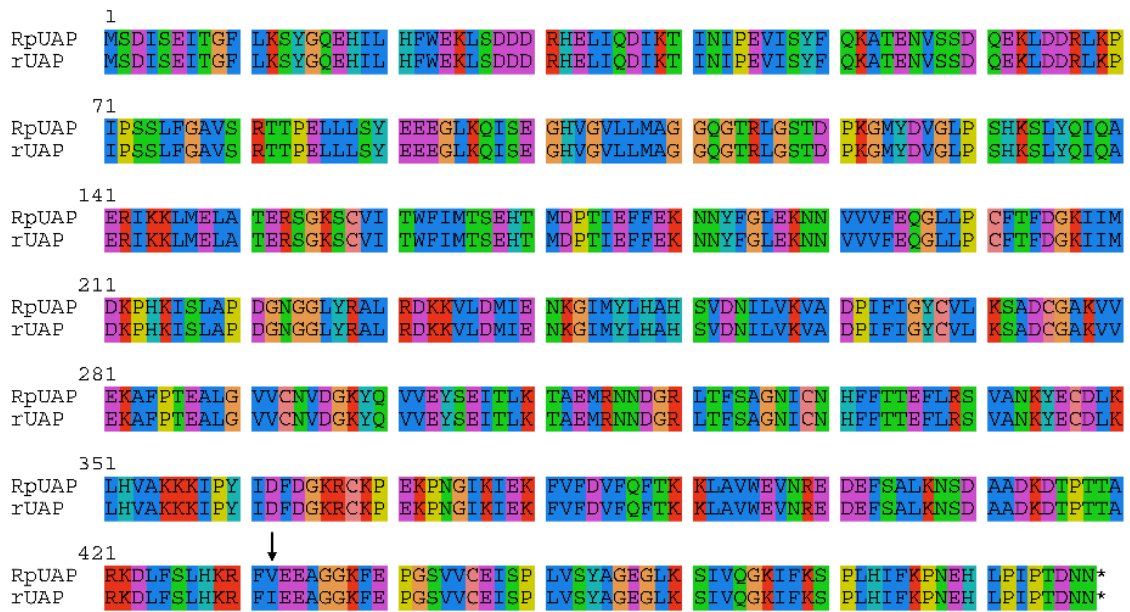


Figura 15. Mutações entre as seqüências da UAP. Em A, alinhamento dos cDNAs; em B, alinhamento das seqüências de aminoácidos. As setas em preto mostram o local das mutações. RpUAP: seqüência do cDNA da UAP contida no VectorBase; rUAP: seqüência da UAP recombinante.

Após a obtenção do plasmídeo pET-15b:*uap*, a expressão da proteína recombinante em *E. coli* Rosetta 2 foi realizada. Mesmo após 18 h de indução, a análise dos extratos brutos não indicou uma superexpressão da proteína recombinante (dados não mostrados). Considerando que um baixo nível de proteína poderia ter sido expresso, seguimos com a purificação desta por cromatografia de afinidade. Na Figura 16, podemos observar a presença de uma banda de aproximadamente 60 kDa nas frações eluídas com 300 mM de imidazol. O tamanho predito *in silico* para a UAP de *R. prolixus* é de 56 kDa.

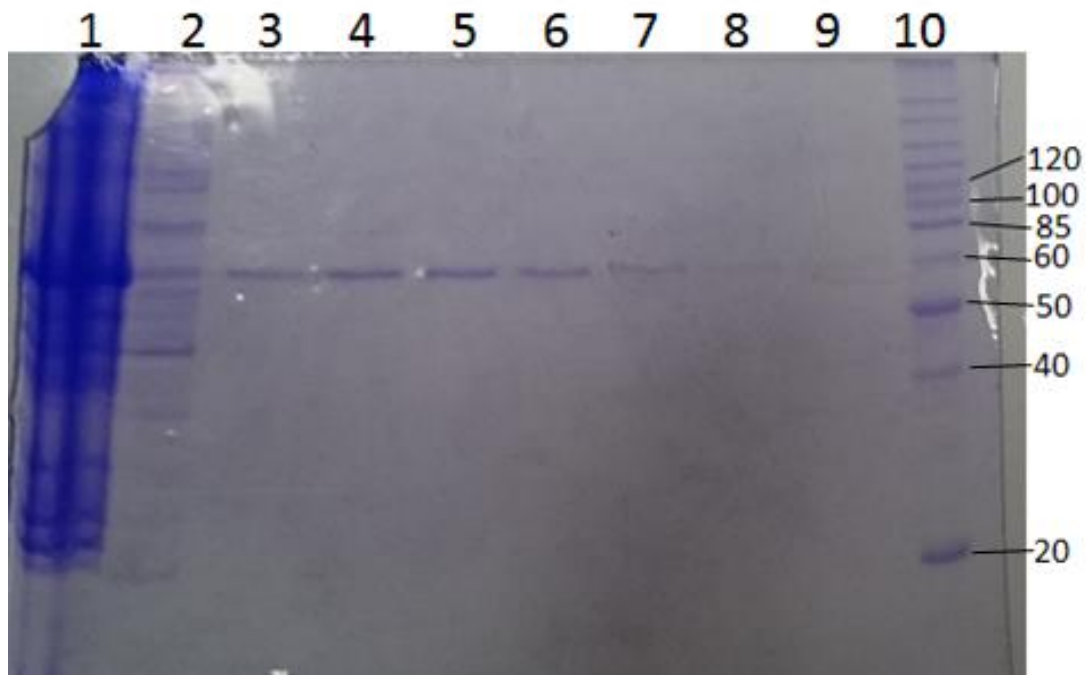


Figura 16. Análise da purificação da rUAP por SDS-PAGE (12 %). Poços 1: extrato bruto; 2: fração não retida; 3 – 9: frações eluídas com 300 mM de imidazol; 10: padrão de peso molecular *PageRuler Unstained Protein Ladder* (ThermoFisher Scientific). O gel foi corado com Comassie Brilliant Blue.

A UAP de *R. prolixus* não é a primeira UAP recombinante já expressa. UAPs de *G. intestinalis*, *Oryza sativa*, *T. brucei*, *H. sapiens*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* já foram descritas (Mio et al., 1998; Lopez et al., 2003; Urbaniak et al., 2013; Wang et al., 2015). Assim como para a rUAP obtida nesse trabalho, as enzimas recombinantes descritas pelos autores dos trabalhos mantêm o tamanho previsto *in silico*, exceto pela UAP de *G. intestinalis*. As enzimas homólogas de *O. sativa*, *H. sapiens*, *C. albicans* e *S.cerevisiae* apresentaram um peso molecular de aproximados 54 kDa, mostrando um tamanho similar a rUAP expressada nesse trabalho. Ainda, essas mesmas enzimas exibem uma sequência codificante de 1470 pares de base (*O. sativa*) e aproximados 1400 pares de base (*H. sapiens*, *C. albicans* e *S.cerevisiae*), que também são tamanhos similares ao do cDNA da rUAP. A única UAP recombinante que apresentou um tamanho de proteína diferente foi a de *G. intestinalis* (cerca de 48 kDa, embora tenha um cDNA de 1437 pares de base). Por fim, os autores demonstraram que as UAPs recombinantes exibiam atividade enzimática quando testadas *in vitro*.

4.5. Análise filogenética da UAP de insetos

Após obtidas as sequências de aminoácidos pelo domínio funcional com o servidor pHmmer (Finn et al. 2015), foi feita uma conferência manual no banco de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/>) (Bateman et al. 2015) para garantir que as sequências equivaliam àquela da UAP. Depois, foi utilizado o software MEGA 6 (Tamura et al. 2013) para alinhar as sequências com o plug-in ClustalW (Larkin et al. 2007). Algumas das sequências não ficaram coesas no alinhamento ou não eram anotadas como UAP no UniProt, portanto, foram excluídas da análise.

Um total de 40 sequências, compostas de 38 UAPs de insetos e 2 de mamíferos, foram realinhadas e o novo alinhamento foi submetido a um teste com o método *Neighbour-joining*, o qual é mais rápido e já mostra aspectos preliminares da análise, embora os modelos de evolução utilizados por esse método não sejam os mais adequados e não produzam as árvores mais confiáveis (dados não mostrados). As sequências também foram analisadas, através do MEGA, para escolher qual o melhor modelo de substituição de aminoácidos, o que resultou no modelo LG+G+I. O alinhamento, então, foi utilizado para construir a árvore filogenética mostrada na Figura 17.

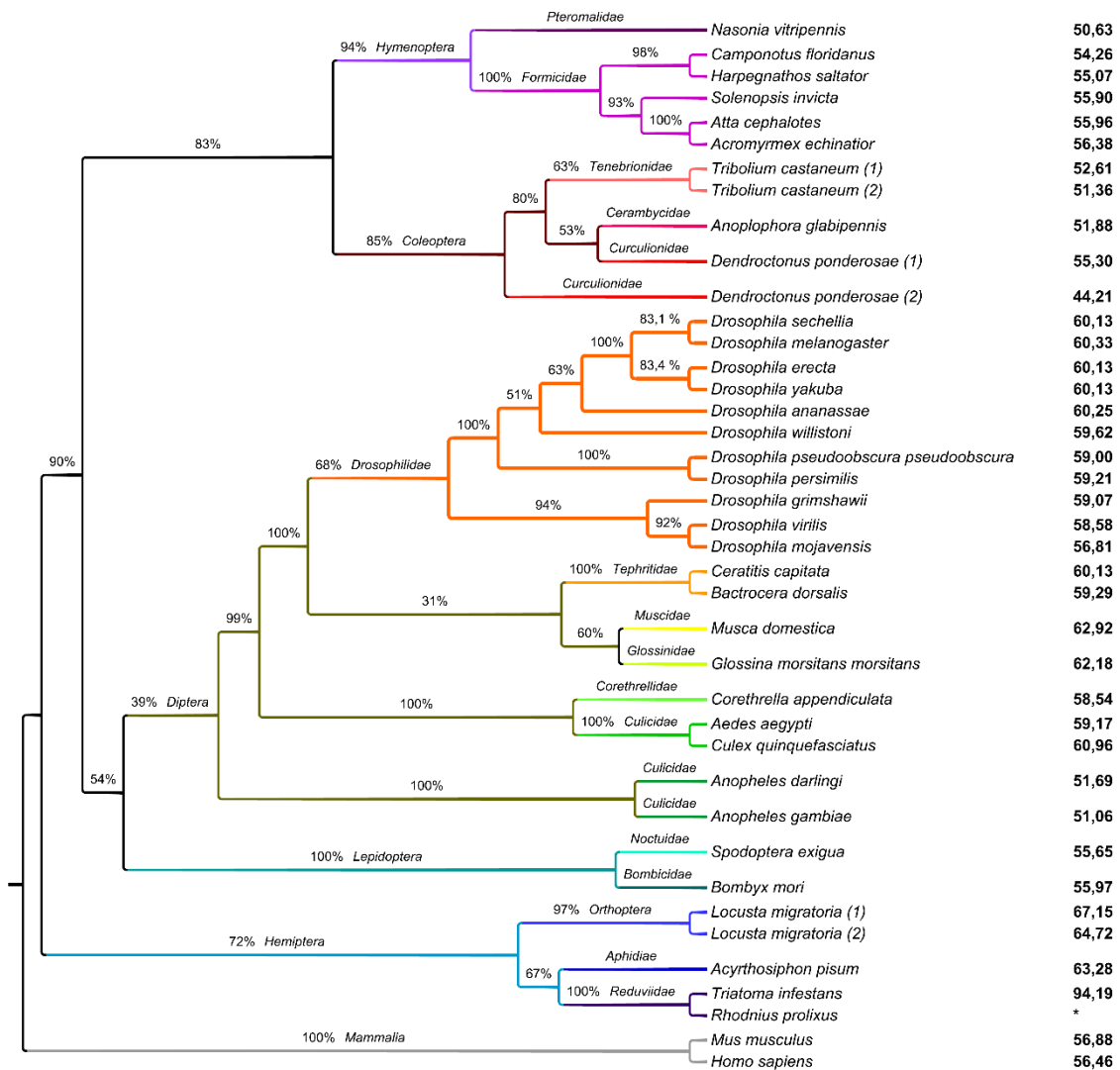


Figura 17. Árvore filogenética das UAPs de insetos. Organismos pertencentes aos mesmos níveis taxonômicos estão organizados em cores. Os nomes acima dos ramos representam os níveis aos quais os organismos pertencem e os números acima dos ramos indicam a porcentagem de vezes que aquela separação foi obtida em uma amostra de 1000 passos de *bootstrap*. Ao lado, os números em negrito indicam a identidade das UAPs com a UAP de *R. prolixus*, marcada com um *. O grupo externo, no qual a árvore foi enraizada, está representado pelo ramo dos mamíferos (Mammalia).

Considerando os resultados obtidos na análise filogenética, podemos ver que a evolução da UAP parece seguir tendências já estabelecidas para a classe dos insetos, visto que sequências de aminoácidos de organismos mais similares ficaram agrupadas (Bradley et al. 2009; Trautwein et al. 2012; Misof et al. 2014). Como a UAP parece ser universal na árvore da vida, muito provavelmente os insetos já possuíam essa enzima quando se diferenciaram em um grupo taxonômico distinto. Ainda assim, é altamente

provável que a enzima tenha co-evoluído juntamente com a espécie, dada a sua importância para a sobrevivência desses organismos (Tonning et al., 2006; Arakane et al., 2011; Liu et al., 2013; Yang et al., 2015). A classe Insecta é bastante antiga evolutivamente (estima-se que tenha cerca de 400 a 450 milhões de anos de separação), portanto há uma enorme diferença entre os organismos atuais dessa classe (Bradley et al. 2009; Misof et al. 2014; Dallai et al. 2016). Isso explica por que há valores de identidade de sequência muito parecidos, em pontas distintas da árvore, quando comparamos com os de referência (*R. prolixus*), inclusive com os valores do grupo externo. Fatores como a presença de mais de uma isoforma dão suporte a essa hipótese, visto que nos dois exemplos descritos com mais de uma de UAP funcional foi mostrado que existia uma diferenciação na função, talvez como uma adaptação dessa enzima às condições ambientais em que cada espécie vivia (Arakane et al. 2011; Liu et al. 2013).

