

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

**Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e
Farmacologia**

Arthur Estanislau Dantas

**Descrição da família de proteínas Loxtox e a
identificação de um novo grupo de fosfolipases
D na glândula de peçonha da aranha *Loxosceles
similis***

Tese de doutorado

Belo Horizonte

Dezembro de 2016

Arthur Estanislau Dantas

**Descrição da família de proteínas Loxtox e a
identificação de um novo grupo de fosfolipases
D na glândula de peçonha da aranha *Loxosceles
similis*.**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Fisiologia.

Orientador: Evanguedes Kalapothakis

Co-orientadora: Carolina Campolina R. Horta

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Fisiologia e Biofísica

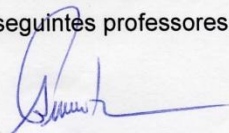
Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Belo Horizonte, 2016

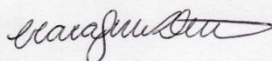
"DESCRIÇÃO DA FAMÍLIA DE PROTEÍNAS LOXTOX E A IDENTIFICAÇÃO DE UM NOVO GRUPO DE FOSFOLIPASES D NA GLÂNDULA DE PEÇONHA DA ARANHA LOXOSCELES SIMILIS"

ARTHUR ESTANISLAU DANTAS

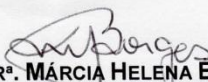
Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **07 de dezembro de 2016**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



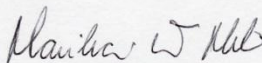
PROF. DR. ADRIANO MONTEIRO DE CASTRO PIMENTA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



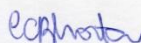
DR.ª CLARA GUERRA DUARTE
FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS



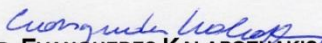
PROFA. DR.ª MÁRCIA HELENA BORGES
FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS



PROF.ª DR.ª MARILIA MARTINS MELO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF.ª DR.ª CAROLINA CAMPOLINA REBELLO HORTA
CENTRO UNIVERSITÁRIO DE SETE LAGOAS
CO-ORIENTADORA



PROF. DR. EVANGUEDES KALAPOTHAKIS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG
Belo Horizonte, 07 de dezembro de 2016

Agradecimentos

Conclusão da tese, fim do doutorado e também o fim de mais uma etapa na minha vida acadêmica. Acredito que devo iniciar os agradecimentos com quem abriu as portas do mundo acadêmico e tornou tudo isso possível para mim há quase 10 anos.

Dessa forma, agradeço ao meu orientador Evanguedes Kalapothakis, primeiramente por ter aberto as portas de seu laboratório para um calouro, apenas no primeiro mês de graduação em busca de um estágio querendo conhecer o mundo acadêmico. Obrigado Evanguedes pela orientação, ensinamentos, paciência, compreensão, apoio e acima de tudo pelo incentivo a seus alunos de sempre buscarem o melhor para suas carreiras.

Obrigado à Carol Horta pela co-orientação e apoio ao longo desses anos, pela ajuda em todas as etapas do doutorado, desde antes da seleção até as etapas finais de correção da tese.

Agradeço também aos colegas de laboratório, pelas ajudas em todas os momentos e pela excelente convivência ao longo deste período. Dentre os colegas, muito obrigado principalmente ao Anderson e a Ana Paula por terem pacientemente passado comigo por todas as etapas desse processo, me mostrando que bioinformática tem solução e que várias vezes a linha de comando que parecia perdida tem conserto.

Obrigado ao departamento de Fisiologia e Biofísica e ao Programa de pós-graduação Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia e a toda a sua equipe pelas aulas, conhecimento e oportunidade de realizar o doutorado.

Agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Agradeço aos meus pais que me forneceram a formação humana necessária, me ensinaram que sempre devo correr atrás do que desejo, o apoio pelos tempos difíceis e incentivo sempre incondicional de vocês foi preponderante para que eu pudesse chegar onde cheguei.

Por fim, agradeço à Bonita por tudo ao longo desses anos, seja no apoio ao longo dos tempos difíceis que passaram, seja na hora de me ajudar a transformar as ideias de figura em figuras palpáveis ou seja na hora de ver se toda a minha apresentação estava alinhada como um bom designer faria.

Sumário

Agradecimentos	II
Lista de Figuras.....	VI
Lista de tabelas	VII
Lista de abreviaturas	VIII
Resumo.....	1
Abstract.....	2
1 Introdução.....	3
1.1 Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>	3
1.2 A aranha <i>L. similis</i>	5
1.3 Loxoscelismo	6
1.3.1 Diagnóstico e tratamento do loxoscelismo.	9
1.4 Peçonhas das aranhas <i>Loxosceles</i>	11
1.4.1 Componentes principais da peçonha.....	11
1.4.2 Fosfolipases D (Proteínas Loxtox).....	15
1.5 O transcriptoma como ferramenta de estudo.	21
1.5.1 Next-generation sequencing.....	22
2 Objetivos.....	25
2.1 Objetivo geral.	25
2.2 Objetivos específicos.	25
3 Justificativa.	26
4 Material e Métodos.	27
4.1 Obtenção dos animais e extração da glândula de peçonha da aranha <i>L. similis</i>	27
4.2 Extração do RNA.....	27
4.3 Construção das bibliotecas para sequenciamento.....	28
4.4 Sequenciamento de Nova Geração (NGS) – MiSeq Illumina.....	30
4.5 Triagem das <i>reads</i>	31
4.6 Montagem dos contigs no programa Trinity	33
4.7 Montagem <i>de novo</i> no programa <i>CLC Genomics</i>	34
4.8 Identificação dos <i>contigs</i> com similaridade a Fosfolipases D.....	35
4.9 Filtragem final dos contigs.....	38
4.10 Tradução das sequências e Identificação dos domínios principais..	39

4.11	Alinhamento e construção da árvore filogenética.	40
4.12	Padrão de expressão das proteínas Loxtox.	41
5	Resultados.....	43
5.1	Extração do RNA da glândula de peçonha da aranha <i>L. similis</i>	43
5.2	Construção da biblioteca de cDNA e sequenciamento de nova geração. 44	
5.3	Triagem das sequências e montagem dos contigs.	45
5.4	Identificação dos contigs com similaridade às proteínas Loxtox.	47
5.5	Identificação dos domínios principais e agrupamento dos contigs Loxtox.	48
5.6	Agrupamento dos contigs com sequências incompletas de proteínas Loxtox.	53
5.7	Relação evolutiva das proteínas Loxtox com outras PLDs já descritas. 56	
5.8	Padrão de expressão das proteínas Loxtox.	59
5.9	Caracterização das PLDs-Ls.....	62
5.10	Perfil de expressão de outras proteínas possivelmente importante para a peçonha.	65
6	Discussão.....	68
7	Conclusões.....	85
8	Perspectivas.....	86
9	Referências.....	87
10	Anexos.....	110
10.1	Sequência de todas as proteínas caracterizadas neste trabalho:..	110
10.2	Sequências de cDNA e aminoácidos das proteínas PLD-Ls:	131
10.3	Artigo publicado referente a este trabalho	133

Lista de Figuras

Figura 1 A aranha <i>Loxosceles</i>	3
Figura 2: Loxoscelismo cutâneo.....	8
Figura 3: Sítio catalítico das PLDs em representação 3D	17
Figura 4: O mecanismo de reação das enzimas PLDs.	18
Figura 5: Fluxograma do processo de construção da biblioteca de cDNA e sequenciamento.	22
Figura 6: Exemplo de bolha na montagem pelo algoritmo de Bruijn	35
Figura 7: Fluxograma do processo do sequenciamento de nova geração (do inglês: Next Generation sequencing (NGS) e da análise de bioinformática realizados para este trabalho.	39
Figura 8: Gel da extração de RNA para a construção das bibliotecas de cDNA	43
Figura 9: Valores de qualidade Q de Phred por base ao longo das reads.	46
Figura 10: Alinhamento das Loxtox completas de <i>Loxosceles similis</i>	52
Figura 11: Alinhamento de todas as Loxtox pertencentes ao grupo Loxtox s1.	54
Figura 12: Alinhamento de todas as Loxtox pertencentes ao grupo Loxtox s6.	54
Figura 13: Alinhamento de todas as Loxtox pertencentes ao grupo Loxtox s9.	55
Figura 14: : Alinhamento de todas as Loxtox pertencentes ao grupo Loxtox s10.	55
Figura 15: Alinhamento de todas as Loxtox pertencentes ao grupo Loxtox s11.	56
Figura 16: Árvore filogenética construída pelo método de neighbor-join com as proteínas Loxtox sequenciadas.....	58
Figura 17: Classificação dos transcritos das proteínas Loxtox obtidas da glândula de peçonha da aranha <i>L. similis</i>	59
Figura 18: Alinhamento entre a PLD-Ls 2 e a sequência parcial da proteína Fosfolipase D3 de <i>Stegodyphus mimosarum</i> (GenBank database KFM65948.1).....	63
Figura 19: Alinhamento entre a PLD-Ls 1 e a sequência parcial da proteína N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzing_phospholipase D da bactéria <i>S. negevensis</i> Z (GenBank: CCB88845.1).	64

Figura 20: Alinhamento entre a PLD-Ls 3 e a sequência parcial da proteína N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzing_phospholipase D (parcial) da aranha <i>S. mimosarum</i> (GenBank: KFM77789.1).	64
Figura 21: Gráfico da porcentagem de expressão dos outros grupos de proteínas anotados.....	66

Lista de tabelas

Tabela 1: Concentração e Pureza dos RNAs extraídos de glândulas de peçonha de aranhas <i>L. similis</i> para a construção das bibliotecas de cDNA. ...	44
Tabela 2: Massa molecular predita das proteínas Loxtox de <i>L. similis</i>	53
Tabela 3: Valores de expressão para cada proteína Loxtox encontrada (%). ...	61
Tabela 4: Dados de bioinformática obtidos das proteínas PLD-Ls.....	62
Tabela 5: Perfil de expressão de outros possíveis componentes da peçonha estudados.....	67

Lista de abreviaturas

PLD	Phospholipase D (Fosfolipase D)
PLD-Ls	Phospholipase D from <i>L. similis</i> (Fosfolipase D de <i>L. similis</i>)
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
NGS	Next-Generation Sequencing (Sequenciamento de nova geração)
ESTs	Expressed sequence tags (Etiquetas de sequência expressa)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
dT	Desóxi-timidinas
Pb	Pares de base
RPKm	<i>Reads</i> por kilobase de éxon por milhão de <i>reads</i> mapeadas
Aa	Aminoácidos
UTR	Região não traduzida

Resumo

Acidentes com aranhas *Loxosceles* (loxoscelismo) são um problema de saúde público reconhecido no Brasil. Entretanto a patofisiologia do loxoscelismo causada pela picada da aranha *Loxosceles similis* ainda não é bem compreendida. Neste trabalho foi realizado o sequenciamento de RNA (RNA-Seq) da glândula de peçonha da aranha *L. similis* para identificar e analisar os componentes chaves da peçonha, as fosfolipases D. As sequências foram alinhadas baseadas nos seus domínios clássicos e uma árvore filogenética foi construída. Nas análises de bioinformática, foram encontradas 23 sequências completas de fosfolipases D e estas foram então classificadas como proteínas Loxtox, uma vez que elas continham o sítio ativo característico, o domínio de ligação ao magnésio e a alça catalítica. Três sequências de fosfolipases D que apresentaram domínios não canônicos também foram identificadas neste trabalho. Elas foram analisadas separadamente e foram nomeadas Fosfolipases D de *L. similis* (do inglês **PhosphoLipase D - L. similis** PLD-Ls) Este estudo é o primeiro a caracterizar sequências de fosfolipases D de aranhas *Loxosceles* por RNA-seq. Foram ainda analisados o perfil de expressão de outros possíveis componentes da peçonha, como proteases, outras fosfolipases e toxinas inseticidas. Os resultados contribuem para o conhecimento da composição da peçonha além de revelar novas possíveis ferramentas para uso farmacológico, imunológico e aplicações biotecnológicas.

Abstract

Spider bites from the *Loxosceles* genus (loxoscelismo) are a recognized public health problem in Brazil. However, the pathophysiology of loxoscelism caused by the *Loxosceles similis* species is not fully comprehended. In this work the RNA sequencing (RNA-seq) from the venom gland of the *L. similis* spider was performed, looking for identifying and analyzing the main components of the venom, the phospholipases D. The sequences were aligned based on their classical domains and a phylogenetic tree was constructed. During the bioinformatics analysis, 23 complete sequences of phospholipases D were found and they were classified as Loxtox proteins, since they presented the typical catalytic site, Mg²⁺-binding domain and the catalytic loop. Three phospholipases D sequences did not present the typical domains and were also identified in this work. They were analyzed separately and named Phospholipases D from *L. similis* (**PhosphoLipase D - *L. similis***: PLD-Ls). There was also an analysis on the expression profile of other putative venom components such as proteases, other phospholipases and insecticidal peptides. This study is the first to characterize sequences from phospholipases D from *Loxosceles* spiders through RNA-seq. These results contribute to a better understanding of the venom and can yet reveal novel tools for immunological and biotechnological applications.

1 Introdução

1.1 Aranhas do gênero *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família Sicariidae, ordem Araneomorpha. Até a data deste trabalho, 114 espécies do gênero *Loxosceles* foram descritas (Platnick, 2016). As aranhas desse gênero são popularmente conhecidas como aranhas marrons, devido à sua coloração variada de tons dessa cor. Podem ser chamadas também de aranhas-violino, por possuírem em seu cefalotórax uma mancha no formato desse instrumento. Elas medem, em média, de 2 a 5 cm de perna a perna e possuem três pares de olhos (Figura 1) (Futrell *et al.* 1979; Málaque *et al.* 2002; Hogan *et al.* 2004).



Figura 1 A aranha *Loxosceles*.