Por fim, até a primeira metade de 2016, não havia sido reportado na literatura outras espécies de insetos, além de *T. castaneum* e *L. migratoria*, que apresentassem mais de uma isoforma para a UAP. Nessa análise foi encontrado mais um organismo com duas cópias para a UAP: o besouro *Dendroctonus ponderosae*. Baseado nos resultados da análise de identidade obtidos, as duas enzimas apresentam 49,26% de identidade, enquanto as de *L. migratoria* apresentam 71,31% e as de *T. castaneum* 61,55%. Essa diferença pode ser causada por uma especialização de funções, como foi descrito nas outras duas espécies (Arakane et al. 2011; Liu et al. 2013). A presença de mais de uma isoforma da UAP não foi identificada apenas em insetos, mas em *H. sapiens*, já foram identificadas 2 isoformas dessa enzima (Peneff et al. 2001) e em *M. musculus* existem três isoformas preditas no GenBank, mostrando que outros organismos também apresentam mais de uma UAP. Logo, com o aumento do número de genomas sequenciados, provavelmente se revelarão mais insetos os quais tenham mais de uma cópia funcional da UAP.

5. Conclusões finais

Esse trabalho trouxe mais alguns esclarecimentos a respeito da UAP de *R. prolixus* e sua interação com o Jbtx.

A análise da atividade da UAP em órgãos mostra que glândulas salivares apresentam uma atividade maior do que os outros órgãos analisados e que o tratamento com Jbtx aumentou a atividade da enzima em glândulas salivares, corpo gorduroso e epiderme, sendo que uma possibilidade para esses órgãos mostrarem aumento de atividade é o direcionamento do Jbtx para eles. Os perfis de expressão gênica das enzimas analisadas, UAP e quitina sintase, mostram um padrão homogêneo entre os diferentes órgãos analisados, mas esse padrão é alterado pelo tratamento com o Jbtx e a JBU, embora os mecanismos pelos quais esses processos ocorrem ainda não sejam claros.

Foi possível clonar e expressar uma UAP recombinante de 56 kDa, tamanho compatível para o previsto *in silico* para a UAP de *R. prolixus*. A enzima clonada apresentou duas mutações, sendo uma sinônima e outra não, acarretando troca de uma valina por uma isoleucina.

A análise filogenética realizada sugere que a UAP é uma enzima presente evolutivamente desde antes da separação dos insetos em um grupo próprio, o que pode ser explicado pela participação essencial dessa enzima no metabolismo destes. Ainda, os resultados obtidos nesse experimento possibilitaram identificar mais um inseto com potenciais duas isoformas de UAP, já que até este trabalho só haviam sido identificadas duas espécies na literatura.

6. Perspectivas

Baseado nos resultados desse trabalho, podemos estabelecer algumas perspectivas:

- i. Avaliar a interação entre Jbtx e rUAP pela análise da atividade enzimática da enzima na presença de Jbtx;
- ii. Avaliar a interação física entre Jbtx e rUAP pela análise de ultracentrifugação analítica;
- iii. Avaliar o perfil de GPIs e GPIA sintetizados em glândulas salivares na presença de Jbtx por espectrometria de massas;
- iv. Analisar a expressão gênica da enzima inositol-transferase, bem como de outras proteínas ligadas a processos de glicosilação de proteínas;
- v. Caracterizar bioquimicamente a atividade da rUAP em relação a seus parâmetros enzimáticos e cinéticos;
- vi. Produzir um anticorpo a partir da rUAP para avaliar a expressão da enzima a nível proteico por Western Blot e a distribuição tecidual por imunofluorescência;
- vii. Verificar uma possível co-evolução da UAP com as enzimas quitina-sintase e inositol-transferase em insetos a partir de análises evolutivas por bioinformática.

7. Referências bibliográficas

ALVES, E. W. et al. Effects of canatoxin on the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum membranes. **Toxicon**, 1992. v. 30, n. 11, p. 1411–1418.

ARAKANE, Y. et al. Both UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylases of *Tribolium castaneum* are critical for molting, survival and fecundity. **Insect biochemistry and molecular biology**, 2011. v. 41, n. 1, p. 42–50

ARAÚJO, S. J. et al. Mummy/cystic encodes an enzyme required for chitin and glycan synthesis, involved in trachea, embryonic cuticle and CNS development - analysis of its role in drosophila tracheal morphogenesis. **Developmental biology**, 2005. v. 288, n. 1, p. 179–193.

ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation insect fat body: an overview. **Annual review of entomology**, 2010. p. 207–228.

BARJA-FIDALGO, C. et al. Role of resident macrophages in canatoxin-induced in vivo neutrophil migration. **Inflammation**, 1992. v. 16, n. 1, p. 1–12.

BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARÃES, J. A.; CARLINI, C. R. Lipoxygenase-mediated secretory effect of canatoxin the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds. **Toxicon**, 1991. v. 29, n. 4-5, p. 453–459.

BARRETO-SANTANA, D. et al. Susceptibility of different *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) to a brazilian strain of *Trypanosoma rangeli* (sc58/kp1-). **Biomédica**, 2015. v. 35, p. 81–89.

BARROS, P. R. et al. Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox-2ec: implications to the mechanism of the action of insecticidal peptides derived from ureases. **Biochimica et biophysica acta - proteins and proteomics**, 2009. v. 1794, n. 12, p. 1848–1854.

BASSERI, H. R.; TEW, I. F.; RATCLIFFE, N. A. Identification and distribution of carbohydrate moieties on the salivary glands of *Rhodnius prolixus* and their possible

involvement in attachment/invasion by *Trypanosoma rangeli*. **Experimental parasitology**, 2002. v. 100, n. 4, p. 226–234.

BATEMAN, A. et al. Uniprot: a hub for protein information. **Nucleic acids research**, 2015. v. 43, n. D1, p. D204–D212.

BENJAMIN, C. F.; CARLINI, C. R.; BARJA-FIDALGO, C. Pharmacological characterization of rat paw edema induced by canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds. **Toxicon**, 1992. v. 30, n. 8, p. 879–885.

BRADLEY, T. J. et al. Episodes in insect evolution. **Integrative and comparative biology**, 2009. v. 49, n. 5, p. 590–606.

BULIK, D. A. et al. UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase, a key enzyme in encysting *Giardia*, is allosterically regulated. **Journal of biological chemistry**, 2000. v. 275, n. 19, p. 14722–14728.

BULIK, D. A.; LINDMARK, D. G.; JARROLL, E. L. Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase from encysting *Giardia*. **Molecular and biochemical parasitology**, 1998. v. 95, n. 1, p. 135–139.

CARLINI, C. et al. Central nervous effects of the convulsant protein canatoxin*. **Acta farmacológica et toxicológica**, 1984. v. 54, p. 161–166.

CARLINI, C. R. et al. Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. **Journal of economic entomology**, 1997. v. 90, n. 2, p. 340–348.

CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon**, jan. 1981. v. 19, n. 5, p. 667–675.

CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A.; RIBEIRO, J. M. C. Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. **British journal of pharmacology**, 19 fev. 1985. v. 84, n. 2, p. 551–560.

CARLINI, C. R.; LIGABUE-BRAUN, R. Ureasas as multifunctional toxic proteins: a review. **Toxicon : official journal of the international society on toxinology**, fev. 2016. v. 110, p. 90–109.

COAST, G. M. Neuroendocrine control of ionic homeostasis in blood-sucking insects. **The journal of experimental biology**, 2009. v. 212, n. Pt 3, p. 378–86.

DALLAI, R.; GOTTARDO, M.; BEUTEL, R. G. Structure and evolution of insect sperm: new interpretations in the age of phylogenomics. **Annual review of entomology**, 2016. v. 61, n. 1, p. 1–23.

DEFFERRARI, M. S. et al. A phospholipase A2 gene is linked to jack bean urease toxicity in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. **Biochimica et biophysica acta - general subjects**, 2013. v. 1840, n. 1, p. 396–405.

DEFFERRARI et al. Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease induces eicosanoid-modulated hemocyte aggregation in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. **Toxicon**, 2014. v. 82, p. 18–25.

DIAS, J.; SILVEIRA, A.; SCHOFIELD, C. The impact of Chagas' disease control in latin america - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2002. v. 97, n. 5, p. 603–612.

DOSREIS, G. A. et al. Glycoinositol phospholipids from *Trypanosoma cruzi* transmit signals to the cells of the host immune system through both ceramide and glycan chains. **Microbes and infection**, 2002. v. 4, n. 9, p. 1007–1013.

EDWARDS, T. E. et al. Structure of uridine diphosphate N-acetylglucosamine pyrophosphorylase from *Entamoeba histolytica*. **Acta crystallographica section f: structural biology communications**, 2015. v. 71, p. 560–565.

FANG, W. et al. Genetic and structural validation of *Aspergillus fumigatus* UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase as an antifungal target. **Molecular microbiology**, 2013. v. 89, n. 3, p. 479–493.

FERGUSON, M. A. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, 1997. v. 352, n. 1359, p. 1295–302.

FERREIRA-DASILVA, C. T. et al. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. **Archives of insect biochemistry and physiology**, 2000. v. 44, n. April, p. 162–171.

FINN, R. D. et al. Hmmer web server: 2015 update. **Nucleic acids research**, 2015. v. 43, n. W1, p. W30–8.

GALVANI, G. L. et al. Effect of the urease-derived peptide Jaburetox on the central nervous system of *Triatoma infestans* (Insecta: Heteroptera). **Biochimica et biophysica acta**, fev. 2015. v. 1850, n. 2, p. 255–62.

GALVÃO, C. et al. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, 2003. v. 36, n. 202, p. 1–36.

GARCIA, E. D. S.; GARCIA, M. L. M. Control of protease secretion in the intestine of fifth instar larvae of *Rhodnius prolixus*. **Journal of insect physiology**, 1977. v. 23, n. 2, p. 247–251.

GAZOS-LOPES, F. et al. Glycoinositolphospholipids from trypanosomatids subvert nitric oxide production in *Rhodnius prolixus* salivary glands. **Plos one**, 2012. v. 7, n. 10.

GHAZALEH, F. A. et al. Stimulation of calcium influx and platelet activation by canatoxin : methoxyverapamil inhibition and downregulation by cGMP 1. **Archives of biochemistry and biophysics**, 1997. v. 339, n. 2, p. 362–367.

GIRALDO-CALDERÓN, G. I. et al. VectorBase: an updated bioinformatics resource for invertebrate vectors and other organisms related with human diseases. **Nucleic acids research**, 2015. v. 43, n. D1, p. D707–D713.

GOURBIÈRE, S. et al. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. **Heredity**, 2012. v. 108, n. 3, p. 190–202.

HASHIMOTO, K.; SCHOFIELD, C. J. Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America. **Parasites & vectors**, 2012. v. 5, n. 1, p. 45.

HONG, Y.; KINOSHITA, T. Trypanosome glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. **Korean journal of parasitology**, 2009. v. 47, n. 3, p. 197–204.

HUMPHREYS, G. B. et al. Mummy, a UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase, modulates dpp signaling in the embryonic epidermis of *Drosophila*. **Developmental biology**, 2013. v. 381, n. 2, p. 434–445.

ITKONEN, H. M. et al. UAP1 is overexpressed in prostate cancer and is protective against inhibitors of N-linked glycosylation. **Oncogene**, 2014. n. August, p. 1–7.

KATOH, T.; TIEMEYER, M. The n's and o's of *Drosophila* glycoprotein glycobiology. **Glycoconjugate journal**, 2013. v. 30, n. 1, p. 57–66.

KINOSHITA, T. Biosynthesis and deficiencies of glycosylphosphatidylinositol. **Proceedings of the japan academy. series b, physical and biological sciences**, 2014. v. 90, n. 4, p. 130–143.

LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, 2007. v. 23, n. 21, p. 2947–2948.

LIMA FERREIRA, L. DE; PEREIRA, M. H.; GUARNERI, A. A. Revisiting *Trypanosoma rangeli* transmission involving susceptible and non-susceptible hosts. **Plos One**, 2015. v. 10, n. 10, p. 1–14.

LIMA GOMES, J. E. P.; AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S. Comparative studies on the growth and reproductive performances of *Rhodnius prolixus* reared on different blood sources. **Memorias instituto oswaldo cruz**.

LIU, X. et al. Molecular and functional analysis of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylases from the migratory locust, *Locusta migratoria*. **Plos One**, 2013. v. 8, n. 8, p. e71970.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time and quantitative PCR. **Methods**, 2001. v. 25, p. 402–408.

LOPES, F. C. et al. Pliable natural biocide: Jaburetox is an intrinsically disordered insecticidal and fungicidal polypeptide derived from jack bean urease. **FEBS Journal**, 2015. v. 282, n. 6, p. 1043–1064.