À esquerda, aranha *Loxosceles similis* coletada na Gruta da Lapinha, Lagoa Santa, Minas Gerais. À direita, a aranha *L. similis* na qual estão visíveis as manchas marrons que dão origem a seu nome popular (Foto: Anderson do Carmo e Arthur Dantas, arquivo pessoal).

Essas aranhas não são agressivas, possuem hábitos de vida noturnos, e são animais sedentários. Elas podem viver de 3 a 7 anos, alimentam-se de pequenos insetos e são capazes de permanecer meses em situações de

privação de alimento e água. Elas ocupam uma grande variedade de habitats, são capazes de viver debaixo de pedras, troncos, interior de cavernas, buracos de árvores e locais áridos ou moderadamente úmidos em seu hábitat natural. Como mostrado na figura 1, elas constroem em seus habitats teias irregulares e aguardam a presa. As construções humanas também são habitats favoráveis para essas aranhas, por exemplo, celeiros, garagens, viveiros e galpões apresentam condições que beneficiam o modo de vida desses animais. Em residências, elas são encontradas embaixo de móveis, atrás de quadros, frestas no chão e dentro de armários e gavetas (Gertsch 1967; Futrell 1992).

As aranhas marrons estão distribuídas tanto em regiões temperadas quanto em regiões tropicais, mas principalmente nas Américas e na África. No Brasil, já foram catalogadas 11 espécies, dentre elas: *L. gaucho* (Gertsch 1967), *L. laeta* (Nicolet, 1849) e *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934) são as principais causadoras de acidentes, mas há também *L. adelaida* (Gertsch, 1967), *L. amazonica* (Gertsch, 1967), *L. anomala* (Mello-Leitão, 1917), *L. niedeguidonae* (Gonçalves-de-Andrade *et al.*, 2012), e *L. similis* (Moenkhaus, 1898) (Platnick, 2016).

Em Minas Gerais, há registros de *L. similis*, *L. laeta*, e *L. anomala* (Gertsch 1967; Alvares *et al.* 2004; Machado *et al.* 2005; Horta *et al.* 2014). Machado *et al.* (2005) relataram a presença dessas três espécies em Belo Horizonte, sendo este o primeiro registro de *L. similis* em residências em área urbana. Até então, essa espécie era encontrada somente no interior de Minas Gerais e em grutas nas redondezas de Belo Horizonte (Ferreira *et al.*, 2005) como, por exemplo, na Gruta da Lapinha (Lagoa Santa, MG). Além disso,

Andrade *et al.* (2001) capturaram espécimes de *L. similis* em grutas do Estado do Mato Grosso do Sul.

Como a aranha *L. similis* foi detectada em ambientes antrópicos e turísticos e não há estudos suficientes sobre a composição de sua peçonha, mais estudos para uma melhor compreensão da composição e do mecanismo de ação da peçonha se fazem necessários.

1.2 A aranha *L. similis*

No estado de Minas Gerais há registro de diversas espécies de aranhas *Loxosceles*, dentre elas *L. similis*, *L. laeta* e *L. anomala*, (Gertsch, 1967; Alvares *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2005). Em 2005, Machado *et al.* Mostraram a presença dessas 3 espécies em domicílios de Belo Horizonte, esta foi a primeira vez na qual a aranha *L. similis* foi encontrada em residências. Até então esta era tida como uma espécie característica de cavernas e grutas no interior de Minas Gerais, além de relatos na Serra da Bodoquena, Município de Bonito, Estado do Mato Grosso do Sul (Andrade *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2005).

Segundo Gertsch (1967) a aranha *L. similis* pertence ao grupo *gaucho*, também representado pelas espécies *L. adelaida*, *L. gaucho* e *L. variegata*. As pernas desses espécies apresentam comprimento médio para o gênero *Loxosceles*, porém a espécie *L. similis* apresenta pernas mais alongadas. Para os machos, os palpos da espécie *L. similis* também se diferem das demais.

Silvestre *et al.*, (2005) mostraram que a peçonha da aranha *L. similis* mostrou propriedades bioquímicas e biológicas similares à de outras aranhas

marrons medicamente relevantes, sendo elas *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*.

1.3 Loxoscelismo

Acidentes causados por aranhas do gênero *Loxosceles* provocam sinais clínicos e sintomas característicos e são denominados loxoscelismo. O Brasil possui três espécies principais de *Loxosceles* causadoras de acidentes, são elas: *L. intermedia* (predomina nos estados do sul do país), *L. laeta* (ocorre em focos isolados em várias regiões do país, principalmente no estado de Santa Catarina) e *L. gaucho* (predomina no estado de São Paulo).

Segundo o Ministério da Saúde (2016), em 2013, houve cerca de 23000 casos de acidentes por aranhas registrados no Brasil. Destes, 7985 foram causadas por aranhas do gênero *Loxosceles*. Na região sudeste, Minas Gerais é o segundo estado com maior incidência de acidentes por picadas de aranhas (Ministério da saúde, 2016). No Brasil, os estados com maior número de acidentes por picadas de aranhas *Loxosceles* são, respectivamente, Paraná e Santa Catarina (Marques-da-silva & Fisher, 2005), eles representam 79% do total de acidentes com *Loxosceles* do país. O loxoscelismo é predominante na região metropolitana de Curitiba, com cerca de 1300 a 3000 casos por ano (Ministério da saúde, 2016).

Devido à natureza indolor da picada, ao aparecimento tardio dos sintomas (apenas horas depois) e ao fato de a aranha ser capturada em aproximadamente 10% dos acidentes no momento da picada, o diagnóstico do loxoscelismo é presumível e baseado em fatores clínicos e epidemiológicos apresentados pelo paciente (Gremski *et al.*, 2014). A picada é geralmente confundida com infecções cutâneas bacterianas ou virais, dermatites,

vasculites ou úlcera diabética (Isbister and Vetter, 2005). Desta forma, o número de acidentes notificados envolvendo aranhas marrons pode estar subestimado, já que a notificação correta dos casos pelas autoridades é complicada pelos fatores citados acima.

O primeiro sintoma é uma dor aguda de grau variado, que pode ocorrer dentro de 2 a 8 horas após a picada, podendo progredir para uma sensação de queimadura. De 12 a 24 horas depois, o local da picada fica cercado por eritema e edema, com o início do agravamento dos sintomas o paciente busca auxílio médico. Em casos que se desenvolvem de forma mais severa ou grave, as lesões progridem para necrose de 48 a 72 horas depois do acidente.

A necrose apresenta como sinais iniciais hiperestesia, formação de bolha de conteúdo hemorrágico, endureção e cianose, gerando uma úlcera vermelho-azulada, dolorosa e coberta por escara, circundada por um halo de isquemia e vasoconstricção. O aumento da área da necrose pode ocorrer por espalhamento gravitacional, dependendo do local da picada. A escara pode sair, deixando uma úlcera que pode regredir em 6 a 8 semanas, porém alguns casos necessitam de enxerto. Febre e artralgia também podem acompanhar os sintomas descritos. Esse conjunto de sintomas é conhecido como loxoscelismo cutâneo e ocorre em 80% dos casos (Futrell 1992; Andersen *et al.* 2011; Malaque *et al.* 2011). A figura 2 mostra diferentes graus da lesão cutânea em casos de loxoscelismo cutâneo.



Figura 2: Loxoscelismo cutâneo

A: paciente picada na coxa. A lesão (2 dias após a picada) é caracterizada por edema e eritema, palidez, áreas hemorrágicas e formação de bolhas com conteúdo hemorrágico. **B:** Paciente picada na panturrilha, dois dias após a picada. A lesão apresenta hematomas serosos que progrediram rapidamente para conteúdo hemorrágico e dor com a presença adicional de erupções cutâneas, mialgia e tontura. Vinte dias após a picada, o paciente apresentou descamação no local da ferida sem formação de úlcera. **C e D:** paciente picado na parte interna da coxa. Quatro dias após a picada (C), danos locais presentes e caracterizados por edema, eritema, palidez e áreas hemorrágicas (placa marmórea). **D:** mostra a área necrosada 20 dias após a picada. Este é um caso de suposto loxoscelismo, uma vez que a aranha não foi levada para identificação (Fonte: Gremski *et al.* 2014).

Casos mais severos são classificados como loxoscelismo sistêmico e podem variar de 0,7% a 27% dos casos, de acordo com a região geográfica e a espécie da aranha encontrada na região. Dados mostram que o loxoscelismo sistêmico é mais comum em regiões onde é encontrada a espécie *L. laeta*, como, por exemplo, Peru (27,2%), Chile (15,7%) e Santa Catarina, Brasil (13,1%) (da Silva *et al.* 2004; Hogan *et al.* 2004). O loxoscelismo sistêmico possui sintomas adicionais em relação ao cutâneo, como: hematúria, hemoglobinúria, icterícia, febre, náusea e coagulação intravascular. Hemólise também é um fator presente em casos de loxoscelismo sistêmico, quando ela ocorre de forma severa, pode levar à falência renal aguda e culminar em óbito

em cerca de 1,5% dos casos (Schenone *et al.* 1989; Sezerino *et al.* 1998; da Silva, *et al.* 2004; Hogan *et al.* 2004; Malaque *et al.* 2011).

1.3.1 Diagnóstico e tratamento do loxoscelismo

Como citado anteriormente, a picada indolor da aranha marrom dificulta o diagnóstico e o tratamento do loxoscelismo. Como a vítima não sente a picada, a identificação da aranha geralmente não ocorre. Já que este é o primeiro passo para um diagnóstico conclusivo e o início do tratamento, um atraso de 12 a 24 horas para a procura por atendimento médico por parte da vítima é comum e isso pode aumentar a lesão e complicar o tratamento.

Para o diagnóstico sem a identificação do agente causador, os sintomas clínicos são avaliados e associados a dados epidemiológicos da região do acidente e da rotina do paciente (Málaque *et al.*, 2002; Vetter, 2009). Atualmente, não há teste comercial para a detecção e diagnóstico do loxoscelismo. No entanto, diversos ensaios imunológicos já foram criados, porém nenhum desses métodos é disponibilizado comercialmente para diagnóstico, apesar de apresentarem potencial para aplicação clínica (Barrett *et al.*, 1993; Chávez-Olórtegui *et al.*, 1998; Mcglasson *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2000). Não há consenso em relação à terapia mais indicada para o loxoscelismo (Gremski *et al.*, 2014), porém estudos indicam que o soro antipeçonha apresenta capacidade de minimizar os efeitos cutâneos e sistêmicos da peçonha quando aplicado até 12 horas após a picada, além de ainda reduzir a área da lesão necrótica quando aplicado até 48 horas após o acidente (Pauli *et al.*, 2009).

Em alguns países, a terapia é baseada em analgésicos, dapsona, anti-histamínicos e corticosteroides. Outras terapias, como oxigenoterapia hiperbárica, nitroglicerina tópica, excisão cirúrgica e eletrochoque já foram usadas como tentativa de amenizar os sintomas da picada. No entanto, estes tratamentos apresentam resultados conflitantes e não são muito utilizados (da Silva, da Silveira, Appel, *et al.* 2004; Hogan *et al.* 2004; Abdulkader *et al.* 2008; Vetter & Isbister 2008; Andersen *et al.* 2011; Isbister & Fan 2011). A opção mais usada para casos moderados e graves é o uso do soro antipeçonha, principalmente em casos graves da lesão cutânea e com complicações sistêmicas (Isbister *et al.* 2003; da Silva, *et al.* 2004; Hogan *et al.* 2004). O antipeçonha é aplicado em casos de loxoscelismo cutâneo mais severos e o número de ampolas a ser utilizado varia de acordo com a severidade do caso. Em todos os casos de loxoscelismo sistêmico, o soro antipeçonha é utilizado. Para a forma sistêmica, também se indica uma hidratação vigorosa, reposição de fluidos em casos de hemólise e coagulopatia, bem como manejo da insuficiência renal aguda em casos mais severos (Málaque *et al.* 2002; da Silva, *et al.* 2004; Abdulkader *et al.* 2008; D'Á *et al.* 2009; Rebecca J Andersen *et al.* 2011; Ministério da saúde, 2001).

No Brasil, o Ministério da Saúde indica a soroterapia associada ao uso de corticoides (prednisona) em casos de loxoscelismo sistêmico e cutâneo de graus moderado e grave (Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2001). Como dito anteriormente, os soros antiloxoscélico e antiaracnídico reduzem a extensão da lesão cutânea e previnem as manifestações sistêmicas, desde que sejam administrados dentro dos prazos estabelecidos. Em visita ao Serviço de Toxicologia do Hospital João XXIII em Belo Horizonte,

foi obtida a informação de que em qualquer caso suspeito de loxoscelismo com a presença dos sintomas clássicos de acidentes com aranhas marrons, é utilizado o soro antiaracnídeo.

1.4 Peçonhas das aranhas *Loxosceles*

1.4.1 Componentes principais da peçonha

As aranhas *Loxosceles* utilizam a peçonha como auxiliar na alimentação, paralisando insetos, e também como mecanismo de defesa. A peçonha é um líquido cristalino que é produzido por dois bulbos glandulares no cefalotórax da aranha e é inoculado por um par de quelíceras (da Silveira *et al.* 2002; da Silva *et al.* 2004). A aranha injeta um total de aproximadamente 4 μ L, com variação de 65 a 100 μ g de proteína dependendo da espécie (Sams *et al.* 2001; Binford & Wells 2003; da Silva *et al.* 2004; Senff-Ribeiro *et al.* 2008). A quantidade de peçonha inoculada varia com diversos fatores, como tamanho da aranha, espécie, estado de nutrição, gênero e idade (Gremski *et al.*, 2014). A peçonha das fêmeas, por exemplo, apresenta uma maior atividade necrótica em coelhos (de Oliveira *et al.*, 1999).

As peçonhas dessas aranhas são uma complexa mistura de substâncias. As toxinas presentes na peçonha variam 2 a 98 kDa, sendo que as moléculas pertencentes a dois grupos, de 2 a 5 kDa e de 20 a 40 kDa, predominam em relação às outras (Gremski *et al.*, 2014; Veiga *et al.*, 2000). Transcriptomas das glândulas de peçonha de *L. laeta* e *L. intermedia* mostram que 30,9% e 43,5% dos transcritos, respectivamente, são toxinas (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010).

Em diversos estudos de toxicidade das peçonhas das aranhas *Loxosceles*, a letalidade da peçonha para camundongos foi comprovada. As peçonhas das aranhas *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* apresentaram, respectivamente, valores de DL₅₀ de 0,48; 0,74 e 1,45 mg/kg (Mota and Barbaro, 1995). Para a aranha *L. adalaida*, Pretel *et al.* (2005) mostraram uma DL₅₀ de 0,696 mg/kg. Por último, Silvestre *et al.* (2005) mostraram que, para a aranha *L. similis*, a DL₅₀ para camundongos é de 0,32 mg/kg. Porém dados mais recentes do nosso laboratório mostram um valor superior para a DL de *L. similis*.

Considerando que a aranha tem como principal uso da sua peçonha a captura e paralisação de presas, que são em sua maioria insetos, era previsto que grande parte das toxinas expressas na glândula de peçonha fosse de peptídeos com atividade inseticida. Em 2010, Zobel-Thropp *et al.* verificaram que a esfingomielinase D de *L. intermedia* é capaz de paralisar a pata traseira de grilos causando sua total extensão, favorecendo a captura da presa. De Castro *et al.* (2004) isolaram três toxinas da peçonha da peçonha de *L. intermedia* LiTx1 (7,4 kDa), LiTx2 (7,9 kDa) e LiTx3 (5,6 kDa). Essas proteínas foram isoladas utilizando uma combinação de técnicas de cromatografia, e os testes de atividade realizados na larva *Spodoptera fugiperda* mostraram que as toxinas possuem atividade tóxica. Estudos de bioinformática propuseram que LiTx3 pode ter ação em canais NaV, enquanto análises de LiTx2 e LiTx1 não conseguiram dar suporte estatístico suficiente para ter sua possível atividade deduzida por semelhança com outras proteínas, como foi feito com LiTx3 (De Castro *et al.*, 2004). Em 2006, outra toxina, até hoje não caracterizada, foi denominada LiTx4 (*GenBank* número DQ388598.1). Essa toxina possui alta

similaridade com LiTx2, logo elas podem ter funções e estrutura semelhantes (Gremski *et al.*, 2010).

Além das toxinas, a peçonha das aranhas marrons é composta por diversas outras enzimas. Muitas das enzimas detectadas apresentam papel importante no quadro de envenenamento e nos sintomas gerados pela peçonha da aranha (da Silveira *et al.* 2007; Senff-Ribeiro *et al.* 2008; Trevisan-Silva *et al.* 2010; Ferrer *et al.* 2013).

A peçonha tem como principal enzima responsável pelos sintomas e sinais de envenenamento a família das fosfolipases D, que são o principal alvo deste trabalho e serão discutidas detalhadamente mais adiante. Outro grupo de proteínas bastante expresso na peçonha é o grupo das metaloproteases (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010). Elas são endopeptidases que podem clivar grande parte das moléculas da matriz extracelular, como laminina, colágeno e fibronectina, remodelando as estruturas dessas moléculas. Essas proteases também podem atuar em moléculas plasmáticas como fibrinogênio (Kleiner and Stetler-Stevenson, 1993).

No caso da peçonha das aranhas marrons, acredita-se que essas proteínas estejam envolvidas na digestão inicial da presa. Em mamíferos, acredita-se que elas estejam envolvidas nos mecanismos de hemorragia do loxoscelismo sistêmico e no auxílio do espalhamento das outras toxinas da peçonha devido à degradação da matriz extracelular (da Silveira *et al.* 2007; Trevisan-Silva *et al.* 2010).

Outro grupo de toxinas bastante relevante para a atividade da peçonha é o grupo das hialuronidases. Essas proteínas são capazes de degradar principalmente ácido hialurônico, mas em menor escala também condroitina e dermatan sulfato. O ácido hialurônico é um componente extremamente abundante e importante na matriz extracelular de vertebrados, preenchendo espaços entre as células e agindo como um lubrificante e barreira protetora contra a invasão de partículas externas (Marković-Housley *et al.*, 2000; Singleton, 2014). Essa família de enzimas já foi descrita como integrante importante do processo de envenenamento em outros animais, como por exemplo no escorpião *Tityus serrulatus* (Horta *et al.*, 2014). No caso do escorpião e de outros animais que também possuem essa enzima na composição da peçonha, ela é considerada como um fator que ajuda no espalhamento da peçonha após a picada. No trabalho de Horta *et al.* (2014) foi mostrado, por exemplo, que a neutralização dessa enzima atrasa o tempo de morte em camundongos, provavelmente por atrasar o espalhamento da peçonha.

Para a peçonha das aranhas *Loxosceles*, a hialuronidase aparenta ter o mesmo efeito mostrado para a peçonha de *T. serrulatus*. Ferrer *et al.* (2013) mostraram que a adição da hialuronidase recombinante aumenta o efeito dermonecrótico da fosfolipase recombinante *in vivo* (LiRecDT1) após injeção em pele de coelhos, comprovando que essa enzima é um fator de propagação e espalhamento importante para os efeitos da peçonha (Ribeiro *et al.*, 2015).

As serino-proteases também são importantes enzimas expressas pela glândula de peçonha das aranhas *Loxosceles*. Elas foram primeiramente identificadas para a espécie *L. intermedia* por Veiga *et al.* (2000) e foram as

primeiras enzimas detectadas para peçonhas de qualquer aranha a apresentar um comportamento de zimogênio. Ou seja, a degradação de um pró-peptídeo na sequência dessas proteínas, que nesse estudo ocorreu pela protease tripsina (Veiga *et al.*, 2000), levava à sua ativação. Mais tarde, essas enzimas também foram detectadas para as aranhas *L. gaucho* e *L. laeta* (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2005).

Ainda não se sabe qual a função das serino-proteases de *Loxosceles* na ação da peçonha. Nos estudos de transcriptomas das glândulas de peçonha de *L. intermedia* e de *L. laeta*, sequências similares a inibidores de serino/cisteonoproteases foram encontradas (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010). Esses inibidores têm como provável função proteger as próprias toxinas contra as proteases da peçonha (Župunski *et al.*, 2003).

1.4.2 Fosfolipases D (Proteínas Loxtox)

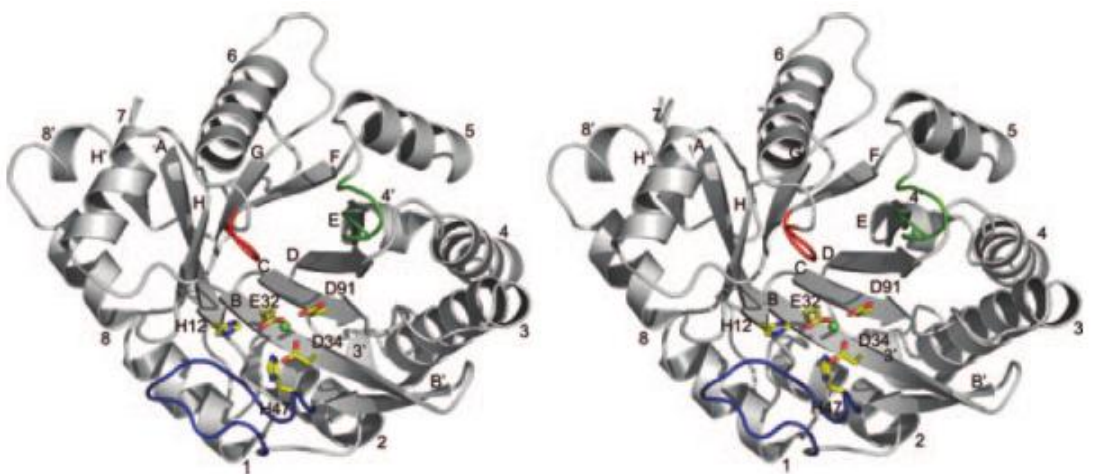
As enzimas fosfolipases D são as principais causadoras da dermonecrose *in vivo* e têm um papel essencial no quadro clínico e na manifestação dos sintomas em casos de loxoscelismo tanto cutâneo quanto sistêmico (da Silva *et al.* 2004; Swanson e Vetter 2006). Essas proteínas têm uma massa molecular que varia de 32 a 35 kDa e possuem peptídeo sinal. Os aminoácidos destas proteínas apresentam de 55% a 99% de conservação, com a região mais conservada sendo ao redor do sítio catalítico (Gremski *et al.*, 2014).

Em estudos de transcriptoma com a aranha *L. intermedia*, Gremski *et al.* (2010) constataram que as PLDs representaram 9% de todas as *Expressed sequence tags* (ESTs) e 20,2% de todas as toxinas encontradas nos

sequenciamentos. Para a aranha *L. laeta*, as PLDs representaram 16,3% de todas as ESTs encontradas no transcriptoma (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008).

Como dito anteriormente, as proteínas da família PLD possuem cerca de 280 aminoácidos e apresentam grande grau de homologia entre as isoformas (de Santi Ferrara *et al.*, 2009; Kalapothakis *et al.*, 2007; Silvestre *et al.*, 2005). Segundo Murakami *et al.* (2005), as PLDs se dobram em 8 barris alfa-beta, o sítio catalítico está envolto em *loops* hidrofóbicos e superfícies negativamente carregadas. Murakami *et al.* (2005) mostraram ainda que as PLDs, em seu estado de transição após a ligação do substrato, são estabilizadas por um íon Mg^{2+} . A lise do substrato ocorre através de duas histidinas localizadas no sítio ativo (His^{12} e His^{47}), por meio de um processo de catálise ácido-base. Tanto as PLDs bacterianas quanto as PLDs das aranhas *Sicariidae* devem possuir mecanismos de atividade semelhantes. Na figura 3, estão mostrados os esquemas para a estrutura 3D da PLD descrita por Murakami *et al.* (2005) (figura 3A), além do sítio de ligação ao magnésio e os aminoácidos que o estabilizam (figura 3B).

A



B

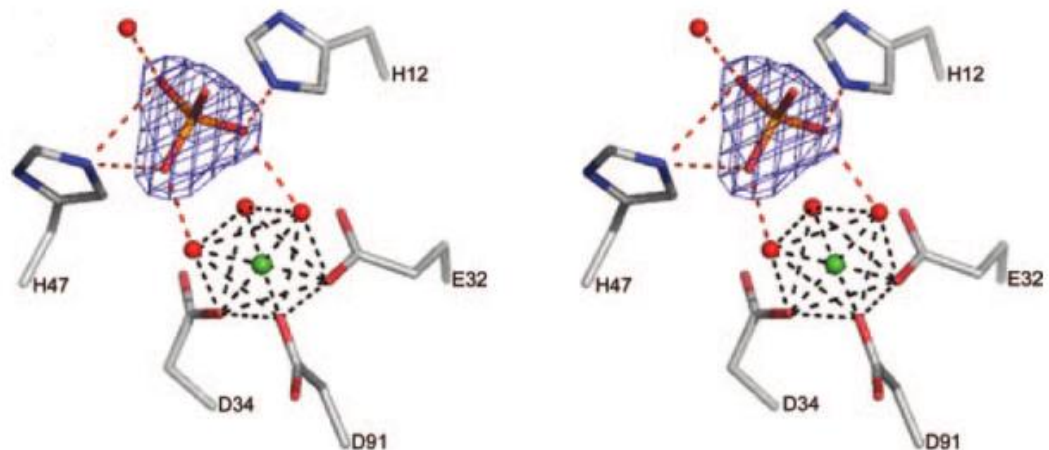


Figura 3: Sítio catalítico das PLDs em representação 3D

A) Representação 3D da estrutura da PLD 1 de *L. laeta* vista ao longo do eixo dos 8 barris α/β . O N e o C terminais estão marcados e os aminoácidos com função importante His¹², Glu³², Asp³⁴, His⁴⁷, Asp⁹¹, além do Mg²⁺ (esfera verde) estão incluídos. A alça catalítica (em azul), o loop variável (em amarelo) e o loop flexível (em vermelho) estão indicados. **B) Visão espacial dos aminoácidos e das pontes de hidrogênio no sítio catalítico e no sítio de ligação ao Mg²⁺.** O mapa de densidade eletrônica está marcado em azul (Fonte: Murakami *et al.* 2005).

Baseado na estrutura obtida por cristalografia de raio-X da PLD, um mecanismo de catálise, no qual as H¹² e H⁴⁷ têm um papel fundamental, foi proposto. No primeiro passo, a H⁴⁷ age como um nucleófilo que ataca a ligação covalente fosfodiesterase, levando à formação de um intermediário penta coordenado que é desestabilizado pela doação de um hidrogênio da H¹², culminando na formação de uma molécula de colina. Em seguida, a H¹² retira um próton do solvente onde ocorre a reação e ataca o intermediário covalente ligado à histidina, levando à formação de ceramida 1-fosfato e o retorno da enzima a seu estado inicial. O Mg²⁺ tem papel importante no reconhecimento do substrato e na estabilização da enzima no estado intermediário entre os dois passos da catálise (Gremski *et al.*, 2014) (Figura 4).