LOPEZ, A. B. et al. Transcription regulation is demonstrated for five key enzymes in *Giardia intestinalis* cyst wall polysaccharide biosynthesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 2003. v. 128, n. 1, p. 51–57.

LORENZO, M. G. Genetic basis of triatomine behavior: lessons from available insect genomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2013. v. 108, p. 63–73.

MACECHKO, P. T. et al. Galactosamine-synthesizing enzymes are induced when *Giardia* encyst. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 1992. v. 56, n. 2, p. 301–309.

MADDRELL, S. H. P. Excretion in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus* Stål. **Journal of Experimental Biology**, 1963. v. 40, p. 247–256.

MAJEROWICZ, D. et al. Looking for reference genes for real-time quantitative PCR experiments in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). **Insect Molecular Biology**, 2011. v. 20, n. 6, p. 713–722.

MARTINELLI, A. H. S. et al. Function studies on Jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. **Bba - general subjects**, 2014. v. 1840, n. 3, p. 935–944.

MARTINI, S. V.; NASCIMENTO, S. B.; MORALES, M. M. *Rhodnius prolixus* malpighian tubules and control of diuresis by neurohormones. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2007. v. 79, n. 1, p. 87–95.

MARUYAMA, D. et al. Crystal structure of uridine-diphospho-n-acetylglucosamine pyrophosphorylase from *Candida albicans* and catalytic reaction mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, 2007. v. 282, n. 23, p. 17221–17230.

MERZENDORFER, H. Insect chitin synthases: a review. **Journal of Comparative Physiology b: biochemical, systemic, and environmental physiology**, 2006. v. 176, n. 1, p. 1–15.

MERZENDORFER, H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. **European Journal of Cell Biology**, 2011. v. 90, n. 9, p. 759–769.

MERZENDORFER, H; ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **The Journal of Experimental Biology**, 2003. v. 206, p. 4393–4412.

MESQUITA, R. D. et al. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas' disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2016. v. 113, n. 10, p. 201600205.

MIO, T. et al. The eukaryotic UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylases: gene cloning, protein expression, and catalytic mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, 1998. v. 273, n. 23, p. 14392–14397.

MIO, T. et al. *Saccharomyces cerevisiae* GNA1, an essential gene encoding a novel acetyltransferase involved in UDP-N-acetylglucosamine. **Journal of Biological Chemistry**, 1999. v. 274, n. 1, p. 424–429.

MISOF, B. et al. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. **Science**, 2014. v. 346, n. 6210, p. 763–767.

MOK, M. T. S. et al. *Giardia intestinalis*: molecular characterization of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase. **Gene**, 2005. v. 357, n. 1, p. 73–82.

MOK, M.; EDWARDS, M. R. Kinetic and physical characterization of the inducible UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase from *Giardia intestinalis* *. **Journal of Biological Chemistry**, 2005. v. 280, n. 47, p. 39363–39372.

MORROT, A. et al. Evasion and immuno-endocrine regulation in parasite infection: two sides of the same coin in Chagas' disease? **Frontiers in Microbiology**, 2016. v. 7, n. May, p. 1–10.

MOUGABURE-CUETO, G.; PICOLLO, M. I. Insecticide resistance in vector Chagas' disease: evolution, mechanisms and management. **Acta Tropica**, 2015. v. 149, p. 70–85.

MULINARI, F. et al. Jaburetox-2ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. **Peptides**, 2007. v. 28, n. 10, p. 2042–2050.

NORDQUIST, J. E.; GOKTURK, C.; ORELAND, L. Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) gene expression in alloxan-induced diabetes in mice. **Molecular Medicine**, 2002. v. 8, n. 12, p. 824–829.

ONS, S. Neuropeptides in the regulation of *Rhodnius prolixus* physiology. **Journal of Insect Physiology**, 2016.

PALUZZI, J. P. V. Anti-diuretic factors in insects: the role of CAPA peptides. **General and Comparative Endocrinology**, 2012. v. 176, n. 3, p. 300–308.

PANZERA, F. et al. Cytogenetics and genome evolution in the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). **Cytogenetic and Genome Research**, 2010. v. 128, n. 1-3, p. 77–87.

PATIN, D. et al. Purification and biochemical characterisation of GlmU from *Yersinia pestis*. **Archives of Microbiology**, 2015. v. 197, n. 3, p. 371–378.

PENEFF, C. et al. Crystal structures of two human pyrophosphorylase isoforms in complexes with UDPGlc(Gal)NAC: role of the alternatively spliced insert in the enzyme oligomeric assembly and active site architecture. **Embo Journal**, 2001. v. 20, n. 22, p. 6191–6202.

PIACENTE, F. et al. Characterization of a UDP-N-acetylglucosamine biosynthetic pathway encoded by the giant DNA virus Mimivirus. **Glycobiology**, 2014. v. 24, n. 1, p. 51–61.

PIOVESAN, A. R. et al. Stage-specific gut proteinases of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*: role in the release of entomotoxic peptides from *Canavalia ensiformis* urease. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 2008. v. 38, n. 11, p. 1023–1032.

PIOVESAN, A. R. et al. *Canavalia ensiformis* urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels in planar lipid bilayers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1 abr. 2014. v. 547, p. 6–17.

PIRES-ALVES, M. et al. Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. **Plant and Cell Physiology**, 2003. v. 44, n. 2, p. 139–145.

RIBEIRO-DASILVA, G. et al. Blood glucose alterations induced in rats by canatoxin, a protein isolated from jack bean (*Canavalia ensiformis*) seeds. **Toxicon**, jan. 1986. v. 24, n. 8, p. 775–782.

RODENBURG, K. W. et al. Sequence analysis of the non-recurring C-terminal domains shows that insect lipoprotein receptors constitute a distinct group of LDL receptor family members. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 2006. v. 36, n. 4 SPEC. ISS., p. 250–263.

SANTOS JUNIOR, M. C. et al. Structure-based drug design studies of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase, a key enzyme for the control of witches' broom disease. **Chemistry Central Journal**, 2013. v. 7, p. 1.

SCHIMMELPFENG, K. et al. Mummy encodes an UDP-N-acetylglucosamine-diphosphorylase and is required during *Drosophila* dorsal closure and nervous system development. **Mechanisms of Development**, 2006. v. 123, n. 6, p. 487–499.

SERNA, C. et al. A synthetic peptide from *Trypanosoma cruzi* mucin-like associated surface protein as candidate for a vaccine against Chagas' disease. **Vaccine**, 2014. v. 32, n. 28, p. 3525–3532.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, 2011. v. 7, n. 1, p. 539.

STAL, C. Monographie der gattung conorhinus and verwandten. **Berliner Entomol. Zeits.**, 1859. v. 3, p. 99–117.

STANISÇUASKI, F. et al. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). **Toxicon**, 2005. v. 45, n. 6, p. 753–60.

STANISÇUASKI, F. et al. In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2ec on *Rhodnius prolixus* malpighian tubules. **Journal of Insect Physiology**, 2009. v. 55, n. 3, p. 255–263.

STANISÇUASKI, F. et al. Jack bean urease alters serotonin-induced effects on *Rhodnius prolixus* anterior midgut. **Journal of Insect Physiology**, 2010. v. 56, n. 9, p. 1078–1086.

- STANIŒUASKI, F.; CARLINI, C. R. Plant ureases and related peptides: understanding their entomotoxic properties. **Toxins**, fev. 2012. v. 4, n. 2, p. 55–67.
- STEEL, C. G. H.; VAFOPOULOU, X. Circadian orchestration of developmental hormones in the insect, *Rhodnius prolixus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2006. v. 144, n. 3, p. 351–364.
- STOKES, M. J. et al. The synthesis of UDP-N-acetylglucosamine is essential for bloodstream form *Trypanosoma brucei* *in vitro* and *in vivo* and UDP-N-acetylglucosamine starvation reveals a hierarchy in parasite protein glycosylation. **Journal of Biological Chemistry**, 2008. v. 283, n. 23, p. 16147–16161.
- SUMNER, J. B. Enzyme urease. **Journal of Biological Chemistry**, 1926. v. 69, p. 435–441.
- TAKISHIMA, K.; SUGA, T.; MAMIYA, G. The structure of jack bean urease. The complete amino acid sequence, limited proteolysis and reactive cysteine residues. **European Journal of Biochemistry/FEBS**, 1988. v. 175, n. 1, p. 151–65.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, 2013. v. 30, n. 12, p. 2725–2729.
- TARTAKOFF, A. M.; SINGH, N. How to make a glycoinositol phospholipid anchor. **Trends in Biochemical Sciences**, 1992.
- TOMAZETTO, G. et al. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. **Enzyme and Microbial Technology**, nov. 2007. v. 41, n. 6-7, p. 821–827.
- TONNING, A. et al. Hormonal regulation of *mummy* is needed for apical extracellular matrix formation and epithelial morphogenesis in *Drosophila*. **Development (Cambridge, England)**, 2006. v. 133, p. 331–341.
- TRAUTWEIN, M. D. et al. Advances in insect phylogeny at the dawn of the postgenomic era. **Annual Review of Entomology**, 2012. v. 57, p. 449–68.
- TUFAIL, M.; TAKEDA, M. Molecular characteristics of insect vitellogenins. **Journal of Insect Physiology**, 2008. v. 54, n. 12, p. 1447–1458.

- URBANIAK, M. D. et al. A novel allosteric inhibitor of the uridine diphosphate N-acetylglucosamine pyrophosphorylase from *Trypanosoma brucei*. **ACS chemical biology**, 2013. v. 8, n. 9, p. 1981–1987.
- WANG, Z. et al. Functional inactivation of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1 (UAP1) induces early leaf senescence and defence responses in rice. **Journal of Experimental Botany**, 2015. v. 66, n. 3, p. 973–987.
- WIGGLESWORTH, B. Y. V. B. Local and general factors in the development of “pattern” in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). **Journal of Experimental Biology**, 1940. v. 17, p. 180–200.
- WIGGLESWORTH, V. B. The physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II. factors controlling moulting and “metamorphosis”. **Quart. Journal of Micr. Sci.**, 1934. v. 77, p. 193–221.
- WIGGLESWORTH, V. B. Memoirs: the function of the corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). **Quarterly Journal of Microscopical Science**, 1936. v. s2-79, n. 313, p. 91–121.
- WIGGLESWORTH, V. B. The determination of characters at metamorphosis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). **Journal of Experimental Biology**, 1940. v. 17, p. 180–200.
- YAMAMOTO, K. et al. Inhibition of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase by uridine. **Biochim. Biophys. Acta**, 1980. v. 614, n. 2, p. 367–372.
- YANG, W. J. et al. Two chitin biosynthesis pathway genes in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae): molecular characteristics, expression patterns, and roles in larval-pupal transition. **Journal of Economic Entomology**, 2015. v. 108, n. 5, p. 2433–2442.
- YE, J. et al. Primer-blast: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, 2012. v. 13, n. 1, p. 134.
- YOROZU, P. et al. *Propionibacterium acnes* catalase induces increased Th1 immune response in sarcoidosis patients. **Respiratory Investigation**, 2015. v. 53, n. 4, p. 161–9.

8. Apêndice

8.1. Anotação de sequências da UAP de insetos no UniProt

Tabela S1. Lista final de sequências da UAP utilizadas na análise filogenética.

Organismo	Anotação no UniProt
<i>Acromyrmex echinatior</i>	F4X1T0
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	J9JW65
<i>Aedes aegypti</i>	Q6GW02
<i>Anopheles darlingi</i>	X1YJN5
<i>Anopheles gambiae</i>	Q7Q3I4
<i>Anoplophora glabipennis</i>	V5GSW0
<i>Atta cephalotes</i>	W4X5H9
<i>Bactrocera dorsalis</i>	S4TMY9
<i>Bombyx mori</i>	H9IWH7
<i>Camponotus floridanus</i>	E2AX38
<i>Ceratitis capitata</i>	W8BGG5
<i>Corethrella appendiculata</i>	U5EJU3
<i>Culex quinquefasciatus</i>	B0W7S4
<i>Dendroctonus ponderosae</i> (1)	J3JWJ4
<i>Dendroctonus ponderosae</i> (2)	N6U0E6
<i>Drosophila ananassae</i>	B3MVM1
<i>Drosophila erecta</i>	B3N5R9

<i>Drosophila grimshawii</i>	B4JQ73
<i>Drosophila melanogaster</i>	Q8IPJ6
<i>Drosophila mojavensis</i>	B4KKX7
<i>Drosophila persimilis</i>	B4GKK5
<i>Drosophila pseudoobscura pseudoobscura</i>	Q29PE0
<i>Drosophila sechellia</i>	B4I1W1
<i>Drosophila virilis</i>	B4M9K1
<i>Drosophila willistoni</i>	B4N7M5
<i>Drosophila yakuba</i>	B4P0D5
<i>Glossina morsitans morsitans</i>	D3TMF2
<i>Harpegnathos saltator</i>	E2C8J0
<i>Homo sapiens</i>	Q16222
<i>Locusta migratoria (1)</i>	T1RR64
<i>Locusta migratoria (2)</i>	T1RRG3
<i>Mus musculus</i>	Q3TAD4
<i>Musca domestica</i>	T1P8W1
<i>Nasonia vritripennis</i>	K7JA42
<i>Rhodnius prolixus</i>	T1IG81
<i>Solenopsis invicta</i>	E9IB23
<i>Spodoptera exigua</i>	C0JP36
<i>Triatoma infestans</i>	A0A023F4T7

Tribolium castaneum (1)

D6W8B1

Tribolium castaneum (2)

D6WXC5

8.2. Alinhamento das sequências utilizadas na análise filogenética

```
1
Mus_musculus          -MNVNDLKQR  LSCAGQEHLL  QFWNELSEAQ  QV-ELYMELQ
Homo_sapiens         -MNINDLKL  LSKAGQEHLL  RFWNELEEAQ  QV-ELYAELQ
Triatoma_infestans   MSDISEIAAF  LKSYDQEHIL  HFWDKLSDDD  RD-ELIQDIK
Rhodnius_prolixus    MSDISEITGF  LKSYGQEHIL  HFWEKLSDDD  RH-ELIQDIK
Locusta_migratoria   MLDIGKCKQE  LTKYGOHLL  RFWDELSEEE  RA-ELLLDLQ
Locusta_migratoria   MQDLTKTKEE  LSNYGOGHIL  QFWDELSDAE  RT-ELLTQLQ
Acyrtosiphon_pisum   MSDFESITAL  LKKYDQEHII  KFWNRLTEKE  KK-FLLEDIC
Tribolium_castaneum  MSEIDEIRAK  LRDKKHEHLL  RYWPENNEE  KK-HLLEQLK
Tribolium_castaneum  MANFDEIERK  LRQLDQSHLL  QFFYKFSDEE  KK-NFLQHLQ
Anoplophora_glabipennis  MSLLEDIRTK  LGKYNQSHVL  QFWEDLPEA  QT-NFLSOLS
Dendroctonus_ponderosae  MSSLEKREL  LVEYQDHL  KFDVOLDENE  RE-SFLKQLK
Dendroctonus_ponderosae  MEGFDDMKKL  LEACGQSHVL  KFWDELNETQ  QK-GFLAQLN
Spodoptera_exigua    -MSYDNIFEN  LNSHGQGHLL  KYWPDLSEKE  RA-QLLSDIK
Bombyx_mori          ---YETLLRN  LKDHGQEHLI  KYWSVLSEEQ  RK-QLSDEIL
Aedes_aegypti        MANLDALKTS  LAKHDEQLL  QYWEELDEDQ  RR-LLTEDID
Anopheles_darlingi   -QOYSALAKE  LSQWHQEHLL  TFWKELTEDE  RNLVDSISS
Anopheles_gambiae    ---RYATIAEQ  LGKWQAHL  TFWDELAEPO  RATMLDSLAD
Culex_quinquefasciatus  MANFEAVKEG  LAKNGQEHLL  KYWDELSEDQ  RA-LLLEDIG
Ceratitis_capitata   MPIYDVLYER  LSKVGQEHLL  KFWDELTLQ  QE-ILVRDIE
Bactrocera_dorsalis  MTVYDELYER  LSKVGQEHLL  KFWDELTLQ  QE-ILVRDID
Drosophila_sechellia  MTDYLSLHSR  LAQVGQEHLL  KFWPELTNDE  RI-DLVRDIE
Drosophila_virilis   TDQLNELHTR  LAQVRQEHLL  KFWAELSADE  RT-KLARDID
Drosophila_grimshawii  ---ENQLRAR  LAQVKQEHLV  KFWPELNTQ  RA-CLARDIA
Drosophila_melanogaster  MTDYLSLHSR  LAQVGQEHLL  KFWPELTNDE  RI-DLVRDIE
Drosophila_erecta    MTDYLSLHSR  LAQVGQEHLL  KFWPELSDNE  RI-DLVRDIE
Drosophila_pseudoobscura_pseudoobscura  MTDYQSLRMR  LDPVHQEHLL  KFWDELTPDK  RA-DLVRDIE
Drosophila_willistoni  MTDYLSMHSR  LTVQVQEHLL  KFWHELTTDE  RA-DLVRDIE
Drosophila_yakuba    MTDYLSLHSR  LAQVGQEHLL  KFWPELSDNE  RI-DLVRDIE
Drosophila_persimilis  MTDYQSLRMR  LDPVHQEHLL  KFWDELTPDK  RA-DLVRDIE
Drosophila_mojavensis  TDHLKKQOIR  LAQVRQEHLL  KFFDELTPDK  RL-QLLRDLQ
Drosophila_ananassae  MTDYLSLHSR  LAQVGQEHLL  KFWPELTNDE  RI-ELVQDIE
Musca_domestica      MTDYALHQR  LQKVGQEHLL  KFWDELSEDE  RK-OLEQDIS
Corethrella_appendiculata  MIVFEALREQ  LAKYKQDHL  EFWSELSDDQ  RK-ELIEDIN
Glossina_morsitans_morsitans  IDYRDLHER  LVQVGQEHLL  KFWCELNENE  RE-OLIHIE
Solenopsis_invicta   ---MERLRDK  LSAYDQEHLL  RFWEELMDED  KN-OLENDIA
Camponotus_floridanus  ---MEGLREK  LNEYHQVHLL  RFWEELTDED  RN-OLENDIE
Harpegnathos_saltator  ---MERQRKK  LAEYNQEHLL  RFWEELTDED  RH-HLENDID
Atta_cephalotes     ---MERLKKK  LSEYDQEHLL  TFWEELVDED  RN-OLENDID
Acromyrmex_echinatior  ---MERLKKK  LSEYDQEHLL  RFWEELVDED  RN-OLENDIN
Nasonia_vitripennis  -MSYTKLKITL  LEKHNQEHLL  QFWDNISEKE  QE-LLVNELT
```

41

Mus_musculus	AMNFEELNSF	FRKAIGEFDR	SS--HQEKV	DARMEPVPRQ
Homo_sapiens	AMNFEELNFF	FQKAIEGFNQ	SS--HQKNV	DARMEPVPRE
Triatoma_infestans	TINIPEVISY	FQKATENLSS	D----QEKL	DDRLLKPIPS
Rhodnius_prolixus	TINIPEVISY	FQKATENVSS	D----QEKL	DDRLLKPIPS
Locusta_migratoria	EVNVAEVTSY	FRAVESLITE	D----QAKL	DDRMQPVAE
Locusta_migratoria	EIDIPAEIAC	FN--KILAE	D----QSKL	DDRMQPVAE
Acyrtosiphon_pisum	ELNIPPEVGM	FKKTVEVMNA	N----HQKL	DNRMNPIPAE
Tribolium_castaneum	SIDIEKINDL	FRAESSYKE	TQRTY- - - -	DDQMKPLDPS
Tribolium_castaneum	GLLDASARL	FERAKNCLDV	AP-----D	TEDMKPIPHS
Anoplophora_glabipennis	DINFDDVSNL	FNRALGSLSE	ETKK-----L	DTLMEPTPPD
Dendroctonus_ponderosae	TIKQEVNAL	FRKAKESITE	DVEK-----V	DARMQVPAD
Dendroctonus_ponderosae	SIDLKAALQM	WQKAHVDOEA	CK-----	KVADNGLSPI
Spodoptera_exigua	KIDFAEVNEL	FRRANDTSKV	I-----LEKV	ED-LKPIPS
Bombyx_mori	KLDLTVHAT	FSRAIESTKK	I-----LEKL	DDDLKPIPS
Aedes_aegypti	ELNLEEVNEF	FKRATSSLEE	G-----NAKL	DDKMEPVCED
Anopheles_darlingi	SMDCATLDEA	FKRAMATDTS	A-----KEDL	NEWLRPLAKD
Anopheles_gambiae	SVDCALDEA	FRRAMATATS	T-----KEDL	NELLKPLARE
Culex_quinquefasciatus	ELNLEEVKEF	FERATSSMAE	S-----GEKL	DDKMEPVCED
Ceratitis_capitata	ELNLELKLKLY	FDRATASLQE	N-----GIKL	DDRMQVPPEE
Bactrocera_dorsalis	ELNLELKLKLY	FERATASLQE	N-----GIKL	DDRMQVPPEE
Drosophila_sechellia	ELNLELKLKLY	FDRATVMNE	N-----GIKL	DDRLQPLPEG
Drosophila_virilis	ELCLDEIKLY	WERATISMNA	N-----GIKL	DGRLQPIPDG
Drosophila_grimshawii	VLNLELKLKLY	FDRATISMNE	N-----SVKL	DDRLQPIPDG
Drosophila_melanogaster	ELNLELKLKLY	FDRATVMNE	N-----GIKL	DDRLQPLPEG
Drosophila_erecta	ELNLELKLKLY	FDRATVMNE	N-----GIKL	DDRLQPLPEG
Drosophila_pseudoobscura_pseudoobscura	ELNLELKLKLY	FDRATVMNE	N-----GIKL	DDRLQPLPEG
Drosophila_willistoni	ELNLELKLKLY	FDRATISMNE	N-----GIKL	DDRLQPLPEG
Drosophila_yakuba	ELNLELKLKLY	FDRATVMNE	N-----GIKL	DDRLQPLPDG
Drosophila_persimilis	ELNLELKLKLY	FDRATVMNE	N-----GIKL	DDRLQPLPEG
Drosophila_mojavensis	ELDFDEIKPN	WERATISMNA	N-----GIKL	DSRMQMPED
Drosophila_ananassae	ELNLELKLKLY	FDRATVMNE	N-----GIKL	DDRLQPLPEG
Musca_domestica	ELDLNELKEY	FDRATSSLAQ	N-----GLKL	DDRLQPLPDG
Corethrella_appendiculata	ELNLFDEVNLF	FERATASLEE	S-----GEKL	DDKLPPIPEA
Glossina_morsitans_morsitans	ELDLNELKLKLY	FDRATISLNO	N-----ALKL	DDCLQPIPDH
Solenopsis_invicta	ELDFHEILIGY	FKRAVESSQY	VG-----QNL	DDKIQPIDES
Camponotus_floridanus	ELDLQETTAY	FKKAVESSQH	IG-----QGL	DDKVRPIDEA
Harpegnathos_saltator	ELNLELKLKLY	FKKAVESSQC	IG-----KGT	DDKVRPIDEK
Atta_cephalotes	ELDLQETTAY	FKKAVESSQI	IA-----QNTL	DDKIQPIDQT
Acromyrmex_echinatior	ELNLELKLKLY	FKKAVESSQT	IA-----QNTL	DDKIQPIDQT
Nasonia_vritripennis	SLNTPFITSI	FHRAK-SSDD	AK-----EQLI	DNKIKPIPPN

81

Mus_musculus	VLGSAIR-DQ	EQLQAWSEEG	LSQISQNKVA	VLLLAGGQGT
Homo_sapiens	VLGSAIR-DQ	DQLQAWSEEG	LFQISQNKVA	VLLLAGGQGT
Triatoma_infestans	LFGAVSRTP	DLLSYEEEG	LKQISEGHVG	VLLMAGGQGT
Rhodnius_prolixus	LFGAVSRTP	ELLSYEEEG	LKQISEGHVG	VLLMAGGQGT
Locusta_migratoria	FYGGVIRSEA	EDLRFYEEEG	LRQISAGKVG	VLLLAGGQGT
Locusta_migratoria	LYGSLVLRNR	EDLQKYEDEG	FQQISAGKVG	VLLLAGGHGT
Acyrtosiphon_pisum	LYGAVNRSPPK	ELLIKYEQIG	LEQISQKVG	VLLMAGGQGT
Tribolium_castaneum	HFSEESTSTE	ETLNKYRTFG	LEEIAAGRVA	VLLLAGGQGT
Tribolium_castaneum	QFSEEGCDG	ETLERYRIRG	LEATGAGEVG	VLLLAGGQGT
Anoplophora_glabipennis	QFEYEKGVDE	DKLEEYRKKG	LKAIKSRVA	VLLLAGGQGT
Dendroctonus_ponderosae	QFGSEKNADK	EELMITYRSIG	LEEISKGRVA	VLLLAGGQGT
Dendroctonus_ponderosae	EVEVEKVLPH	AEIEAYRNIG	FTEIAKGTIA	VIVLAGGQGT
Spodoptera_exigua	HYEAVPNLSN	EKILEYENIG	LKEISDGKVG	VLLLAGGQAT
Bombyx_mori	HYESVPLNTP	DKIEEYENIG	FKEICNGKVG	VLLLAGGQAT
Aedes_aegypti	KFLSISRTP	DQLKYYHEEG	LRQIADGKVG	VLLMAGGQGT
Anopheles_darlingi	MLLSVDDTTE	AELQDFRQLG	LEQIRLGKVG	VLLLAGGQGT
Anopheles_gambiae	RYLSVAEATE	VELEDLRQAG	LEQIROGRVG	VILLAGGQGT
Culex_quinquefasciatus	KFLSISGSNP	DQLTKYYBEG	LRQIAGSKVG	VLLMAGGQGT
Ceratitis_capitata	KLVSIIERTAE	ERLKYEEEG	LQOISAGHVA	VLLLAGGQGT
Bactrocera_dorsalis	NLVSIIERTAE	ERLKAYEAE	MROISAGHVA	VLLLAGGQGT
Drosophila_sechellia	KLISIIARAPL	EKLDAYRDEG	LLQISNGHVA	VLLMAGGQGT
Drosophila_virilis	QILSTARTTS	DKLNAYREEG	LQOISHGHVA	VLLMAGGQGT
Drosophila_grimshawii	KILSIAGTTE	DKLNMYREEG	LQOIGNGRVA	VLLMAGGQGT
Drosophila_melanogaster	KLISIIARAPL	EKLDAYRDEG	LLQISNGHVA	VLLMAGGQGT
Drosophila_erecta	KLISIIARAPL	EKLAAYRDEG	LLQISNGHVA	VLLMAGGQGT
Drosophila_pseudoobscura_pseudoobscura	KVISIARTPE	DKLASRDEG	LRQISNGHVA	VLLMAGGQGT
Drosophila_willistoni	KLISIIARTSG	EKLNAYRDEG	LQOISNGHVA	VLLMAGGQGT
Drosophila_yakuba	KLISIIARAPL	EKLAAYRDEG	LLQISNGHVA	VLLMAGGQGT
Drosophila_persimilis	KVISIARTPE	DKLASRDEG	LRQISNGHVA	VLLMAGGQGT
Drosophila_mojavensis	QILSIARTSP	EKLNAYRKIG	LQOIAKHGVA	VLLMAGGQGT
Drosophila_ananassae	KLISIIARSP	EKLSAYRDEG	LRQISQGHVA	VLLMAGGQGT
Musca_domestica	KLIRISRAPE	ELLSYREEEG	LKQISLGHVG	VLLMAGGQGT
Corethrella_appendiculata	KFLSIIAKTAK	EHLDFKNEG	LRRIANOVG	VLLLAGGQGT
Glossina_morsitans_morsitans	NLISISRTSE	ERLSAYREEG	LKQISEGHVG	VLLMAGGQGT
Solenopsis_invicta	KIASAKTSTE	EELNMYEERG	LKEIAEGCVA	VLLMAGGQGT
Camponotus_floridanus	KIASVKTSTK	EELKRYEELG	LTEVVENRVA	VLLMAGGQGT
Harpegnathos_saltator	KIASAKTSTK	EELRMYEELG	LKEVAESRVA	VLLMAGGQGT
Atta_cephalotes	KIASVKTSTE	EELNTYKEHG	LKEIAQGCVA	VLLLAGGQGT
Acromyrmex_echinatior	KIASVKTSTE	EELNTYKERG	LKEIAQGCVA	VLLLAGGQGT
Nasonia_vritripennis	TIESIQSSS	AKLDSYENIG	LQEIADGKVA	VILLAGGQGT