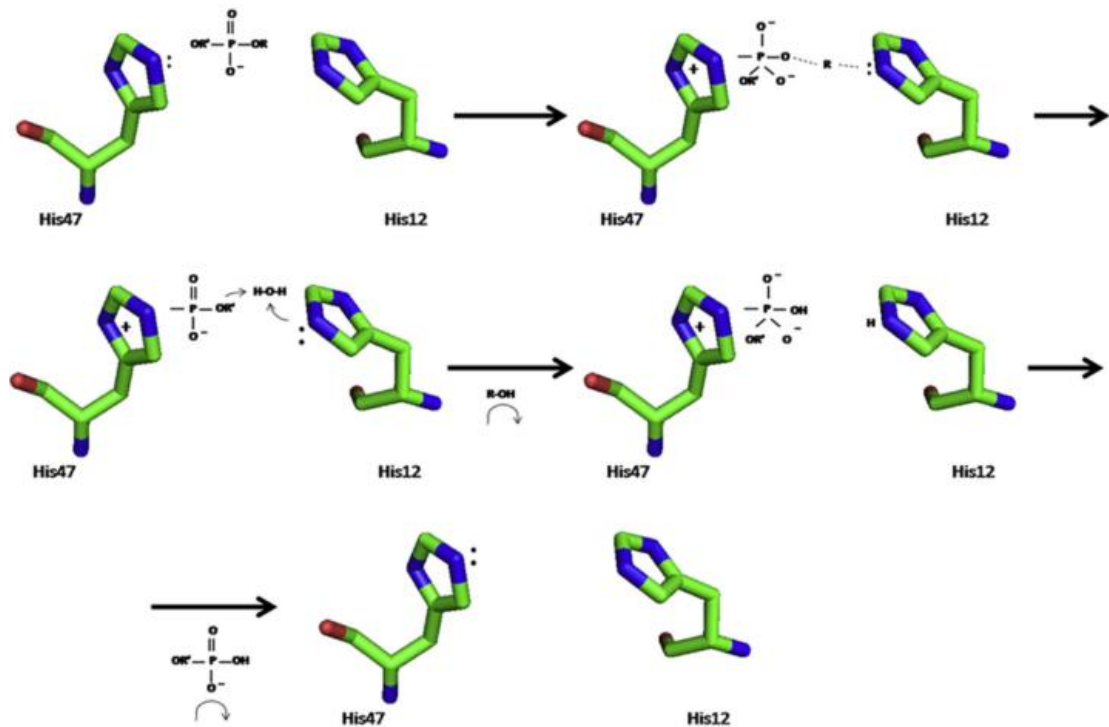


Figura 4: O mecanismo de reação das enzimas PLDs.

As H¹² e H⁴⁷ fazem parte da catálise ácido-base. R e R' indicam, respectivamente, ceramida 1-fosfato e colina (Fonte: Gremski *et al.* 2014).

Como mostrado anteriormente, a maioria das ações de peçonhas de aranhas *Loxosceles* são atribuídas a proteínas que inicialmente foram descobertas com atividade enzimática de esfingomielinase D (SMaseD) (Kurpiewski *et al.*, 1981). No trabalho de Kurpiewski *et al.* (1981), essas proteínas foram indicadas como as causadoras dos principais efeitos da peçonha. A esfingomielinase D foi identificada por Kurpiewski *et al.* (1981) como uma toxina que era capaz de causar a dermonecrose típica gerada pelas aranhas marrons, quando injetada em animais na dose aproximada da que seria injetada em uma picada comum das *Loxosceles*.

Além disso, a toxina purificada ainda causou agregação plaquetária e foi relacionada com liberação de serotonina à medida que a agregação ocorria. Ainda foi demonstrado que a adição de EDTA inibia os efeitos tóxicos da

proteína. Foi sugerido então, ao final do trabalho, que a necrose induzida pela peçonha das aranhas marrons poderia ser em parte devido a essa agregação plaquetária próxima ao local da picada (Kurpiewski *et al.*, 1981).

Posteriormente, foi descrito por Merchant *et al.* (1997; 1998) que a SMase D seria capaz de hidrolisar outros tipos de lipídeos, como lisofosfatidicolina. Em micélios misturados de Triton X-100, Merchant *et al.* (1998) mostraram que a esfingomielinase D degrada tanto a fosfatidilcolina quando a esfingomielina, porém o segundo lipídeo é degradado em uma ordem de grandeza mais rápido que o primeiro.

Em seguida, alguns autores mostraram que a atividade das esfingomielinases D era ainda mais ampla do que a descrita por Merchant *et al.* (1997;1998). Foi mostrado que a gama de alvos moleculares dessa enzima incluía ainda lisofosfolípides LPI (18:1-1-oleoil lisofosfatidilinositol), LPS (18:1-1-oleoil-lisofosfatidilserina), LPG (18:1-1-oleoil-lisofosfatidilglicerol), LBPA (18:1-1-oleoil-ácido lisofosfatídico), liso-fator ativador de plaqueta (C16:0) e ácido fosfatídico cíclico (Chaim *et al.*, 2011; Lee and Lynch, 2005; Van Meeteren *et al.*, 2004). Devido à grande variedade de substratos descritos para as esfingomielinases D, foi então sugerido que sua nomenclatura fosse alterada para Fosfolipases D (PLD). Mais recentemente, foi mostrado ainda que a liberação de fosfolípides cíclicos advindos da quebra da lisofosfatidilcolina pode contribuir para a patologia do loxoscelismo (Lajoie *et al.*, 2013).

As toxinas PLDs foram identificadas em diversos gêneros *Loxosceles* como: *L. laeta* (Fernandes Pedrosa *et al.*, 2002), *L. gaucho* (Barbaro *et al.*, 1992; Cunha *et al.*, 2003); *L. intermedia* (Barbaro *et al.*, 1996; Kalapothakis *et*

al., 2007; Tambourgi *et al.*, 1998); *L. similis* (Chatzaki *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2011; Silvestre *et al.*, 2005); além de outros gêneros como *Sicarius* (Binford and Wells, 2003). Com o passar do tempo, a caracterização das PLDs foi mais aprofundada, e foi constatado então que algumas delas não apresentavam atividade necrótica detectável. Dessa forma, Kalapothakis *et al.* (2007) propuseram um nome mais amplo para esse conjunto de genes homólogos e essa família de genes que codificam as enzimas PLD foi então chamada de Loxtox. Em estudos com as PLDs e as peçonhas de aranhas da família *Sicariidae*, Binford *et al.* (2009) chegaram à conclusão que o nome *SicTox* também seria apropriado para essa família de genes.

Embora algumas as proteínas Loxtox tenham sido descritas para a aranha *L. intermedia* e outras espécies, elas ainda não foram caracterizadas para a aranha *L. similis*. Além disso, até a publicação deste trabalho, não há nenhum estudo utilizando a técnica de *Next-generation sequencing* (NGS) para aranhas marrons. Como só houve estudos gerais e preliminares para a peçonha da aranha *L. similis* (Dantas *et al.*, 2014; Kalapothakis *et al.*, 2007; Silvestre *et al.*, 2005), a caracterização molecular completa das proteínas Loxtox desta aranha é de extrema importância. Uma vez que esta espécie tem se mostrado sinantrópica, a possibilidade de aumento no número de casos de envenenamento é real. Ainda, o uso da técnica de NGS para o estudo do transcriptoma da glândula de peçonha abre novas possibilidades para a descoberta de proteínas pouco expressas e que dificilmente seriam detectadas utilizando a técnica de ESTs.

1.5 O transcriptoma como ferramenta de estudo

O transcriptoma é o conjunto de todos os transcritos de uma célula e sua quantificação para um estado específico de desenvolvimento e condição fisiológica (Wang *et al.*, 2009). As principais metas que podem ser alcançadas nos estudos de transcriptoma são: catalogar todos os tipos de transcritos, incluindo mRNAs, RNAs não codificantes e pequenos RNAs, para a partir disso determinar a estrutura transcricional de cada gene, em termos de local de início, pontas 5' e 3', padrões de *splicing* e outras modificações pós transcricionais. Por último, quantificar mudanças nos níveis de expressão de cada transcrito em diferentes condições e estágios do desenvolvimento (Wang *et al.*, 2009).

Para este trabalho, realizamos o estudo das proteínas Loxtox utilizando a tecnologia NGS, que nos permite a detecção de transcritos pouco expressos que dificilmente seriam detectados com a técnica de sequenciamento capilar de Sanger. A técnica de NGS apropriada para a realização de um estudo transcriptômico é o sequenciamento de RNA (RNA-seq). Então utilizamos o RNA-seq para a descrição e anotação das proteínas de interesse no transcriptoma da glândula de peçonha da aranha *L. similis*.

De forma resumida, no sequenciamento de RNA, uma população de RNA (total ou fracionada, por exemplo, por cauda poli-A) é convertida em uma biblioteca de fragmentos de cDNA com adaptadores ligados a uma ou ambas as pontas. Cada fragmento de cDNA pode ou não ser amplificado e será então sequenciado em alto rendimento para a obtenção de pequenas sequências em

uma ponta (sequenciamento *single-end*) ou em ambas as pontas (sequenciamento *paired-end*). As *reads* obtidas variam geralmente entre 30 a 400 pb dependendo da tecnologia de sequenciamento utilizada (Morin *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009) (Figura 5).

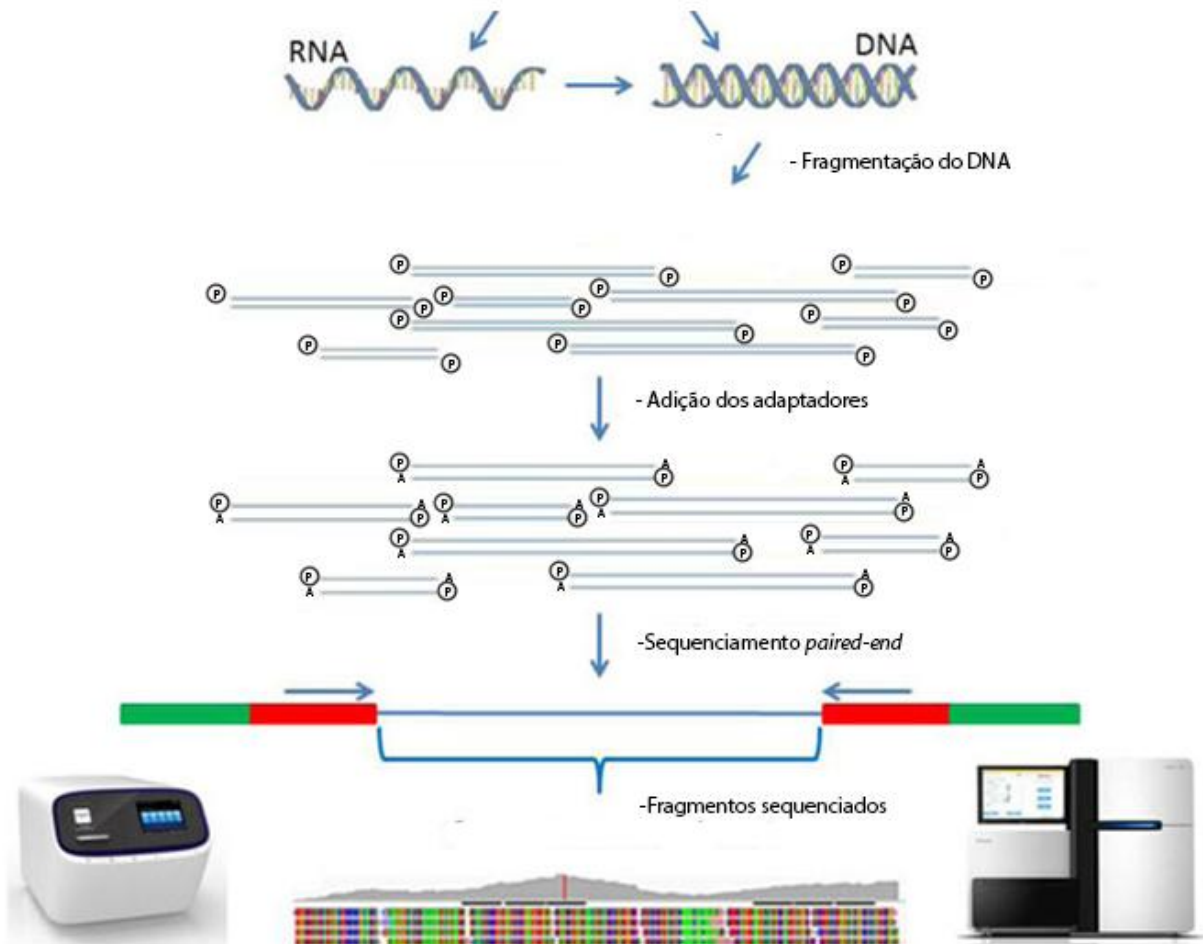


Figura 5: Fluxograma do processo de construção da biblioteca de cDNA e sequenciamento.

O RNA extraído e purificado é convertido em uma biblioteca de cDNAs. Em seguida, as moléculas de cDNA são fragmentadas e adaptadores são adicionados nas duas extremidades. Após isso, pode ocorrer um passo de PCR para a amplificação dos cDNAs e eles são então finalmente levados ao sequenciador MiSeq para que ocorra o processo de sequenciamento *paired-end*. Os dados gerados nesse processo de alto rendimento são então levados para a análise de bioinformática na qual os resultados serão obtidos.

1.5.1 Next-generation sequencing

Os estudos das glândulas de peçonha utilizando sequenciamento de nova Geração (do inglês *Next-generation sequencing* - NGS) aceleram o descobrimento de proteínas e peptídeos (Rodríguez de la Vega *et al.* 2010). Embora a descoberta de novos genes seja possível através de sequenciamento pelo método Sanger (Alvarenga *et al.*, 2012; Schwartz *et al.*, 2007), transcritos de menor abundância são mais difíceis de serem identificados em estudos de transcriptoma realizados por sequenciamento capilar (Quintero-Hernández *et al.*, 2011).

O uso do RNA-seq para a anotação do transcriptoma de aranhas ainda é muito recente e pouco explorado. Quando se realiza uma busca no site PubMed.org utilizando os termos *transcriptome spider*, são obtidos 66 artigos. Porém, quando o termo *RNA-seq* é adicionado, apenas 7 resultados são encontrados, sendo 6 relativos a estudos com aranhas. Se, ao invés do termo *RNA-seq* adicionarmos o termo *NGS*, apenas 1 resultado é encontrado. Todos esses artigos têm data de publicação posterior a dezembro de 2013. Isso mostra que o uso do RNA-seq para a anotação transcriptômica de aranhas é uma área recente e promissora devido à grande quantidade de dados gerados quando comparado ao método de ESTs randômicas e também devido à possibilidade de descobertas de proteínas pouco expressas com aplicação biotecnológica.

Os novos métodos de sequenciamento de cDNA permitem não só a descoberta de novos componentes, mas também a detecção de transcritos menos abundantes e a identificação e avaliação da diversidade de genes (Quintero-Hernández *et al.*, 2011; Rendón-Anaya *et al.*, 2012) utilizando

apenas uma pequena quantidade de RNA (Liu *et al.*, 2012; Oszolak and Milos, 2011).

Mesmo com o avanço do NGS e com a relevância médica global dos acidentes por aranhas marrons, não há estudos que utilizem as novas técnicas para um melhor entendimento da peçonha. Para aranhas do gênero *Loxosceles*, existem dois estudos que utilizaram o transcriptoma como ferramenta para um melhor entendimento de composição da peçonha e do perfil de expressão da glândula (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010). Ambos os estudos utilizaram o método de biblioteca randômica de ESTs para a obtenção de sequências de cDNA. Entretanto, o método de ESTs randômicas possui limitações que dificultam a anotação de proteínas pouco expressas.

Dessa forma, apresentamos o primeiro estudo do transcriptoma de uma espécie das aranhas *Loxosceles* (*L. similis*) que utiliza técnica de nova geração e foca nas principais proteínas responsáveis pelos efeitos tóxicos da peçonha: as proteínas da família Loxtox.

2 Objetivos.

2.1 Objetivo geral

- Investigar e caracterizar as sequências de cDNA das proteínas Loxtox da aranha *L. similis*.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar uma biblioteca de cDNA para sequenciamento de RNA-seq no sequenciador MiSeq.
- Realizar a montagem dos contigs e encontrar os contigs correspondentes às proteínas Loxtox da glândula de peçonha da aranha utilizando programas de bioinformática.
- Caracterizar a sequência das proteínas Loxtox e, por meio de análises de bioinformática, encontrar possíveis alvos para estudos farmacológicos futuros.

3 Justificativa

A aranha *L. similis* foi encontrada em residências da região metropolitana de Belo Horizonte (Machado *et al.*, 2005), dessa forma acredita-se que ela seja responsável por parte dos acidentes envolvendo aranhas marrons na capital de Minas Gerais. Portanto a ausência de dados relativa à sua peçonha é preocupante devido à possível importância dessa aranha no quadro geral de loxoscelismo em na região (Silvestre *et al.*, 2005).

Assim, utilizando a tecnologia NGS podemos realizar uma ampla análise dos transcritos que compõe a expressão da glândula de peçonha da aranha *L. similis* em busca de uma melhor compreensão de suas toxinas. Esta tecnologia trouxe um enorme avanço na quantidade de dados que podemos obter através de sequenciamentos de cDNA.

Portanto, com a necessidade de mais estudos para o melhor entendimento da peçonha, utilizamos o transcriptoma por meio da tecnologia NGS para a obtenção de dados e busca de novos componentes da peçonha dessas aranhas.

4 Material e Métodos

4.1 Obtenção dos animais e extração da glândula de peçonha da aranha *L. similis*

Aranhas *L. similis* foram coletadas na gruta turística da Lapinha (Gruta da Lapinha (43°57'W, 19°33'S), localizada no Parque Estadual do Sumidouro, em Lagoa Santa (Minas Gerais, Brasil), sob a licença do Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais (IEF/MG, licença número 047.2012). Os espécimes foram identificados de acordo com o método descrito por Gertsch (1967). Foram realizadas duas coletas com aproximadamente 45 dias de intervalo, a primeira no mês de setembro e a segunda no mês de novembro.

Para obtenção da glândula de peçonha, foi realizada remoção cirúrgica conforme descrito por da Silveira *et al.* (2002). Essa remoção aconteceu no mesmo dia ou no máximo no dia seguinte à coleta dos espécimes, as aranhas não foram alimentadas nesse período. Neste processo, aranhas adultas foram anestesiadas em baixa temperatura e levadas até uma lupa no mesmo dia após coleta dos espécimes na gruta. Em seguida, compartimentos abdominais, juntamente com as pernas, foram cortados e descartados. Então, o dorso e o cefalotórax das aranhas foram removidos e o par de glândulas de peçonha retirado.

4.2 Extração do RNA

Foram retirados 35 pares de glândulas de aranhas *L. similis*. Após a remoção das glândulas, elas foram maceradas com o auxílio de triturador de tecidos e imersas em 500 µL de TRI Reagent (Sigma, EUA). A solução foi mantida em repouso por 10 minutos e, em seguida, foram acrescentados 100 µL

de clorofórmio (Synth, BRA) e a solução foi homogeneizada. Após isso, a solução foi centrifugada a 16.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante aquoso foi recolhido e transferido para um novo tubo. O RNA foi então precipitado com 300 µL de isopropanol (Synth, BRA) e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. O frasco contendo o RNA precipitado foi centrifugado por 10 minutos a 16.000 x g a 4 °C e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol (Merck, ALE) 80% por duas vezes.

O RNA foi deixado à temperatura ambiente para secagem. Em seguida, foi ressuscitado com 100 µL água ultrapura (Phoneutria, BRA) e incubado por 30 minutos a 56°C para a completa dissolução do RNA. A quantificação de RNA foi realizada com o fluorímetro Qubit 2.0 (Life Technologies, EUA) e a análise de qualidade realizada em Nanodrop (Thermo, EUA), com base nos valores das razões das absorvâncias a 260/280 nm e 260/230 nm (Glasel, 1995; Sambrook and Russell, 2001). Os valores de referência para ambas as razões estão entre 1,8 e 2,2.

4.3 Construção das bibliotecas para sequenciamento

Para o sequenciamento de nova geração, realizamos a construção de duas bibliotecas. As bibliotecas de cDNA foram construídas utilizando o kit TruSeq™ RNA Sample Prep Kit v2 Set A (Illumina, EUA), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. De forma geral, as construções foram realizadas conforme os passos descritos abaixo:

- Purificação do mRNA com beads magnéticas contendo oligo (dT).
- Fragmentação do mRNA purificado.
- Síntese do cDNA, 1ª e 2ª fita com a enzima Superscript II.

- Reparo das extremidades para a geração de extremidades cegas.
- Adenilação da ponta 3'.
- Ligação dos adaptadores contendo index (sequência código para identificação de amostras)
- Amplificação das bibliotecas com base nas sequências adaptadoras.
- Purificação da biblioteca com beads magnéticas
- Quantificação com o kit de qPCR “Library Quantification Kit - Illumina/Universal” (Kapa).

O kit de quantificação utiliza a fluorescência do marcador de DNA Sybr Green e uma curva padrão para a quantificação das bibliotecas Illumina. Para montagem das reações de quantificação no termociclador, foram seguidas as instruções do fabricante. A quantificação foi realizada com iniciadores específicos aos adaptadores inseridos nas amostras. A curva padrão contém 5 pontos conhecidos com diluição seriada de 1:10 (20 pM; 2 pM; 0,2 pM; 0,02 pM e 0,002 pM). Alíquotas de cada uma das 2 bibliotecas foram diluídas para as concentrações de 1:1.000; 1:10.000 e 1:100.000 para serem utilizadas como inferência da concentração final da biblioteca. Todas as amostras e o padrão foram aplicados em duplicata na placa de 0,1 mL.

A média dos valores encontrados nos três pontos de diluição foi utilizada para a correção do cálculo da quantificação seguindo a fórmula:

$$\text{Média do valor de concentração} \times (452/\text{média do tamanho da biblioteca}) \\ \times \text{diluição da biblioteca.}$$

Os valores de concentração de cada biblioteca são extremamente importantes para o passo de sequenciamento.

4.4 Sequenciamento de Nova Geração (NGS) – MiSeq Illumina

As bibliotecas quantificadas foram diluídas para a concentração de 4 nM. Em seguida, foi realizado um *pool* com 10 µL de cada biblioteca e o volume final homogeneizado com auxílio de um vortex. O *pool* de bibliotecas (5 µL) foi desnaturado por 5 minutos com 5 µL de NaOH 0,2 N. Após incubação para desnaturação, foi adicionado às bibliotecas desnaturadas 990 µL de solução HT1 do kit de sequenciamento. As bibliotecas desnaturadas obtidas na concentração de 20 pM foram novamente diluídas para a concentração de 15 pM com a adição de 250 µL de solução HT1 e 750 µL da biblioteca. As bibliotecas desnaturadas em *pool* na concentração de 15 pM (600 µL) foram aplicadas nos cartuchos de sequenciamentos.

As bibliotecas foram sequenciadas no sequenciador de nova geração MiSeq (Illumina), localizado no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares do ICB/UFMG, coordenado pelo Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis. Foram utilizados dois cartuchos de sequenciamento, um de 600 ciclos com a estratégia de sequenciamento *paired-end* com 2 x 300 ciclos, e outro de 300 ciclos com a estratégia de sequenciamento *paired-end* com 2 x 150 ciclos. O resultado do sequenciamento gera um arquivo fastq (arquivo de sequência e qualidade de cada base) para cada uma das duas bibliotecas. Foi programado para o sequenciador MiSeq remover as sequências adaptadoras. Cada fragmento de DNA sequenciado é chamado de *read*.

4.5 Triagem das *reads*

A triagem de sequências neste caso pode ser definida como a retirada de trechos pré-definidos, como sequências adaptadoras, ou que apresentem baixa qualidade ou tamanho reduzido. A retirada dessas *reads* diminui a probabilidade de erro durante o processo de montagem dos contigs, aumentando a precisão deste processo.

O sequenciador MiSeq gera os arquivos fastq que possuem a sequência nucleotídica e um valor de qualidade associado a cada base. O valor de qualidade é baseado no valor de Phred (Ewing *et al.*, 1998). O valor de Phred (Q) é definido como o logaritmo da probabilidade de erro de uma base, ou seja, para um valor de Q20, temos a chance de 1 base errada em 100 bases.

Para o melhor alinhamento das sequências na montagem dos contigs, os arquivos fastq gerados no sequenciamento foram triados com base no valor de Phred. Todas as bases com valor menor do que Q28 foram retiradas das *reads* a partir da extremidade 3'. Também foram removidas do processo de montagem as *reads* com tamanho inferior a 40 pb com o auxílio do programa Prinseq lite (Schmieder and Edwards, 2011).

Para o programa Prinseq Lite, foi utilizada a seguinte linha de comando:

```
prinseq-lite.pl -verbose -fastq -out_good ' -out_bad -min_len 40 -trim_qual_right 20 -trim_qual_window 100 -trim_qual_step 1 -trim_qual_type min -out_format 5
```

na qual os comandos utilizados significam:

- **yprinseq-lite.pl**: comando executável do programa.

-**verbose**: relatório do andamento do processo.

- fastq**: tipo de arquivo de entrada.
- out_good**: pasta/nome do arquivo com as sequências filtradas.
- out_bad**: pasta/nome do arquivo com as sequências que não passaram pelo filtro.
- min_len**: tamanho mínimo de 40 bases nas *reads* filtradas.
- trim_qual_right**: retirada das sequências a partir da extremidade 3'.
- trim_qual_window**: triagem por uma janela de 100 nucleotídeos.
- trim_qual_step**: um nucleotídeo analisados por vez na janela.
- trim_qual_type**: retirada das sequências com valor de Q < 20.
- out_format**: output com arquivos nos formatos fasta, qual ou fastq.

Tanto antes quanto após a triagem das sequências, foi utilizado o programa 'fastqc' para a realização de uma análise de qualidade nas sequências, permitindo verificar se a qualidade após a triagem foi satisfatória (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>).

Foi utilizada a seguinte linha de comando para esse fim:

```
fastqc -o 'pasta onde será salvo o arquivo de output' -f fastq 'pasta/nome do arquivo a ser analisado'
```

No qual os comandos a seguir significam:

fastqc: comando para a execução do programa.

-o: pasta onde será salvo o arquivo de resultado.

-f: tipo de arquivo de entrada. (espaço) pasta/nome do arquivo de entrada.

Após a análise de qualidade dos arquivos de sequências, uma tabela com os dados das *reads* foi montada.

4.6 Montagem dos contigs no programa Trinity

Após o sequenciamento das duas bibliotecas no sequenciador MiSeq (Illumina, USA), as *reads* geradas foram montadas utilizando o pacote de programas Trinity, que foi desenvolvido para a montagem *de novo* de RNA-Seq (Manfred G. Grabherr *et al*, 2011).

O pacote Trinity monta os contigs com base em três programas, *Inchworm*, *Chrysalis* e *Butterfly* e a função de cada programa está listada abaixo:

Inchworm: monta o RNA-Seq em sequências únicas de transcritos, assim gera um transcrito completo com a isoforma dominante, mas relata porções únicas de transcritos, como um splicing alternativo.

Chrysalis: forma clusters com os contigs montados pelo *Inchworm* e constrói gráficos *de Bruijn* para cada contig. Cada conjunto representa a complexidade transcricional de cada gene (ou conjuntos de genes que compartilham sequências em comum), ou seja, ele particiona a leitura inicial de *Inchworm* em gráficos distintos.

Butterfly: processa os gráficos individuais em paralelo, traçando caminhos que as *reads* ou seus pares estão dentro do gráfico. Em última análise, ele reporta cada *splicing* alternativo e isoformas para cada gene.