121

Mus_musculus	RLGVSYPKGM	YDVGLPSHKT	LFQIQAERIL	KLOQLAEKHH
Homo_sapiens	RLGVAYPKGM	YDVGLPSRKT	LFQIQAERIL	KLOQVAEKYY
Triatoma_infestans	RLGSSDPKGM	YDVGLPSHKS	LYQIQAERIR	KLMEIATERL
Rhodnius_prolixus	RLGSTDPKGM	YDVGLPSHKS	LYQIQAERIK	KLMEIATERS
Locusta_migratoria	RLGVSYPKGM	YDVGLPSHKS	LYQVQAEIRL	RLQELACERT
Locusta_migratoria	RLGVFPYKGM	HDVGLPSHKS	LYQIQAERIR	RLQKLAFDKT
Acyrtosiphon_pisum	RLGANYPKGM	YDIGLPSHKS	LYRIQGERIR	CLIRLANKDF
Tribolium_castaneum	RLGVSYPKGM	YNVGLPPGKT	LFQIQAEIRR	RLQTLAKGKT
Tribolium_castaneum	RLGVTYPKGM	YSVGLPSGKT	IFQIQAEIRR	RVQHLAKKHT
Anoplophora_glabipennis	RLGVFPYKGM	CPI SLPSGKT	LFQIQAEIRR	SVVRLAKKET
Dendroctonus_ponderosae	RLGVNYPKGM	YSVNLPSGKS	LFQIQAEIRR	RVINLAKQET
Dendroctonus_ponderosae	RLGMPYPKGM	CPTGIPSGKT	LFQIQAEIRI	RLTILAHGRT
Spodoptera_exigua	RLGFVHPKGM	YDVGLPSRKT	LFQIQAEIRV	RVQOMAAEKY
Bombyx_mori	RLGFGHPKGM	YDVGLPSRKT	LFQIQAEIRL	RVQOMAAEKY
Aedes_aegypti	RLGFAPPKGM	FNVGLPSNKS	LFRIQGERIL	KLQRLAAELT
Anopheles_darlingi	RLGSTAPKGT	YNVGLPSGKS	LFQIQAEIRR	RLQQLAGEG-
Anopheles_gambiae	RLGSTAPKGT	YNVNLPSGKS	LFQIQAEIRR	KLOQLAGGE-
Culex_quinquefasciatus	RLGFVHPKGM	YNVGLPSNKS	LFHVQAQRIL	KLQRLAAEFA
Ceratitis_capitata	RLGFVHPKGM	YDVGLPSNKS	LFRLQAEIRI	KLEELAYAAE
Bactrocera_dorsalis	RLGFVHPKGM	YDVGLPSKKS	LFRLQAEIRI	KLEELAYAAE
Drosophila_sechellia	RLGFDHPKGM	YDVGLQSRKT	LFRIQAEIRL	KLEELAQEAN
Drosophila_virilis	RLGFDQPKGM	YDVGLQSRKT	LFRIQAEIRL	KLEQLAEEMC
Drosophila_grimshawii	RLGFDQPKGM	YDVGLQSHKT	LFRIQAEIRL	KVEQLAMEVV
Drosophila_melanogaster	RLGFDHPKGM	YDVGLQSRKT	LFRIQAEIRL	KLEELAQEAN
Drosophila_erecta	RLGFDHPKGM	YDVGLQSRKT	LFRIQAEIRL	KLEELAQEAT
Drosophila_pseudoobscura_pseudoobscura	RLGFDHPKGM	YDVGLQSRKS	LFRIQAEIRL	KLQELAQEAN
Drosophila_willistoni	RLGFDHPKGM	YDVGLQSRKT	LFRIQAEIRL	KLEELAQDAT
Drosophila_yakuba	RLGFDHPKGM	YDVGLQSRKT	LFRIQAEIRL	KLEELAQEAT
Drosophila_persimilis	RLGFDHPKGM	YDVGLQSRKS	LFRIQAEIRL	KLQELAQEAN
Drosophila_mojavensis	RLGFDHPKGM	YDVGLQSHKT	LFRIQAEIRL	KLEQLAEBAE
Drosophila_ananassae	RLGFDHPKGM	YDVGLQSKKT	LFRIQAEIRL	RLEELAHHAT
Musca_domestica	RLGFAYPKGM	YDVGLQSGKT	LFRIQAEIRI	KLEELAFEAT
Corethrella_appendiculata	RLGFSHPKGM	YNI GLPSNKT	LFQVQAEIRV	KLQQLAAELT
Glossina_morsitans_morsitans	RLGFANPKGM	FNVGLQSNKT	LFQIQAEIRL	RLQELAAEIT
Solenopsis_invicta	RLGVTYPKGM	YDVALPSRKT	LFQIQAEIRI	SLQNMQQQRY
Camponotus_floridanus	RLGVTYPKGI	YDVLDPHKT	LFQIQAEIRL	RLQNIABQRC
Harpegnathos_saltator	RLGVTYPKGI	YDIDLPSHKT	LFQIQAEIRL	RLQNIABQQC
Atta_cephalotes	RLGVTYPKGM	YDVALPSHKT	LFQIQAEIRL	CLQSMQQQC
Acromyrmex_echinatior	RLGVTYPKGM	YDVALPSHKT	LFQIQAEIRL	CLQSMQQQY
Nasonia_vitripennis	RLGVDFPKGM	FNIKLPSEET	LFHLQALRIK	SLQNLAKRRL

161

Mus_musculus	GNKCTIPWYI	MTSGRTMEST	KEFFTKHKFF	GLKKNVVFV
Homo_sapiens	GNKCTIPWYI	MTSGRTMEST	KEFFTKHKYF	GLKKNVVFV
Triatoma_infestans	GKPCVITWFI	MTSEHTMDPT	IEFFEKNSYF	GLDKNNVVVF
Rhodnius_prolixus	GKSCVITWFI	MTSEHTMDPT	IEFFEKNNYF	GLEKNNVVVF
Locusta_migratoria	GVYNHITWYI	MTSEATMCP	QYFANHNYF	GLKKNIVMF
Locusta_migratoria	GVYNHIWYI	MTSEATMQPT	LDYFDKNNYF	GLKKNVVMF
Acyrtosiphon_pisum	GSSKGLPWFI	MTSEHTMEPT	RKYFKENNYF	GLDEKKIIF
Tribolium_castaneum	GKSGKIPWYI	MTSGPTDEAT	EKFLQNNYF	GLDKITDVLV
Tribolium_castaneum	GKGGKVTWYI	MTSGPTDKMT	ETFLKSHNFF	GLDPQNVVLF
Anoplophora_glabipennis	GSTGRVCWYI	MTSQATHDAT	AKFLEGHKYF	GLNEDDVVLF
Dendroctonus_ponderosae	GRVGSVWYI	MTSGPTNATT	KKFLEKNDYF	GLNQDDVILF
Dendroctonus_ponderosae	GVVGKIPWYF	MTSDATHVLT	EKFLQNNYF	NLGRENVLV
Spodoptera_exigua	GKEGKITWYI	MTSEHTRGPT	ADYFRSHSYF	GLNEDI VVF
Bombyx_mori	GNEGKITWYI	MTSEHTKAPT	ANYFKSHSYF	GLNENDVVF
Aedes_aegypti	GKTGRITWYI	MTSEHTMIPT	KKYFEEVDYF	GLKAEDIMVF
Anopheles_darlingi	---ARIRWYI	MTSEHTHTET	LEYFRLNRYF	GLPAEQIRMF
Anopheles_gambiae	---GRIRWYI	MTSEHTHTET	LDYFRHQYF	GLPPDQVRMF
Culex_quinquefasciatus	GOSGRITWYI	MTSEATMVPT	KKYFEQNNYF	GLBEENIVMF
Ceratitis_capitata	GRRGVITWYI	MTSEHTIQPT	NEYFMANNYF	GLKKNILF
Bactrocera_dorsalis	GSRGNITWYI	MTSEHTIQPT	NEYFMANNYF	GLKKNILF
Drosophila_sechellia	GKRGHITWYI	MTSEHTVQPT	YDYFVANNFF	GLKAENVLLF
Drosophila_virilis	GRRGRIWYI	MTSEHTMQPT	LDYLEANNYF	GLRENVVLF
Drosophila_grimshawii	GKRGHIVWYI	MTSEHTKQPT	LDYFAANNYF	GLREDQVVLV
Drosophila_melanogaster	GKRGHITWYI	MTSEHTVQPT	YDYFVANNFF	GLKAENVLLF
Drosophila_erecta	GKHGHITWYI	MTSEHTVQPT	YDYFVANNFF	GLKAENVLLF
Drosophila_pseudoobscura_pseudoobscura	GKLGHIWYI	MTSEHTVQPT	YDYFVANNFF	GLKPNVLLF
Drosophila_willistoni	GKRGHITWYI	MTSEHTVQPT	YDYFVANNFF	GLKSENVLLF
Drosophila_yakuba	GKRGHITWYI	MTSEHTVQPT	YDYFVANNFF	GLKAENVLLF
Drosophila_persimilis	GKLGHIWYI	MTSEHTVQPT	YDYFVANNFF	GLKPNVLLF
Drosophila_mojavensis	GQRGRIVWYI	MTSEHTMQPT	LNYLEANNYF	GLLVENVMLF
Drosophila_ananassae	GQRGHITWYI	MTSEHTVQPT	EDYFVANNYF	GLKAENVLLF
Musca_domestica	GKKGITWYI	MTSEHTLQPT	LEYFESNNYF	GLKKNVVMF
Corethrella_appendiculata	GQYGRITWYI	MTSEHTKQPT	QYFEMHDF	GLREDIVMF
Glossina_morsitans_morsitans	GKKGITWYI	MTSEHTIKPT	YDYFTANNYF	GLQKENVVVF
Solenopsis_invicta	-----I	LTSEATHDAT	VEYLSKRNIF	GLKEKNVKTIF
Camponotus_floridanus	GKRGEITWYI	LTSDATHDIT	VAYLRQHDYF	GLKEKNVRAF
Harpegnathos_saltator	GKYGEITWYI	LTSEATHDAT	VTYLSKHNIF	GLKEKNVRAF
Atta_cephalotes	GKHGEITWYI	LTSEATHDAT	VEYLNKRNYF	GLKEKNVKEF
Acromyrmex_echinatior	GKHGEITWYI	LTSEATHDAT	VEYLNKHNIF	GLKEKNVKTIF
Nasonia_vitripennis	GKSKDITWYI	MTSDATHDST	VDYFETNDHF	GLDKNNI IAF

201

Mus_musculus	QOGLPAMSF	DGKIILEEEN	KVSMAPDGNG	GLYRALAAON
Homo_sapiens	QOGLPAMSF	DGKIILEEKN	KVSMAPDGNG	GLYRALAAON
Triatoma_infestans	EOGLLPCTFF	DGKIIMDKPH	KISLAPDGNG	GLYRALRDKK
Rhodnius_prolixus	EOGLLPCTFF	DGKIIMDKPH	KISLAPDGNG	GLYRALRDKK
Locusta_migratoria	EOGLLPCTFF	DGKIIMDRKY	KLRSRPDGNG	GLYRALRDRK
Locusta_migratoria	EOGFLPSFTF	QKIIIMDKKY	KLSMSPDGNG	GLYRALKDNK
Acyrtosiphon_pisum	EOYMLPAFTF	DGKIVMEGIN	KISKSPDGNG	GIYKALRDRN
Tribolium_castaneum	KOGLLPCFDF	EGRAFLDGKA	NIARAPDGNG	GIYRALAQNK
Tribolium_castaneum	KOGLLPCFDF	DGKIILEAPN	LVALAPDGNG	GIYRALHVNG
Anoplophora_glabipennis	QOGLLPFSFY	DGRIILDRKD	SISLAPDGNG	GIYALALRKN
Dendroctonus_ponderosae	KOGLLPCFDF	DGKLLLDKKN	AVAMAPDGNG	GIYRALSERH
Dendroctonus_ponderosae	KOALVPCFDL	EGKLLMEEKD	EIAMTPDGNG	GLYRALREOK
Spodoptera_exigua	EOGTLPCFDF	EGKIFLDEKY	HVSSAPDGNG	GLYRALNKQG
Bombyx_mori	EOGTLPCFDF	EGKIFLDEKY	HLSAAPDGNG	GLYRALKTQG
Aedes_aegypti	EOGSLPCYDF	EGKILLDEKH	RVAKAPDGNG	GLYRALRDRG
Anopheles_darlingi	RORSVPCVDF	EGRIIMDKKW	KLATAPDGNG	GIYRALKDEG
Anopheles_gambiae	RORSVPCVDF	EGRIILDEKH	KVATAPDGNG	GIYRALKDEG
Culex_quinquefasciatus	EOGSLPCYDF	NGKILLDEKH	RISKAPDGNG	GIYRALRDRC
Ceratitis_capitata	EOGSLPCFDY	DGRIILDEKY	RVARAPDGNG	GLYRALKQOG
Bactrocera_dorsalis	EOGSLPCFDY	DGRIILDQKH	RVARAPDGNG	GLYRALKQOG
Drosophila_sechellia	EOGSLPCFEY	DGRIILDEKH	RVARAPDGNG	GIYRAMKROG
Drosophila_virilis	EOGSLPCFDN	DGRIILDEKH	RVSRSPPDGNG	GIYRAMQRAG
Drosophila_grimshawii	EOGSLPCFDY	DGRVILDEKH	RVRSRPPDGNG	GIYRAMERSG
Drosophila_melanogaster	EOGSLPCFEY	DGRIILDEKH	RVARAPDGNG	GIYRAMKROG
Drosophila_erecta	EOGSLPCFEY	DGRIILDEKH	RVARAPDGNG	GIYRAMKROG
Drosophila_pseudoobscura_pseudoobscura	EOGSLPCFEY	DGRIILDEKH	RVARAPDGNG	GIYRAMKROG
Drosophila_willistoni	EOGSLPCFEY	DGRIILDERH	RVARAPDGNG	GIYRAMKROG
Drosophila_yakuba	EOGSLPCFEY	DGRIILDEKH	RVARAPDGNG	GIYRAMKROG
Drosophila_persimilis	EOGSLPCFEY	DGRIILDEKH	RVARAPDGNG	GIYRAMKROG
Drosophila_mojavensis	EOGSLPCFDY	DGRIILDEKH	RVARSPDGNG	GIYRAMQRAG
Drosophila_ananassae	EOGSLPCFEY	DGRIILDEKH	RVARAPDGNG	GIYRAMKROG
Musca_domestica	KOQALPCYDY	DGKIMLDQKH	RIARAPDGNG	GIYRALNKQG
Corethrella_appendiculata	EOGSLPCYDM	NGKIFLDEKH	RVAKSPDGNG	GLYRALRDRG
Glossina_morsitans_morsitans	EOGSLPCFEF	DGKIILDQKH	RIARAPDGNG	GIYRALKQOG
Solenopsis_invicta	KOGLMPCFTF	DGKIILDAKH	RISKAPDGNG	GLYRALNKQG
Camponotus_floridanus	KOGLMPCFTF	DGKIILDAKH	RVSKAPDGNG	GLYRALKNHK
Harpegnathos_saltator	KOGLMPCFTF	DGKIILDAKH	RISKAPDGNG	GLYRALENQG
Atta_cephalotes	KOGLMPCFTF	DGKIILDAKY	RVSKAPDGNG	GLYRALKTQG
Acromyrmex_echinatior	KOGLMPCFTF	DGKIILDAKH	RVSKAPDGNG	GLYRALKAQG
Nasonia_vritripennis	KOGLMPCFKF	DGKIILDDKY	RISKAPDGNG	GLYTALKNEG

241

Mus_musculus	IVEDMEQRGI	CSIHVYCVDN	ILVKVADPRF	IGFCIQKGAD
Homo_sapiens	IVEDMEQRGI	WSIHVYCVDN	ILVKVADPRF	IGFCIQKGAD
Triatoma_infestans	VLDMIENKGI	KYLHAHSVND	ILVKVADPVF	IGYCVQKNVD
Rhodnius_prolixus	VLDMIENKGI	MYLHAHSVND	ILVKVADPIF	IGYCVLKSAD
Locusta_migratoria	VLDDIERRDI	KYLHAYSVND	ILVKVADPVF	IGYCI SKNAE
Locusta_migratoria	ILEDMERRGI	MYLNAHSVND	ILIKVADPIF	IGYCVLKGAE
Acyrtosiphon_pisum	VLDEIKRLGV	QYLHAHSVND	ILVKVADPIF	IGYCI TKNAE
Tribolium_castaneum	ILDDMQQRGV	KYVHVHSVND	ILVKVADPVF	VGYCKSKHAD
Tribolium_castaneum	VLDDMRRRGV	KYIHAHSVND	ILTKVADPVF	IGYFIEKGGD
Anoplophora_glabipennis	ILQDMERRGV	KYVHVHSVND	ILVKVADPIF	IGYCVMKGAD
Dendroctonus_ponderosae	ILDDMEQRGI	KYVHAHSVND	ILVKVADPVF	LGYCVKKAQE
Dendroctonus_ponderosae	ILQEMEKKGI	KYIHIHSVND	ILVKVADPVF	MKCIIRDQVD
Spodoptera_exigua	ILADIAKRGV	EHLHAHSVND	ILIKVADPVF	IGYCKSKHAD
Bombyx_mori	ILDDISVRGI	QHLHAHSVND	ILIKVADPVF	IGYCKSKHAD
Aedes_aegypti	ILDDLERRGV	LYLHAHSVND	ILIKVADPVF	IGYFVEQKAD
Anopheles_darlingi	ILDELQREGV	RYLHAHSVND	ILIKVADPVF	IGYCI RKEAD
Anopheles_gambiae	ILDELEREGV	LYLHAHSVND	ILIKVADPVF	VGYCVRRKAD
Culex_quinquefasciatus	ILDDLERRGV	LYLHAHSVND	ILIKVADPIF	IGYCVQESAD
Ceratitis_capitata	ILDDINKRGI	LYLHAHSVND	ILTKVSDPVF	IGYCVQEHAD
Bactrocera_dorsalis	ILDDIKKRGV	LYLHAHSVND	ILIKVADPVF	IGYCVQENAD
Drosophila_sechellia	ILDDMQQRGV	LYLHAHSVND	ILIKVADPVF	IGYCVQEKAD
Drosophila_virilis	ILDDMQQRGI	LYVHAHSVND	ILIKVADPIF	IGYCVQEQAD
Drosophila_grimshawii	VLDDIQRRGI	LYLHAHSVND	ILIKVADPIF	IGYCVKEQAD
Drosophila_melanogaster	ILDDMQQRGV	LYLHAHSVND	ILIKVADPVF	IGYCVQEKAD
Drosophila_erecta	ILDDMQQRGV	LYLHAHSVND	ILIKVADPVF	IGYCVQEKAD
Drosophila_pseudoobscura_pseudoobscura	ILEDMQQRGV	LYLHAHSVND	ILIRVADPVF	IGFCVQEKAD
Drosophila_willistoni	ILDDMQQRGV	LYLHAHSVND	ILIKVADPVF	IGYCVQEKAD
Drosophila_yakuba	ILDDMQQRGV	LYLHAHSVND	ILIKVADPVF	IGYCVQEKAD
Drosophila_persimilis	ILEDMQQRGV	LYLHAHSVND	ILIKVADPVF	IGFCVQEKAD
Drosophila_mojavensis	VLDDMKRRSI	LYVHAHSVND	ILIKVADPIF	IGYCVQEQAD
Drosophila_ananassae	ILDDMQQRGV	LYLHAHSVND	ILIKVADPVF	IGYCVQEKAD
Musca_domestica	ILDDLTKRGI	LYLHAHSVND	ILIKVADPVF	IGYCVRENAD
Corethrella_appendiculata	ILDDMERRGV	LYLHAHSVND	ILIKVADPVF	IGYCVAKQSD
Glossina_morsitans_morsitans	ILDDMEKRGV	LYLHAHSVND	ILTKVADPVF	IGYCVQANAD
Solenopsis_invicta	ILDDMAKRGV	RSIHAHSVND	ILVKVADPIF	IGYCLLSSTD
Camponotus_floridanus	ILDDMIQRRI	RSIHAHSVND	IMVKVADPIF	IGYCLLSSTD
Harpegnathos_saltator	ILDDMQQRGI	RSIHAHSVND	ILVKVADPIF	IGYCLLSSTD
Atta_cephalotes	ILNDMEQRGI	RSVHVHSVND	ILVKVADPIF	IGYCLLSSTD
Acromyrmex_echinatior	ILDDMEQRGI	QSVHAHSVND	ILVKVADPIF	IGYCLLSSTD
Nasonia_vritripennis	ILNDMKSRI	NSVHAFSVND	ILVKVADPVF	IGFCISRSAD

281

Mus_musculus	CGAKVVEKTN	PTEPVGVCR	VDGVYQVVEY	SEISLATAQR
Homo_sapiens	CGAKVVEKTN	PTEPVGVCR	VDGVYQVVEY	SEISLATAQR
Triatoma_infestans	CGAKVVEKAF	PTEALGVVGN	VDGKYQVVEY	SEITLTKTAE
Rhodnius_prolixus	CGAKVVEKAF	PTEALGVVGN	VDGKYQVVEY	SEITLTKTAE
Locusta_migratoria	CGAKVVEKSF	PEEPVGVVCO	VDGRYQVVEY	SEITLTKTAEQ
Locusta_migratoria	CGAKVVEKAF	PEEPVGVVCO	VDGRYQVVEY	SEITLTKTAQQ
Acyrtosiphon_pisum	CGAKVVEKAY	PSEPLGVVCE	VDGKQVVEY	SEITENTAEK
Tribolium_castaneum	CAAKVVQKTN	PDEAVGVVCF	VDGQVRVVEY	SEITPSTASL
Tribolium_castaneum	CAAKVVKAG	PTEAVGVVCO	TKGRFQVVEY	SEISEEKAHL
Anoplophora_glabipennis	CGNKVVRKEV	PTEPVGVCR	VDGRFQVVEY	SEITDQNTANL
Dendroctonus_ponderosae	CGAKVVSNS	PNEAVGVVCK	VDGKYQVVEY	SEITEKTANL
Dendroctonus_ponderosae	FGLKVIKTD	PTESLGLVLK	VDSDVKILEY	SEITPAAPDL
Spodoptera_exigua	CAAKVVQKST	PSEAVGVVCR	VNGHYKVVEY	SELTDEAESR
Bombyx_mori	CAAKVVQKSS	PSEAVGVVCR	VNGHYKVVEY	SELTDEAESR
Aedes_aegypti	CGAKVVEKSH	PNEAVGVVCO	VDGKYQVVEY	SEITQKTAE
Anopheles_darlingi	CGVKKVIEIK	PDEAIGVLCE	VKGKYQVVEY	SELSNESANR
Anopheles_gambiae	CGVKKVIEKQ	PDEAVGVVCE	VKGKYQVVEY	SELSSETANR
Culex_quinquefasciatus	CAAKVVEKSH	PNEAVGVVCO	VDGKYQVVEY	SEITQKTAE
Ceratitis_capitata	CAAKVVEKSH	PNEAIGVVAI	VDGKNQVVEY	SEISAKTAE
Bactrocera_dorsalis	CAAKVVEKSH	PNEAIGVVAI	VDGKNQVVEY	SEISAKTAE
Drosophila_sechellia	CAAKVVEKAA	PNEAVGVVAI	VDGKYQVVEY	SEISAKTAE
Drosophila_virilis	CAAKVVEKSA	PNEAVGVVAI	VDNKYQVVEY	SEISAKTAE
Drosophila_grimshawi	CAAKVVEKSS	PNEAVGVVAI	VDGKYQVVEY	SEISATTAEM
Drosophila_melanogaster	CAAKVVEKAA	PNEAVGVVAI	VDGKYQVVEY	SEISAKTAE
Drosophila_erecta	CAAKVVEKAA	PNEAVGVVAI	VDGKYQVVEY	SEISAKTAE
Drosophila_pseudoobscura_pseudoobscura	CAAKVVEKAA	PNEAVGVVAI	VDGKYQVVEY	SEISAKTAE
Drosophila_willistoni	CAAKVVEKAA	PNEAVGVVAI	VDGKYQVVEY	SEISAKTAE
Drosophila_yakuba	CAAKVVEKAA	PNEAVGVVAI	VDGKYQVVEY	SEISAKTAE
Drosophila_persimilis	CAAKVVEKAA	PNEAVGVVAI	VDGKYQVVEY	SEISAKTAE
Drosophila_mojavensis	CAAKVVEKSS	PNEAVGVVAI	VDNKYQVVEY	SEISOKTAE
Drosophila_ananassae	CAAKVVEKAS	PNEAVGVVAI	VDGKYQVVEY	SEISAKTAE
Musca_domestica	CAAKVVEKSS	PTEAVGVVAI	VDGKYQVVEY	SEISAKTAE
Corethrella_appendiculata	CAAKVVEKAH	AHEAVGVVCI	VDGKYQVVEY	SEITNKTAEM
Glossina_morsitans_morsitans	CAAKVVEKSA	PNEAVGVVAI	VDGKYQVVEY	SEISTKTAEL
Solenopsis_invicta	CGVKKVIEKSS	PS---EYGI	VENHYQVVEY	SEMTKKTAEL
Camponotus_floridanus	CGVKKVIEKSS	PSEAVGVVCK	VENHYQVVEY	SEITKETAEL
Harpegnathos_saltator	CGVKKVED---	-----HYQVVEY	SEITKETAEL	SEITKETAEL
Atta_cephalotes	CGVKKVIEKSS	PSEAVGVVCK	VEDHYQVVEY	SEITKETAEL
Acromyrmex_echinatior	CGVKKVIEKSS	PSEAVGVVCK	VEDHYQVVEY	SEITKETAEL
Nasonia_vitripennis	CGVKKVVKRS	ADEPVGVVCO	VDQKRVVVEY	SEILPSTAE