Foram utilizados os comandos padrão do programa. A linha de comando utilizada foi:

```
“./Trinity --seqType fq --JM 50G --left Reads_R1.fastq --right Reads_R2.fastq --CPU 6 --output output_G”.
```

Abaixo o significado de cada comando:

./Trinity: é o comando executável do programa.

--seqType: tipo de biblioteca, fa (fasta) ou fq (fastq).

--JM: Quantidade de memória RAM a ser utilizada na montagem.

--left: Reads paired-end R1.

--right: Reads paired-end R2.

--CPU: número de núcleos do processador a serem utilizados.

--output: local/nome do arquivo de saída do programa.

4.7 Montagem *de novo* no programa *CLC Genomics*

Para a realização da análise do perfil de expressão proteica da glândula de peçonha que será detalhada mais abaixo, foi necessária a realização da montagem *de novo* (montagem sem a utilização de sequências referência como base) do transcriptoma no programa *CLC Genomics* 8.5.1 (<https://www.qiagenbioinformatics.com>).

Para a montagem no programa, os parâmetros que mostraram os melhores resultados quando comparados ao programa Trinity Assembler foram:

Tamanho da palavra (K-mer): 25

Tamanho da bolha: 190

O tamanho da palavra é definido como: o tamanho dos fragmentos das sequências (subsequências) que serão alinhados pelo programa durante o processo de montagem. Ele está relacionado ao algoritmo de busca por sequências similares dentre as *reads*. Diversos outros parâmetros foram testados, com variação do tamanho de bolha de 175 a 200 e K-mers de 22 a 27.

A bolha acontece quando há diferenças entre as *reads*, seja por heteroziguidade, diferenças entre indivíduos ou erros de sequenciamento. A figura 6 ilustra um exemplo de bolha:



Figura 6: Exemplo de bolha na montagem pelo algoritmo de Bruijn

Exemplo de bolha que pode ter ocorrido por erro de sequenciamento ou por heteroziguidade durante a montagem *de novo* (CLC Genomics Manual).

Durante a montagem, bolhas com várias diferenças ao longo das sequências são comuns. Dessa forma, em situações nas quais a bolha tenha um comprimento menor do que o determinado pelo usuário do programa (parâmetro tamanho da bolha), o contig final conterá a sequência que apresentar suporte de uma maior quantidade de *reads* e apenas um contig será formado pelo programa. Caso a bolha tenha um comprimento maior do que o determinado, o programa irá separar as sequências dúbias e formar dois ou mais contigs diferentes.

4.8 Identificação dos *contigs* com similaridade a Fosfolipases D

A identificação dos *contigs* similares a Fosfolipases D foi realizada com o auxílio do programa Blastx stand-alone. Foram utilizados os dados da montagem realizada com o programa CLC referente ao RNA-Seq sequenciado no MiSeq. O banco de dados de proteínas utilizado para a realização do Blastx foi obtido pelo site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), com base em sequências de proteínas. Foram utilizados os termos “((((Phospholipase D[Title]) OR Sphingomyelinase D[Title]) OR Dermonecrotic protein) NOT

inibitor)” para a montagem do banco de dados de sequências proteicas em formato FASTA. O banco de dados montado possui 22576 sequências.

Para a utilização do programa Blastx stand-alone, o banco de dados obtido foi formatado utilizando o programa Fasta-formatter com a seguinte linha de comando:

```
makeblastdb -in /caminho do arquivo.fasta -dbtype prot -input_type fasta -out caminho  
do local de salvar/nome do arquivo final
```

Na qual os termos utilizados significam:

Makeblastdb: comando executável do programa

-in: arquivo de entrada a ser utilizado (neste caso o arquivo do banco de dados)

-dbtype: tipo de banco de dados a ser formatado

Fasta: extensão do arquivo na qual o banco de dados se encontra

-out: local/nome do arquivo de saída do programa.

A linha de comando utilizada para o programa Blastx stand-alone foi:

```
blastx -query ./contigs_Q28_trinity.fasta -db ./PLD_database -out ./Blastx_PLD.out -  
outfmt '6 qseqid qlen stitle slen qstart qend sstart send evalue length pident ppos nident'
```

No qual os termos utilizados significam:

Blastx: comando executável do programa

-query: arquivo de entrada a ser comparado com o banco de dados

-db: arquivo do banco de dados com as sequências referência

-out: local/nome do arquivo de saída do programa.

outfmt '6': formato tabulado de saída do arquivo.

Os demais comandos são referentes a colunas colocadas na tabela de resultados pelo programa:

Qseqid: nome do contig comparado

Qlen: tamanho do contig comparado

Stitle: nome da sequência referência

Slen: tamanho da sequência referência

Qstart: onde começa o alinhamento do contig em relação à sequência referência.

Qend: onde termina o alinhamento do contig em relação à sequência referência.

Sstart: início do alinhamento do contig na sequência referência.

Send: fim do alinhamento do contig na sequência referência

Evalue: valor estatístico de significância do *match* do contig com a sequência referência

Lenght: tamanho do alinhamento

Pident: % de identidade do *match*

Ppos: porcentagem de *matches* com score positivos (% de similaridade do *match*)

Nident: número de *matches* idênticos

Utilizando essa linha de comando, o programa gera uma tabela com todos os dados, que será então analisada e filtrada. As sequências resultantes da busca por similaridade com o banco de dados foram filtradas de acordo com os seguintes parâmetros: tamanho do alinhamento (alinhamentos maiores do que 100 aminoácidos), identidade igual ou maior a 45%, e-value maior que 1^{-10} e a eliminação de contigs que alinharam com mais de 1 sequência referência. Dentre as sequências redundantes, foi mantida a que apresentou maior identidade com a sequência de referência. Um *match* pode ser resumido como a correspondência entre alguma sequência do banco de dados e a proteína de interesse.

4.9 Filtragem final dos contigs

Após a filtragem do programa Blastx realizada no passo anterior, os contigs remanescentes foram levados ao programa Blast2go para um último passo de seleção, na qual eles seriam analisados contra um banco de dados não redundante. Dessa forma, teríamos a confirmação se os contigs com alta identidade, e-value baixo e tamanho de alinhamento significativo pertenciam ao grupo das Fosfolipases D.

Portanto, após este passo, chegamos ao número final de 34 contigs positivos para Fosfolipases D, que foram levados às próximas etapas de análise. Todos os passos anteriores estão mostrados no fluxograma de trabalho mostrado na figura 7.

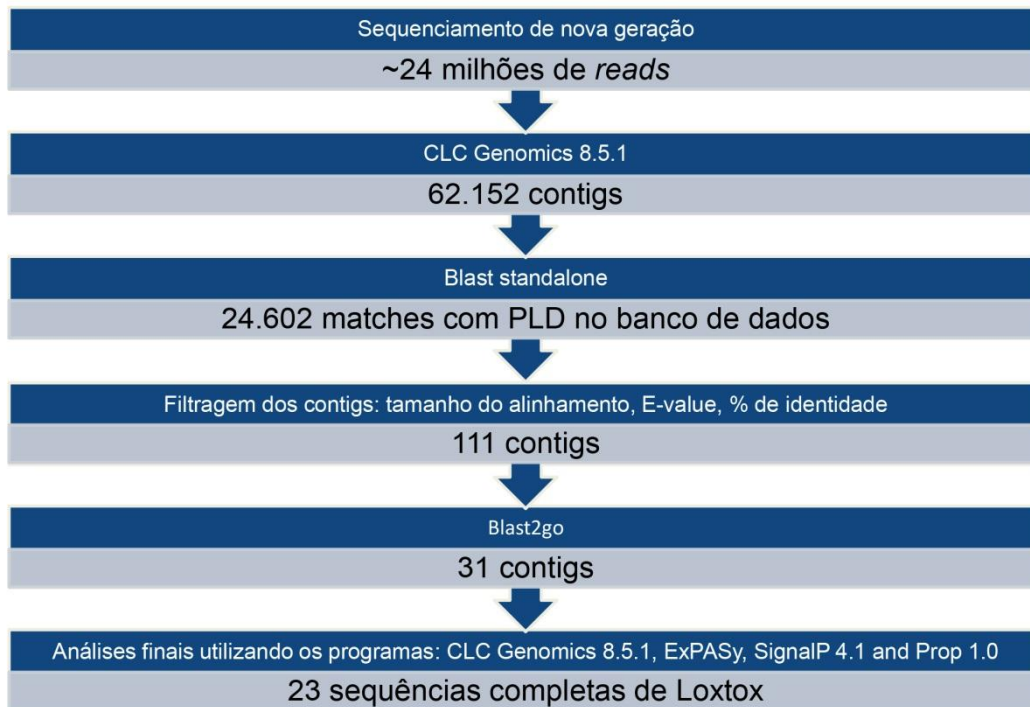


Figura 7: Fluxograma do processo do sequenciamento de nova geração (do inglês: Next Generation sequencing (NGS) e da análise de bioinformática realizados para este trabalho.

O transcriptoma da glândula de peçonha da aranha *L. similis* revelou aproximadamente 24×10^6 reads. As reads foram agrupadas em 62.152 contigs pelo programa CLC Genomics. Após a realização da análise utilizando o programa Blast standalone, 24.602 contigs tiveram semelhança significativa com PLDs. Após filtragem por tamanho do alinhamento (mínimo de 100 aa), porcentagem de identidade (mínimo de 45%) e e-value (menor que 10^{-10}), 111 contigs permaneceram no processo. Em seguida, a análise pelo programa Blast2go reduziu o número de contigs altamente semelhantes a PLDs no banco de dados não redundante a 31 contigs, sendo eles completos ou incompletos. Por último, as sequências foram agrupadas e 23 PLDs completos foram obtidas e analisadas.

4.10 Tradução das sequências e Identificação dos domínios principais

As sequências identificadas foram traduzidas utilizando o programa de tradução disponível no site <http://web.expasy.org/translate/> (SIB Bioinformatics Resource Portal) (Gasteiger *et al.*, 2005). Em seguida, elas foram analisadas para a presença de peptídeo sinal e propeptídeo com auxílio dos programas

online SignalP 4.0 (Petersen *et al.*, 2011) e Prop 1.0 (Duckert *et al.*, 2004), respectivamente.

A identificação dos domínios principais das proteínas Loxtox foi realizada no programa online Blastp. Os domínios de cada Fosfolipase D foram identificados e suas possíveis funções determinadas (de Giuseppe *et al.*, 2011; Gremski *et al.*, 2014; Kalapothakis *et al.*, 2007; Murakami *et al.*, 2005). A massa molecular e o ponto isoelétrico também foram identificados pelo programa online ExPASy “Compute pI/Mw tool” (Gasteiger *et al.*, 2005).

4.11 Alinhamento e construção da árvore filogenética

Após a obtenção das sequências maduras das proteínas Loxtox, elas foram alinhadas e separadas em grupos utilizando o programa CodonCode Aligner 5.1.5 (CodonCode Corporation, EUA). Para este passo, as sequências maduras do cDNA dos contigs positivos para Fosfolipases D foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) e agrupadas por semelhança pelo programa CodonCode Aligner.

Em seguida, o alinhamento foi levado ao programa MEGA 6 para a construção de uma árvore filogenética utilizando a ferramenta de construção através do método de *Neighbor-joining tree* (Saitou and Nei, 1987). Sequências externas baixadas do banco de dados não redundante foram utilizadas na árvore para auxiliar sua construção. Foram utilizadas sequências de PLDs de outras espécies de aranhas, além de sequências de PLD de aranhas *Loxosceles* que apresentaram alta similaridade com as Loxtox descritas neste trabalho, como por exemplo: as Loxtox descritas por Kalapothakis *et al.* (2007) para a aranha *L. intermedia* [Loxtox i1 (ABU43329.1); Loxtox i2 (ABU43330.1);

Loxtox i3 (ABU43331.1); Loxtox i4 (ABU43332.1); Loxtox i5 (ABU43333.1); Loxtox i6 (ABU43334.1); Loxtox i7 (ABU43335.1); PLDs de outras aranhas medicamente relevantes do gênero *Loxosceles* como: (Phospholipase D LgSicTox-alphaA1 (Q4VDB5.1); Phospholipase D LiSicTox-betaID1 (Q1W694.1); Phospholipase D isoform 1 (ADP00408.1), Phospholipase D LiSicTox-alphaA1a (P0CE80.1); Phospholipase D LiRecDT7 (P0DM60.1)]. Por fim, PLDs de outras aranhas não pertencentes ao gênero *Loxosceles* mas que apresentaram alta similaridade com as Loxtox descritas neste trabalho: Phospholipase D SdSicTox-betaIF1 (C0JB55.1); Phospholipase D Sphingomyelin phosphodiesterase D LrSicTox-alphaIB1 (KFM76547.1).

Entretanto, para facilitar a visualização e compreensão da imagem, as PLDs obtidas do banco de dados não redundante estão mostradas ao lado da árvore juntamente com a atividade farmacológica descrita para cada uma dessas proteínas externas.

4.12 Padrão de expressão das proteínas Loxtox

Para compreender e avaliar o perfil de expressão das proteínas Loxtox analisadas, utilizamos o software *CLC Genomics* 8.5.1 (<https://www.qiagenbioinformatics.com>). Esse programa possui a ferramenta de análise de RNA-seq (RNA-seq analysis), com a qual é calculado o valor de RPKm para cada contig encontrado no transcriptoma. O RPKm (*Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads*) é definido pela fórmula (Mortazavi *et al.*, 2008)

$$RPKM = \frac{\text{totalexonreads}}{\text{mappedreads(millions)} \times \text{exonlength(KB)}}$$

Na qual:

Total exon reads: quando o genoma de referência está anotado com anotações de genes e transcritos, então total de *reads* dos éxons são mapeados para todos os transcritos daquele gene. Porém, no nosso caso, quando o genoma referência não está anotado, cada contig é considerado um éxon.

Exon Length: Esse valor é calculado como a soma do tamanho de todos os éxons dividido por 1000. Cada éxon é incluído apenas uma vez nessa soma, mesmo que esteja presente em mais de um transcrito para o gene.

Mapped reads: O número de *reads* mapeadas para o contig.

O valor de RPKM para cada transcrito reflete a concentração molar de um transcrito na amostra. Isso é feito por normalização tanto para o comprimento do RNA quanto pelo número total de *reads* medidos. Essa medida facilita a comparação de transcritos dentro da amostra ou em amostras diferentes.

Para alcançar o valor de RPKM, o programa faz um mapeamento geral de todas *reads* em seus contigs correspondentes no transcriptoma e, em seguida, fornece o valor de expressão para cada contig. Portanto, utilizando essa ferramenta do software Genomics Workbench 8.5.1, podemos chegar a uma estimativa da concentração de cada contig na amostra total de RNA e dessa forma obter um perfil de expressão confiável para as proteínas do transcriptoma.

5 Resultados

5.1 Extração do RNA da glândula de peçonha da aranha *L. similis*

A figura 8 mostra o gel da extração de RNA para produção das bibliotecas de cDNA. Foi utilizado gel de agarose 1% para a verificação da qualidade do RNA. Mesmo este sendo um gel utilizado muitas vezes para corridas de DNA, utilizá-lo para a verificação da qualidade do RNA é um procedimento comum em nosso laboratório que se mostrou confiável ao longo do tempo.

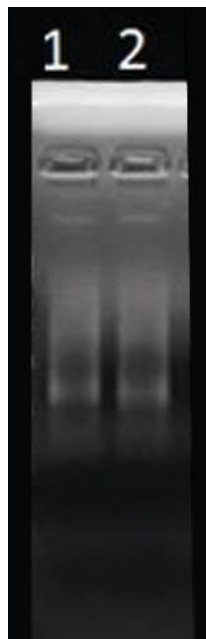


Figura 8: Gel da extração de RNA para a construção das bibliotecas de cDNA
(1) RNA extraído de aranhas *L. similis* machos. (2) RNA extraído das fêmeas de *L. similis*.

O grau de pureza e a concentração dos RNAs foram medidos no Nanodrop e no fluorímetro Qubit 2.0, respectivamente, e os resultados estão mostrados na tabela abaixo (tabela 1):

Tabela 1: Concentração e Pureza dos RNAs extraídos de glândulas de peçonha de aranhas *L. similis* para a construção das bibliotecas de cDNA.

Material de extração	Concentração de RNA ng/μL	Razão 260/280 nm	Razão 260/230 nm
<i>L. similis</i>	351	1,95	1,87

Os valores de pureza próximos de 2 indicam que as amostras estão livres de contaminantes como trizol ou proteínas. Portanto, as amostras apresentaram bom grau de pureza e quantificação satisfatória para serem utilizadas na construção das bibliotecas de cDNA. A razão 260/280 tem como função medir a quantidade de de ácidos nucleicos na amostra em relação à quantidade de proteínas, essa razão deve estar próxima de 2. A razão 260/230 mede indiretamente a presença de contaminantes na amostra, como EDTA, fenóis ou carboidratos, em relação à quantidade de ácidos nucleicos, uma vez que a alguns deles tem absorvância próxima de 230. O valor ideal para essa razão também é próximo de 2 (Glasel, 1995; Thermo, n.d.).

5.2 Construção da biblioteca de cDNA e sequenciamento de nova geração

As duas bibliotecas construídas foram executadas conforme instruções do kit “TruSeq sample prep” (Illumina) a partir de 1 μg de RNA total, que apresentou boa qualidade e concentração satisfatória para ser sequenciado no MiSeq Illumina. As bibliotecas apresentaram concentração média de 180 nM (concentração de fragmentos da biblioteca de cDNA), sendo posteriormente diluídas para 15 pM para serem utilizadas no sequenciamento, como citado no item 3.4.

Os sequenciamentos apresentaram juntos um rendimento total de aproximadamente 17 gb de dados (4 gb para o cartucho de 300 ciclos, 13 gb para o cartucho de 600 ciclos), com 23.502.783 *paired-end reads* (cada *read* é formada pela sequência R1 e R2), sendo que, em média, 98,55% delas (23.161.992 *reads*) passaram pelo filtro de qualidade do próprio sequenciador. As sequências apresentaram um tamanho de 35 a 151 pb para o cartucho de 300 ciclos e de 35 a 301 pb para o cartucho de 600 ciclos.

5.3 Triagem das sequências e montagem dos contigs

Após a triagem das *reads* de baixa qualidade, 9,8% das *reads* foram removidas do processo de montagem por apresentarem um valor de Phred menor do que Q28 ou apresentarem menos do que 40 pb sequenciados. As figuras 9A e 9B mostram a diferença na qualidade das *reads* após a triagem.

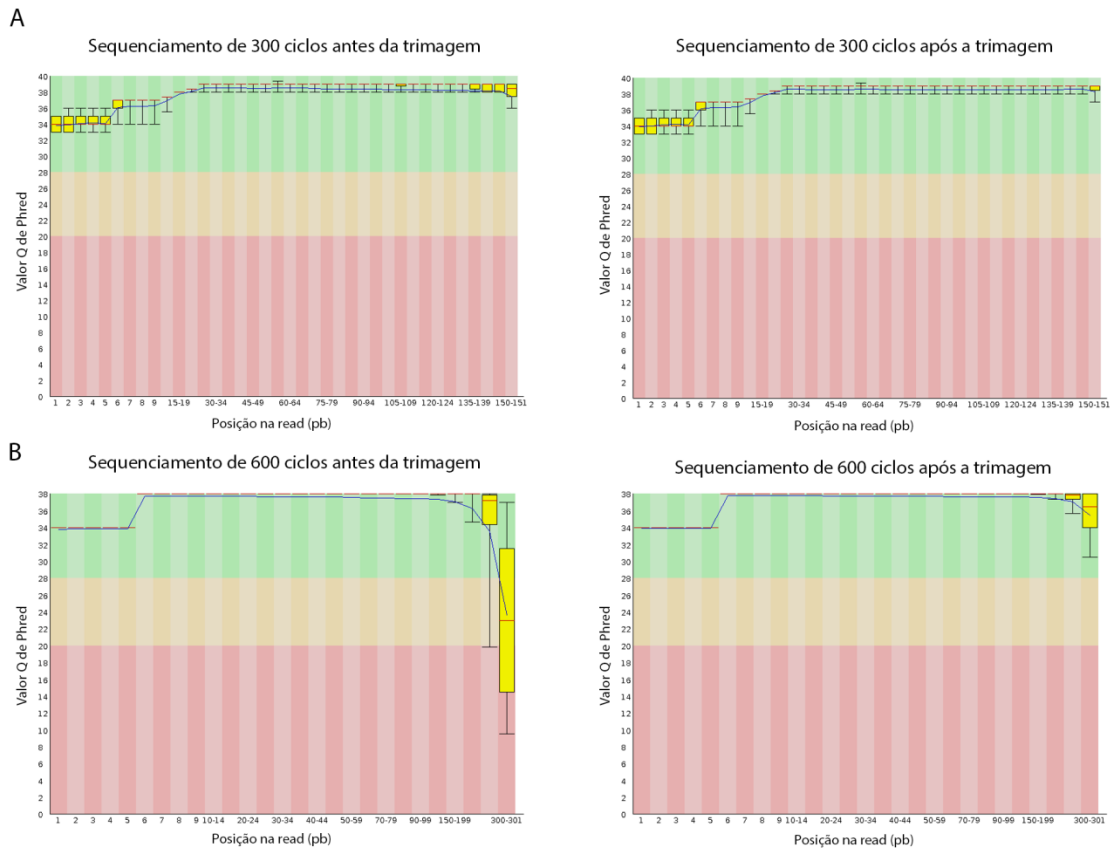


Figura 9: Valores de qualidade Q de Phred por base ao longo das reads.

Após o sequenciamento, a qualidade das *reads* das bibliotecas foi analisada pelo programa FastQC. Os gráficos apresentados mostram o valor médio de qualidade das bases ao longo das *reads*. **A)** Análise da qualidade das *reads* para o sequenciamento realizado em cartucho de 300 ciclos. O gráfico da esquerda mostra o valor Q de Phred para as *reads* antes da triagem, enquanto o da direita mostra o valor após a triagem. **B)** Análise da qualidade das *reads* para o sequenciamento realizado em cartucho de 600 ciclos. O gráfico da esquerda mostra o valor Q de phred para as *reads* antes da triagem, enquanto o da direita mostra o valor após a triagem. Em ambos os casos, nota-se que houve uma diminuição do valor Q médio de Phred e que os valores são mais baixos no começo e no final das *reads*. Após a triagem, nenhuma base apresentou valor inferior a Q28.

As *reads* geradas pelo sequenciamento no MiSeq foram montadas por dois programas diferentes. Primeiramente, a montagem foi realizada no Trinity assembler. Nesse processo, foram montados 293446 contigs. Uma segunda montagem foi realizada no programa *CLC Genomics*. Este processo montou 62152 contigs.

5.4 Identificação dos contigs com similaridade às proteínas Loxtox

Os contigs com similaridade às proteínas Loxtox foram identificados com o auxílio do programa Blastx stand-alone. Foram utilizados separadamente tanto os contigs obtidos pelo programa *CLC Genomics* quanto os contigs do Trinity assembler. O banco de dados de proteínas utilizado para a realização do Blastx foi obtido no site do NCBI. A busca das sequências proteicas que formaram o banco de dados foi feita utilizando os termos descritos no item 3.8.

Devido ao grande número de sequências que apresentaram similaridade com proteínas do banco dados, os contigs foram filtrados da seguinte forma: foram excluídos *matches* com tamanho do alinhamento menores que 100 aminoácidos (valor que representa aproximadamente 1/3 do tamanho das Loxtox), em seguida foram excluídas sequências que apresentaram e-value maior que 10^{-10} e identidade ou menor a 45%, e, por último, houve a eliminação de contigs que alinharam com mais de 1 sequência referência, sempre escolhendo o contig com maior identidade para ser mantido na análise.

Após a análise e triagem dos resultados gerados pelo Blastx, as sequências restantes (cerca de 110 para ambas as montagens) foram levadas ao programa Blast2go. Dessa forma, as proteínas que não foram caracterizadas como Loxtox nesse último passo foram excluídas das próximas análises. Restaram então 35 contigs para a montagem do Trinity e 31 contigs para a montagem do CLC.

Após a tradução das sequências de cDNA que restaram em ambas as montagens, foi constatado que a montagem realizada pelo programa CLC

apresentou mais proteínas completas (23 completas e 8 incompletas) do que a montagem do Trinity (21 completas e 14 incompletas). Além disso, 4 proteínas incompletas montadas pelo Trinity foram encontradas de forma completa na montagem do CLC. Dessa forma, devido ao maior número de proteínas completas, decidimos utilizar apenas as proteínas montadas pelo CLC em todas as próximas etapas. Devido à alta sensibilidade de ambos os programas, foram encontradas em ambas as montagens *contigs* contendo sequências idênticas, ou com mutações apenas nas regiões 3' e 5' UTR. Esses contigs foram excluídos de todas as análises e apenas uma cópia foi considerada.

Também foram identificados em ambas as montagens 3 contigs que foram classificadas como possíveis fosfolipases D pelo programa Blast2go, porém não apresentaram os domínios canônicos das proteínas Loxtox. Essas proteínas foram chamadas PLD-Ls (Fosfolipases D de *L. similis*) e foram numeradas de 1 a 3 (PLD-Ls 1, PLD-Ls 2, PLD-Ls 3). Elas serão discutidas mais à frente na sessão 5.9. O fluxuograma de trabalho utilizado para que os resultados fossem alcançados utilizando a montagem do CLC Genomics está representado na figura 7.

5.5 Identificação dos domínios principais e agrupamento dos contigs Loxtox

Após a triagem das sequências, os 31 contigs foram levados ao programa de tradução de sequências do site <http://web.expasy.org/translate>. Todos os contigs completos com suas respectivas sequências traduzidas encontram-se no anexo I deste trabalho.

Após a tradução das sequências e isolamento das sequências de cDNA maduras, os contigs foram levados ao programa CodonCode Aligner para que fosse realizado o alinhamento pelo algoritmo ClustalW e o agrupamento das sequências semelhantes. O programa separou os contigs em 15 grupos, sendo que 2 deles eram formados pelos 3 contigs PLD-Ls. Assim, 12 grupos foram formados exclusivamente pelos contigs Loxtox.

Com base na separação realizada pelo programa CodonCode, aliada à árvore filogenética que será citada na sessão 5.7, foi construído um padrão de nomenclatura para as proteínas Loxtox estudadas neste trabalho. As 31 proteínas estudadas neste trabalho foram chamadas de Loxtox, seguidas pela letra “s” (“s” de *L. similis*), pelo número do grupo na qual ela se encontra (Loxtox s1, s2, s3) e, por último, uma letra para diferenciar as proteínas internas ao mesmo grupo (Loxtox s1A, Loxtox s1B, Loxtox s1C).

Em seguida, os contigs traduzidos foram levados aos programas SignalP 4.1, ProP 1.0 e BlastP para a identificação do peptídeo sinal, pró-peptídeo e domínios relevantes para a funcionalidade das proteínas. Com exceção de uma proteína, todas as outras sequências de Loxtox encontradas neste trabalho apresentaram peptídeo sinal e em nenhuma delas foi encontrado pró-peptídeo. O programa BlastP mostrou que todas as proteínas Loxtox descritas neste trabalho possuem um sítio catalítico, um domínio de ligação ao magnésio e um alça catalítica. Todos esses domínios estão mostrados no alinhamento da figura 10. As proteínas incompletas não estão incluídas na figura 10 devido aos tamanhos variados encontrados que impediram um alinhamento razoável dentro do grupo geral; elas serão mostradas mais adiante (figuras. 11 a 15) em alinhamentos dos seus respectivos grupos.