321

Mus_musculus	RSS-DGRLLF	NAGNICNHFF	TVPFLLKDVVN	VYEPQLQHHV
Homo_sapiens	RSS-DGRLLF	NAGNICNHFF	TVPFLLRVDVN	VYEPQLQHHV
Triatoma_infestans	RNN-DGRLTF	SAGNICNHFF	TTEFLRSIAN	KYECDLKLHV
Rhodnius_prolixus	RNN-DGRLTF	SAGNICNHFF	TTEFLRSVAN	KYECDLKLHV
Locusta_migratoria	SDI-DGRLTF	RAGNICNHFF	TTEFLQKIAN	KHENNLKLHV
Locusta_migratoria	RNA-DGRLTF	RAGNICNHFF	TTOFLRKVAH	DHESSLQHHV
Acyrtosiphon_pisum	RNP-DGRLTF	SAGNICNHFF	TIDFLNSVAH	KYNSKLLHV
Tribolium_castaneum	TDK-NDRLVF	NAGNICNHFF	TVDFLKEVAD	KYEDKLLHV
Tribolium_castaneum	RDE-EGNLVY	SAGNICNHFF	TTVFLQRVSD	EFHEKLLHV
Anoplophora_glabipennis	RDD-EGNLIF	RAGNICNHFF	TTGFLKLTSE	NYEDQLKLHV
Dendroctonus_ponderosae	TDP-SGKLVF	SSGNICNHFF	STSFLORVAK	QHESELKLHV
Dendroctonus_ponderosae	RKTPDDDLVF	NAGNICNHFF	TIDFLRKVSV	QHESDLTLHM
Spodoptera_exigua	RTA-DGRLTF	SAGNICNHFF	SSEFLAKICN	-FESKLLHI
Bombyx_mori	RNP-DGRLTF	SAGNICNHFF	SADFLRKISN	-FETKLLHI
Aedes_aegypti	RKE-DGRLVF	NAGNICNHFF	TTSFLRKIGT	TPEKDLKLHV
Anopheles_darlingi	RNP-DGKLVF	NAGNICNHFF	TTEFLR---R	IAETVPLPHV
Anopheles_gambiae	RNP-DGKLVF	NAGNICNHFF	TSAFRL---R	IAETVPLPHV
Culex_quinquefasciatus	RKP-DGRLTF	NAGNICNHFF	TTSFLRKIGS	TPEKELKLHV
Ceratitis_capitata	RNA-DGRLTF	SAGNICNHFF	TAAFLMKIGE	TPEKELKLHV
Bactrocera_dorsalis	RNP-DGRLTF	SAGNICNHFF	SAAFLOHIGD	TYEKELKLHV
Drosophila_sechellia	RNS-DGRLTF	SAGNICNHFF	SSNFLQKIGS	TPEQELKLHV
Drosophila_virilis	RNA-DGRLTF	SAGNICNHFF	TVAFLHKIGS	TYERKLLHV
Drosophila_grimshawi	RSA-KGRLKF	SAGNICNHFF	SAAFLNKIGR	TYERQLKLHV
Drosophila_melanogaster	RNS-DGRLTF	SAGNICNHFF	SSNFLQKIGS	TYEQELKLHV
Drosophila_erecta	RNS-DGRLTF	SAGNICNHFF	SSNFLQKIGS	TPEQELKLHV
Drosophila_pseudoobscura_pseudoobscura	RNS-DGRLTF	SAGNICNHFF	SSSFLQDIGN	KPEQELKLHV
Drosophila_willistoni	RNS-DGRLTF	SAGNICNHFF	SAHFLQKIGS	SPEQELKLHV
Drosophila_yakuba	RNS-DGRLTF	SAGNICNHFF	SSNFLQKIGS	TPEQELKLHV
Drosophila_persimilis	RNS-DGRLTF	SAGNICNHFF	SSSFLQDIGN	KPEQELKLHV
Drosophila_mojavensis	RNA-DGRLTY	SAGNICNHFF	TVAFLQKIGN	SYERKLLHV
Drosophila_ananassae	RNS-DGRLTF	SAGNICNHFF	SANFLQKIGN	TPEQELKLHV
Musca_domestica	RNP-DGRLSF	SAGNICNHFF	STNFLKIGS	TYEQELKLHV
Corethrella_appendiculata	RNV-DGKLVF	SAGNICNHFF	TTRFLRKIGD	LHEKELKLHV
Glossina_morsitans_morsitans	RNA-DGRLTF	SAGNICNHFF	TAEFLQKVGN	IYERELKLHV
Solenopsis_invicta	RHA-NGQLMY	NAANICNHFF	TLNFLKDVGY	FYEKNLLHV
Camponotus_floridanus	RHD-NGQLVY	NAANICNHFF	TIDFLKDIVY	FHEKDLILHV
Harpegnathos_saltator	CHA-DGQLVY	NAANICNHFF	TVNFLKDVGY	FHEKDLILHV
Atta_cephalotes	RHV-NGQLIY	NAANICNHFF	TIDFLKDVAY	LYEKDLILHV
Acromyrmex_echinatior	RHV-NGQLIY	NAANICNHFF	TVDFLKVVAH	LYEKDLILHV
Nasonia_vitripennis	QND-KGELVF	NAGNICNHFF	TVSFLDEIAN	KHEDSLDLHI

361

Mus_musculus	AQKKIPYVDS	Q-GYFIK	---	---	PDKPNGIK	MEKFVDFIFQ
Homo_sapiens	AQKKIPYVDT	Q-GOLIK	---	---	PDKPNGIK	MEKFVDFIFQ
Triatoma_infestans	AKKKIPYIDS	D-GKRCK	---	---	PEKPNGIK	IEKFVDFVFO
Rhodnius_prolixus	AKKKIPYIDF	D-GKRCK	---	---	PEKPNGIK	IEKFVDFVFO
Locusta_migratoria	AKKKIPYVDA	Q-GNLCK	---	---	PEKPNGIK	MEKFVDFVFO
Locusta_migratoria	AKKKIPFVDS	Q-GNSCK	---	---	PEKPNGIK	MEKFVDFVFO
Acyrtosiphon_pisum	AKKKISFVND	D-GIACK	---	---	PEEPNGIK	MEKFVDFVFE
Tribolium_castaneum	AKKKIPYLDD	E-GNLVK	---	---	PAQVSGVK	IEKFVDFVFP
Tribolium_castaneum	AKKKIPFVDE	T-GOTVT	---	---	PEKPNGIK	IEKFVDFVFP
Anoplophora_glabipennis	ARKKKVPVNE	K-GERVT	---	---	PSSPNGIK	IEKFVDFVFO
Dendroctonus_ponderosae	AKKKIPYVDR	N-GDHIX	---	---	PSEPNGIK	IEKFVDFVFO
Dendroctonus_ponderosae	AQKIVTQING	DGDKVVP	---	---	IFPNCIK	IEKFVDFVIG
Spodoptera_exigua	AKKKIPYVDH	E-GVROK	---	---	EPEPNGIK	MEKFVDFVFE
Bombyx_mori	AKKKIPYIDE	N-GVROK	---	---	PNEPNGIK	MEKFVDFVFE
Aedes_aegypti	AKKKIPFIDS	T-GTRCT	---	---	PDKPNGIK	IEKFVDFVFO
Anopheles_darlingi	AKKKIPFIDT	DDAEATRGOS	---	---	IKPGKPNGIK	MEKFVDFVFP
Anopheles_gambiae	AKKKIPYVDV	ATGER	---	---	LKPTAPNGIK	MEKFVDFVFP
Culex_quinquefasciatus	AKKKIPFVDE	S-GTRCT	---	---	PDKPNGIK	IEKFVDFVFO
Ceratitis_capitata	AKKKIPFVDN	S-GKRIT	---	---	PEKPNGIK	IEKFVDFVFE
Bactrocera_dorsalis	AKKKIPFVDN	S-GKRIT	---	---	PEKPNGIK	IEKFVDFVFE
Drosophila_sechellia	AKKKIPFVDN	A-GKRLT	---	---	PDKPNGIK	IEKFVDFVFE
Drosophila_virilis	AKKKIPFVDN	A-GIRLT	---	---	PNQPNGIK	IEKFVDFVFE
Drosophila_grimshawii	AKKKIPFVDN	A-GKRLT	---	---	PDKPNGIK	IEKFVDFVFE
Drosophila_melanogaster	AKKKIPFVDN	A-GKRLT	---	---	PDKPNGIK	IEKFVDFVFE
Drosophila_erecta	AKKKIPFVDN	A-GKRLT	---	---	PDKPNGIK	IEKFVDFVFE
Drosophila_pseudoobscura_pseudoobscura	AKKKIPFVDN	A-GKRLT	---	---	PDKPNGIK	IEKFVDFVFE
Drosophila_willistoni	AKKKIPFVDN	A-GKRLT	---	---	PDKPNGIK	IEKFVDFVFE
Drosophila_yakuba	AKKKIPFVDN	A-GKRLT	---	---	PDKPNGIK	IEKFVDFVFE
Drosophila_persimilis	AKKKIPFVDN	A-GKRLT	---	---	PDKPNGIK	IEKFVDFVFE
Drosophila_mojavensis	AKKKIPFVDN	A-GNRLT	---	---	PNQPNGIK	IEKFVDFVFE
Drosophila_ananassae	AKKKIPFVDN	A-GKRLT	---	---	PEKPNGIK	IEKFVDFVFE
Musca_domestica	AKKKIPFIDN	S-GKRIT	---	---	PENPNGIK	IEKFVDFVFE
Corethrella_appendiculata	AKKKIPHIEL	VSGSKIT	---	---	PDKINGIK	IEKFVDFVFO
Glossina_morsitans_morsitans	AKKKIPFVDN	S-GKRIT	---	---	PDKPNGIK	IEKFVDFVFO
Solenopsis_invicta	AKKKIPYVNN	D-GERII	---	---	PKIPNGIK	IEKFVDFVFP
Camponotus_floridanus	AKKKIPYIND	E-GERIT	---	---	PKIPNGIK	IEKFVDFVFP
Harpegnathos_saltator	AKKKIPYIND	E-GERIT	---	---	PKSPNGIK	IEKFVDFVFP
Atta_cephalotes	AKKKISYVND	D-GERIV	---	---	PKIPNGIK	IEKFVDFVFP
Acromyrmex_echinatior	AKKKISYVND	D-GERII	---	---	SKIPNGIK	IEKFVDFVFP
Nasonia_vritripennis	AKKKIPFLNE	S-GNKIK	---	---	PDKPNGIK	VEKFVDFVFK

401

Mus_musculus	FAKKFVVYEV	LRDEFSPLK	NADSQNGKDN	PTTARHALMS
Homo_sapiens	FAKKFVVYEV	LRDEFSPLK	NADSQNGKDN	PTTARHALMS
Triatoma_infestans	FSKKLAVWEV	NREDEFSALK	NSDAAD-KDT	PTTARKDLFS
Rhodnius_prolixus	FTKKLAVWEV	NREDEFSALK	NSDAAD-KDT	PTTARKDLFS
Locusta_migratoria	FADNFVWEV	KRNEEFSALK	NADSAE-KDT	PTTARNDLYS
Locusta_migratoria	FTDKFVIWEV	EREKEFSALK	NSDAAQ-KDT	PTTARNDLA
Acyrtosiphon_pisum	FCNRLAVWEV	ERDEEFSALK	NADVPNGKDN	PKTARLDVFS
Tribolium_castaneum	FSKKFVAWEV	PRNSEFSAMK	NADKDK-KDC	PSTAKSDLLA
Tribolium_castaneum	FSDRFVTWEV	PRKSEFSAMK	NMDSVG-KDC	PSTARQDLA
Anoplophora_glabipennis	FSKNFVTWEV	PRHTEFSYVK	NSESAG-KDC	PSTARDDLK
Dendroctonus_ponderosae	FTDKFVTWEV	PRISEFSALK	NPDSVG-KDC	PSTAKRDLV
Dendroctonus_ponderosae	YTONFLWQI	ERFQEPSPIK	NSDASG-KVC	FLTAKKDLLN
Spodoptera_exigua	FAENFICLEV	ARDVEFSALK	NNDAAK-KDC	PSTAREDLR
Bombyx_mori	FAENFICLEV	ARDTEFSALK	NADTAK-KDC	PSTAREDLQ
Aedes_aegypti	FAEHFVTWEV	PRDEEFSALK	NADSAG-KDC	ATTARADLYR
Anopheles_darlingi	LAERFVALEG	RREEEFSALK	NADSVG-FDC	PSSVRNDIYR
Anopheles_gambiae	LAERFVALEG	RREEEFSALK	NADTAG-IDC	PSSVRGDIYR
Culex_quinquefasciatus	FAQHFTVEV	PRDEEFSALK	NADSAG-KDC	ASTARADLYR
Ceratitis_capitata	FAQKFVAMEV	PRHIEFSALK	NSDSAG-KDC	PSTARADLYR
Bactrocera_dorsalis	FAQKFVAMVV	PRHIEFSALK	NADSAG-KDC	PATARADLAR
Drosophila_sechellia	FAQKFVAMEV	PRDEEFSALK	NSDAAG-KDC	PSTARSDLHR
Drosophila_virilis	FAEKFVAMEV	PRDEEFSALK	NADSAG-KDC	PSTARADLHR
Drosophila_grimshawii	FAEKFVAMEV	PRDEEFSALK	NADAAG-KDC	PSTARADLHR
Drosophila_melanogaster	FAQKFVAMEV	PRDEEFSALK	NSDAAG-KDC	PSTARSDLHR
Drosophila_erecta	FAQKFVAMEV	PRDEEFSALK	NSDTAG-KDC	PSTARSDLHR
Drosophila_pseudoobscura_pseudoobscura	FAQKFVAMEV	PRDEEFSALK	NADVAG-KDC	PSTARSDLHR
Drosophila_willistoni	FAEKFVAMEV	PRDEEFSALK	NADVAG-KDC	PKTARADLYR
Drosophila_yakuba	FAQKFVAMEV	PRDEEFSALK	NSDTAG-KDC	PSTARSDLHR
Drosophila_persimilis	FAQKFVAMEV	PRDEEFSALK	NADVAG-KDC	PSTARSDLHR
Drosophila_mojavensis	FAEKFVAMEV	PRDEEFSALK	NADSAG-KDC	PSTARDDLHR
Drosophila_ananassae	FAQKFVAMEV	PRDEEFSALK	NADTAG-KDC	PSTARQDLHR
Musca_domestica	FAQKFVAMEV	PRDEEFSALK	NADSAG-KDC	PSTARSDIYR
Corethrella_appendiculata	FAEKFVAMEV	PRDEEFSALK	NADSVG-KDC	ASTAKLDIYR
Glossina_morsitans_morsitans	FAENFVAMEV	PRDEEFSALK	NSDSAG-KDC	PSTARADLYR
Solenopsis_invicta	FAKNFAVWQG	TREEEFSYVK	NSSSAG-EDC	PSTARIDLIN
Camponotus_floridanus	FAKNFAVWQG	TREEEFSPLK	NSNSAG-QDC	SSTARIDLIN
Harpegnathos_saltator	FSKNFAVWQG	TRDEEFSPLK	NSNSAG-QDC	PSTARIDLIN
Atta_cephalotes	FAKNFAVWQG	TREEEFSPLK	NSNSAG-QDC	PSTARIDLIN
Acromyrmex_echinatior	FAKNFAVWQG	TREEEFSPLK	NSNSAG-QDC	PSTARIDLIN
Nasonia_vritripennis	YSNNFAVWEV	TRENEFSALK	NSNEAG-VDC	PSTARSIDLIN

441

Mus_musculus	LHHCWVLNAG	GHFIDENGR	LPAIPRSATN	GKSEAITADV
Homo_sapiens	LHHCWVLNAG	GHFIDENGR	LPAIPR	---
Triatoma_infestans	LHKRFVEEAG	GKFEQG	---	---
Rhodnius_prolixus	LHKRFVEEAG	GKFEFG	---	---
Locusta_migratoria	LHYQYLTRAG	GKIVADKGS	---	---
Locusta_migratoria	LHSSYIKNAG	GRILHNVD	---	---
Acyrtosiphon_pisum	LHRKYIEKSG	GQFTTD	---	---
Tribolium_castaneum	LHKRYIEKVG	GVVR	---	---
Tribolium_castaneum	LHRTYIEKAG	GVVSA	---	---
Anoplophora_glabipennis	LHKLYIQDAG	GTVTC	---	---
Dendroctonus_ponderosae	LHKSYIEEAG	GLVTEG	---	---
Dendroctonus_ponderosae	LHKRWIETMG	GKCOGE	---	---
Spodoptera_exigua	LHRKYIEEAG	G	---	---
Bombyx_mori	LHKKYIQAG	G	---	---
Aedes_aegypti	LHRKYIEAAG	G	---	---
Anopheles_darlingi	LHRKWLINAG	ALEVTC	---	---
Anopheles_gambiae	LHRKWLIKAG	ATEVLD	---	---
Culex_quinquefasciatus	LHKKYVEAAG	G	---	---
Ceratitis_capitata	LHKRYIEAAG	G	---	---
Bactrocera_dorsalis	LHKRYIEAAG	G	---	---
Drosophila_sechellia	LHKKYIEGAG	G	---	---
Drosophila_virilis	LHRKYIEAG	G	---	---
Drosophila_grimshawi	LHRKYIKDAG	G	---	---
Drosophila_melanogaster	LHKKYIEGAG	G	---	---
Drosophila_erecta	LHKKYIEGAG	G	---	---
Drosophila_pseudoobscura_pseudoobscura	LHKKYIEAG	G	---	---
Drosophila_willistoni	LHKKYIEDAG	G	---	---
Drosophila_yakuba	LHKKYIEGAG	G	---	---
Drosophila_persimilis	LHKKYIEAG	G	---	---
Drosophila_mojavensis	LHRKYIEKAG	G	---	---
Drosophila_ananassae	LHKKYIESAG	G	---	---
Musca_domestica	LHKKYVEAAG	G	---	---
Corethrella_appendiculata	LHKKYIEEAG	G	---	---
Glossina_morsitans_morsitans	LHKKYIEAAG	G	---	---
Solenopsis_invicta	LHKKWLKAG	AK	---	---
Camponotus_floridanus	LHKKWLIDAG	AK	---	---
Harpegnathos_saltator	LHKKWLINAG	AK	---	---
Atta_cephalotes	LHKKWLKAG	AK	---	---
Acromyrmex_echinatior	LHKKWLKAG	AK	---	---
Nasonia_vitripennis	LHKRWLLNAG	AK	---	---

481

Mus_musculus	NHNLKDANDV	PIQCEISPLI	SYAGEGLEGY	VADKEFHAPL	
Homo_sapiens	---LKDANDV	PIQCEISPLI	SYAGEGLESY	VADKEFHAPL	
Triatoma_infestans	---	SVICEISPLV	SYAGEGLKSI	VQKVFKSPL	
Rhodnius_prolixus	---	SVVCEISPLV	SYAGEGLKSI	VQKIFKSPL	
Locusta_migratoria	---	SVICEISPLL	TYAGELEEI	VNNKTFKSPV	
Locusta_migratoria	---	KPICEISPLL	SYAGEALEEV	VANKEFTSPC	
Acyrtosiphon_pisum	---	DIECEISPLL	SYAGEGLKHL	VDGRIFNSLL	
Tribolium_castaneum	---	--DEVEISPL	LSYEENLEQ	VRGKVFKEPI	
Tribolium_castaneum	---	--EVEISPLL	SYTGEELER	VKGKMFTEIT	
Anoplophora_glabipennis	---	--DEVEISPLV	SYAGENLVER	VYKVFDRGT	
Dendroctonus_ponderosae	---	--VDVEISPLL	SYAGEHIEOR	VKGRFEGTI	
Dendroctonus_ponderosae	---	--GVEVSPLL	SYEGEGLALF	RGREFMEEEL	
Spodoptera_exigua	---	IVED	NIDVEISPLL	SYGGENLEDL	VSGEVFTTSP
Bombyx_mori	---	EVAD	DADIEISPLL	SYGGENLDSI	VNGKVFTAGP
Aedes_aegypti	---	IVDG	TE-CEISPLL	SYGGEGLKVL	VHGRTFVSPV
Anopheles_darlingi	---	SDNA	S-DCEISPLL	SYAGEALEKL	TASKSFHCPV
Anopheles_gambiae	---	AADA	SFDCEISPLL	SYAGEGLETA	AAGQSFRCPV
Culex_quinquefasciatus	---	SVDG	VE-VEISPLL	SYGGEGLGSI	VKGTFACPV
Ceratitis_capitata	---	IVHG	EE-CEISPFI	SYAGENLKPL	VAGKSFTSPV
Bactrocera_dorsalis	---	IVHG	EE-CEISPFI	SYAGENLAPL	VAGKSFTSPV
Drosophila_sechellia	---	IVHG	EV-CEISPFV	TYAGENLASH	VEGKSFTSPV
Drosophila_virilis	---	MVHG	EI-CEISPFV	SYAGENLVQL	VGGKSFTGPV
Drosophila_grimshawi	---	MVHG	EI-CEISPLV	SYAGENLARL	VGGKSFTSPV
Drosophila_melanogaster	---	IVHG	EV-CEISPFV	TYAGENLASH	VEGKSFTSPV
Drosophila_erecta	---	IVHG	EV-CEISPFV	TYAGENLASH	VEGKSFTSPV
Drosophila_pseudoobscura_pseudoobscura	---	IVHG	DI-CEISPFV	TYAGENLVSQ	VEGKSFTSPV
Drosophila_willistoni	---	FVHG	EV-CEISPFI	TYAGENLASQ	VEGKSFTSPV
Drosophila_yakuba	---	IVHG	EV-CEISPFV	TYAGENLASH	VEGKSFTSPV
Drosophila_persimilis	---	IVHG	DI-CEISPFV	TYAGENLVSQ	VEGKSFTSPV
Drosophila_mojavensis	---	IVHG	DI-CEISPFV	SYAGENLEEL	VAGKSFSSPV
Drosophila_ananassae	---	IVHG	DV-CEISPFV	TYAGENLASQ	VEGKSFSSPV
Musca_domestica	---	IVHG	EE-CEISPFV	SYAGENLABL	VEGKSFTTPL
Corethrella_appendiculata	---	TEG	DE-CEISPLL	SYAGEGLKPI	VNDQHFICPV
Glossina_morsitans_morsitans	---	VVHG	DQ-CEISPYV	SYAGENLSTL	VKGSFTTPL
Solenopsis_invicta	---	DV	EDNVEISPLL	SYAGENLCQI	ASNQSFVGPQ
Camponotus_floridanus	---	EV	DDNVEISPLL	SYAGENLYEI	ANNQSFAGPQ
Harpegnathos_saltator	---	NV	GNDVEISPLL	SYAGENLNOI	ANKQSFVGPQ
Atta_cephalotes	---	QV	GDDVEISPLL	SYAGENLCQI	VNGQSFVGPQ
Acromyrmex_echinatior	---	QV	GDNVEISPLL	SYAGENLCQI	VNGQSFVGPQ
Nasonia_vitripennis	---	SV	EGDVEVCLV	SYNGENLSDL	VNNKSLRGPQ

Mus_musculus	I I D E N G V H E L	V K N G I
Homo_sapiens	I I D E N G V H E L	V K N G I
Triatoma_infestans	H I F K P T E N L P	- - - - -
Rhodnius_prolixus	H I F K P N E H L P	- - - - -
Locusta_migratoria	T L L H P S E Q S	- - - - -
Locusta_migratoria	H L H S P D E S N S	G S V T -
Acyrtosiphon_pisum	E L K S A E E I S K	N N S - -
Tribolium_castaneum	I L A P D E E L T C	- - - - -
Tribolium_castaneum	V L L G E E E I S I	N - - - -
Anoplophora_glabipennis	V I S A E E E V V P	- - - - -
Dendroctonus_ponderosae	S L L S E E E T L N	C - - - -
Dendroctonus_ponderosae	L L S E K E E T K L	K V - - -
Spodoptera_exigua	Y H L K S M Q E S A	A N - - -
Bombyx_mori	F H L K S P Q E L S	S N G V N
Aedes_aegypti	H L M A D E E K K S	E V V E -
Anopheles_darlingi	H L M A D D E E Q R	N K - - -
Anopheles_gambiae	H L T G A D E R E Q	H - - - -
Culex_quinquefasciatus	Y L T A D G E S K	- - - - -
Ceratitis_capitata	Y L R S N R D P Y	- - - - -
Bactrocera_dorsalis	Y L R S N R D P Y	- - - - -
Drosophila_sechellia	Y L R D S R D P L	- - - - -
Drosophila_virilis	Y L R E S M Q G	- - - - -
Drosophila_grimshawii	H L C D P M Q	- - - - -
Drosophila_melanogaster	Y L R D S R D P L	- - - - -
Drosophila_erecta	Y L R D N R D P L	- - - - -
Drosophila_pseudoobscura_pseudoobscura	Y L R D T R D P	- - - - -
Drosophila_willistoni	Y L R D T R D P	- - - - -
Drosophila_yakuba	Y L R D S R D P L	- - - - -
Drosophila_persimilis	Y L R D T R D P	- - - - -
Drosophila_mojavensis	Y L S E S P M	- - - - -
Drosophila_ananassae	Y I R D T R D P	- - - - -
Musca_domestica	Y L R S N R D T A A	H - - - -
Corethrella_appendiculata	Y L C A E N E S Y Q	N - - - -
Glossina_morsitans_morsitans	H L S Y P L A	- - - - -
Solenopsis_invicta	V L E	- - - - -
Camponotus_floridanus	V L E	- - - - -
Harpegnathos_saltator	I L E	- - - - -
Atta_cephalotes	V L E	- - - - -
Acromyrmex_echinatior	V L E	- - - - -
Nasonia_vitripennis	C L M S S D	- - - - -