A figura 10 mostra o alinhamento das 23 Loxtox completas encontradas neste trabalho. A numeração de aminoácidos na figura é relativa à maior proteína encontrada, Loxtox s9A (comprimento de 366 aa). As Loxtox completas tiveram um comprimento médio de 300 aa incluindo o peptídeo sinal (marcado em preto na figura 10). O peptídeo sinal variou bastante entre as proteínas Loxtox, porém a sequência M-x-L-H-x-x-L-x-L-x-C-W-x-x-x-S-E-G estava presente em 1/3 das proteínas.

Resultados

Table with 14 columns (10-90, 100-190, 200-290, 300-380) and rows for Loxtox_s1A through Loxtox_s12A. The table shows sequence alignments with colored background highlighting specific residues across the different variants.

Figura 10: Alinhamento das Loxtox completas de *Loxosceles similis*.

As sequências proteicas completas das Loxtox da peçonha foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W. Os aminoácidos marcados em diferentes tons de azul apresentam diferentes graus de conservação entre as sequências, os azuis mais escuros indicam um grau de conservação maior em relação aos tons mais claros. Aminoácidos marcados em vermelho constituem o sítio catalítico destas enzimas. A região marcada em cinza mostra o alça catalítica das proteínas, enquanto os aminoácidos marcados em verde estão relacionados ao domínio de ligação ao Mg^{2+} . A região marcada em preto representa o peptídeo sinal para cada sequência. A sequência indicada com uma seta apresenta mutações no sítio catalítico e no domínio de ligação ao Mg^{2+} .

As proteínas alinhadas apresentaram um alto nível de similaridade, variando de 54% a 99%. O sítio catalítico (marcado em vermelho), o domínio de ligação ao Mg^{2+} (marcado em verde) e o alça catalítica (marcado em cinza) foram as regiões que apresentaram maior nível de conservação. Todos os grupos, com exceção do grupo Loxtox s7 (apontado com uma seta na figura 10), apresentaram sítio catalítico e domínio de ligação ao Mg^{2+} conservados. A proteína Loxtox s7A possui duas argininas substituindo histidinas consideradas críticas na atividade das Loxtox, além de uma leucina substituindo o triptofano (H43R, H92R e W278L na figura 10). Também pudemos identificar duas mutações no domínio de ligação ao Mg^{2+} , nas quais uma glutamina foi substituída por um glutamato (E76Q) e um aspartato foi substituído por um glutamato (D78E).

Além das sequências e dos domínios importantes das proteínas Loxtox, também foi calculada a Massa molecular predita de todas as proteínas completas. Estes resultados estão mostrados na tabela 2.

Todas as proteínas apresentaram massa molecular próxima de 35 kDa com o peptídeo sinal conforme esperado, com exceção da proteína Loxtox s9A que apresentou uma massa de 42,21 kDa.

Tabela 2: Massa molecular predita das proteínas Loxtox de *L. similis*

Proteína	Massa Molecular (kDa)
Loxtox s1A	34.34
Loxtox s1B	34.57
Loxtox s1C	34.52
Loxtox s1D	34.66
Loxtox s2A	35.29
Loxtox s2B	35.29
Loxtox s2C	35.28
Loxtox s3A	34.93
Loxtox s4A	35.33
Loxtox s5A	35.17
Loxtox s6A	34.50
Loxtox s6B	32.71
Loxtox s7A	38.58
Loxtox s8A	35.72
Loxtox s8B	35.63
Loxtox s8C	35.90
Loxtox s9A	42.21
Loxtox s10A	34.65
Loxtox s10B	34.61
Loxtox s11A	34.94
Loxtox s11B	34.96
Loxtox s11C	34.99
Loxtox s11D	34.85
Loxtox s12A	35.52

5.6 Agrupamento dos contigs com sequências incompletas de proteínas Loxtox

Após agrupamento, determinação de nomenclatura e dos domínios principais das proteínas Loxtox que apresentaram sequência proteica completa, foram alinhados os contigs que apresentaram sequência incompleta de proteína. Ao todo, foram 7 contigs incompletos, com tamanho variado de 61 a 250 aminoácidos. São eles: Loxtox s1E, s1F, s1G (figura. 11), s6B (figura. 12), s9B (figura. 13), s10C (figura. 14), s11E e s11F (figura 15). Essas proteínas incompletas estão alinhadas em seus respectivos grupos.

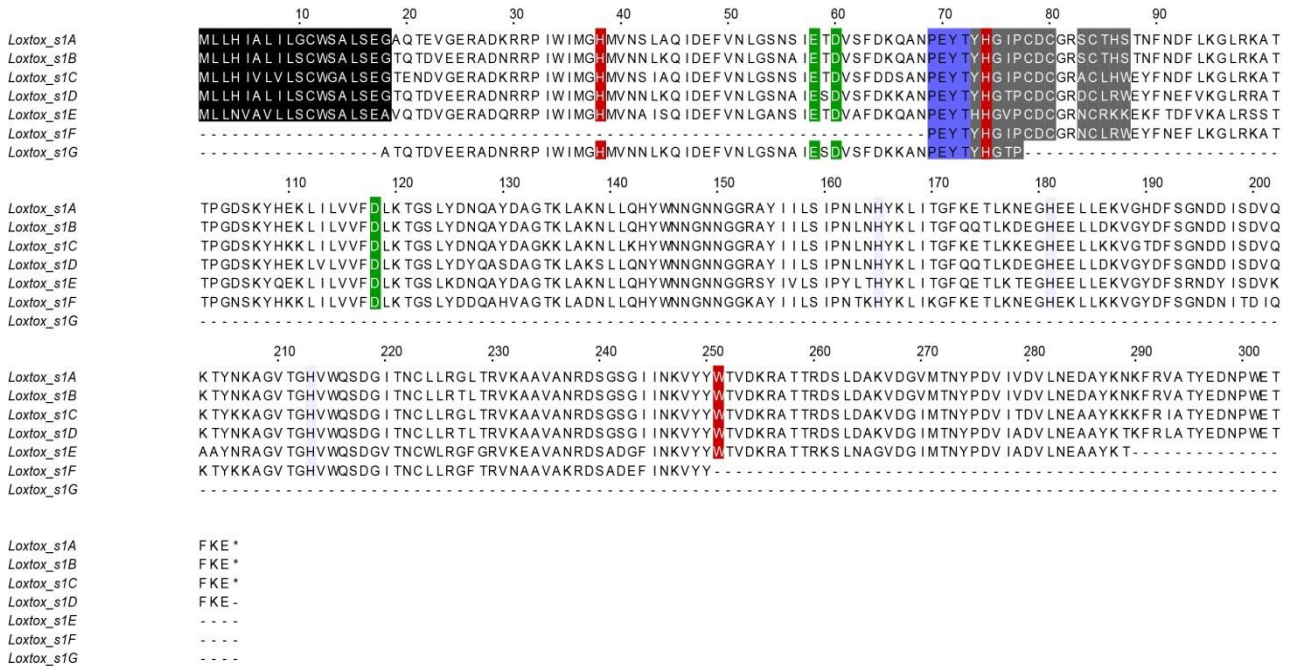


Figura 11: Alinhamento de todas as Loxtox pertencentes ao grupo Loxtox s1.

As seqüências foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W. Os aminoácidos marcados em diferentes tons de azul apresentam diferentes graus de conservação entre as seqüências, os azuis mais escuros indicam um grau de conservação maior em relação aos tons mais claros. Aminoácidos marcados em vermelho constituem o sitio catalítico destas enzimas. A região marcada em cinza mostra a alça catalítica das proteínas, enquanto os aminoácidos marcados em verde estão relacionados ao domínio de ligação ao Mg²⁺. A região marcada em preto representa o peptídeo sinal para cada seqüência. As proteínas s1E, s1F e s1G não apresentaram seqüência completa.

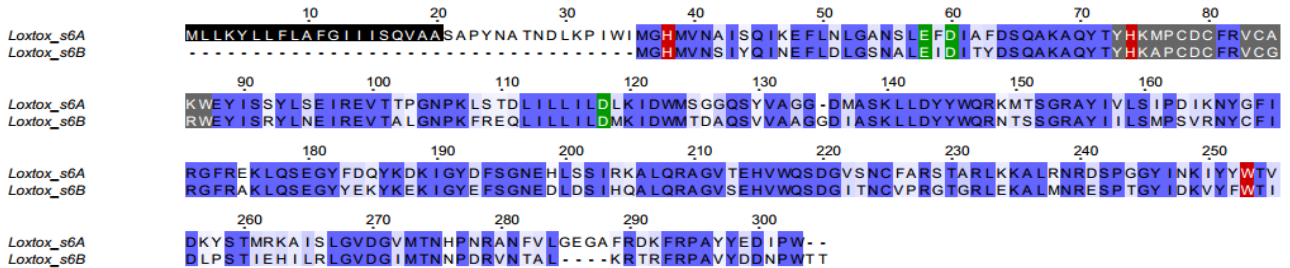


Figura 12: Alinhamento de todas as Loxtox pertencentes ao grupo Loxtox s6.

As seqüências foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W. Os aminoácidos marcados em diferentes tons de azul apresentam diferentes graus de conservação entre as seqüências, os azuis mais escuros indicam um grau de conservação maior em relação aos tons mais claros. Aminoácidos marcados em vermelho constituem o sitio catalítico destas enzimas. A região marcada em cinza mostra a alça catalítica das proteínas, enquanto os aminoácidos marcados em verde estão relacionados ao domínio de ligação ao Mg²⁺. A região marcada em preto representa o peptídeo sinal para cada seqüência. A proteína s6B não apresentou seqüência completa.

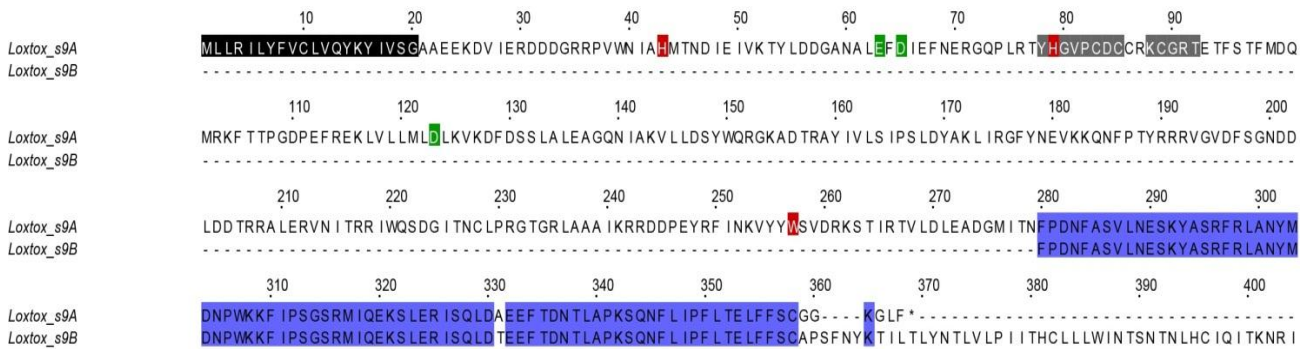


Figura 13: Alinhamento de todas as Loxtox pertencentes ao grupo Loxtox s9.

As seqüências foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W. Os aminoácidos marcados em azul são comuns a ambas as proteínas. Aminoácidos marcados em vermelho constituem o sitio catalítico destas enzimas. A região marcada em cinza mostra a alça catalítica das proteínas, enquanto os aminoácidos marcados em verde estão relacionados ao domínio de ligação ao Mg⁺². A região marcada em preto representa o peptídeo sinal para cada seqüência. A proteína Loxtox s9B não apresentou seqüência completa.

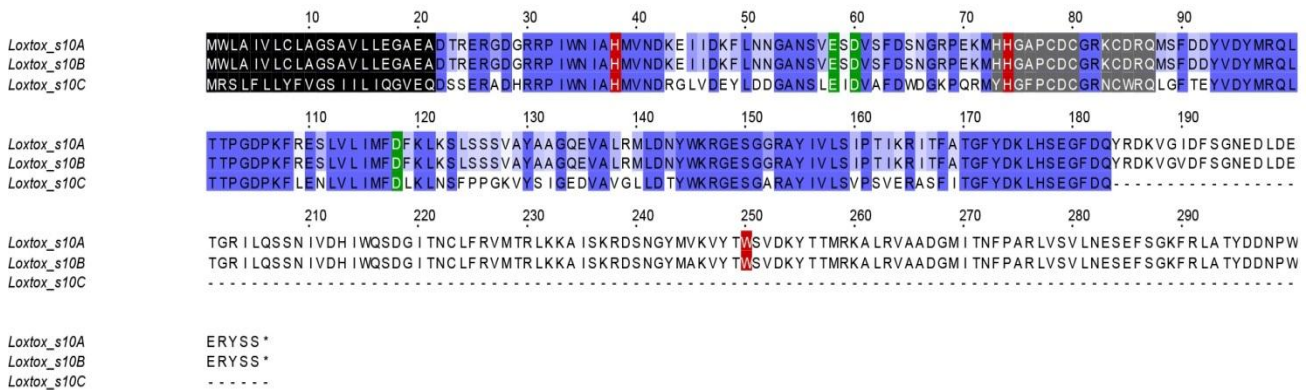


Figura 14: Alinhamento de todas as Loxtox pertencentes ao grupo Loxtox s10.

As seqüências foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W. Os aminoácidos marcados em diferentes tons de azul apresentam diferentes graus de conservação entre as seqüências, os azuis mais escuros indicam um grau de conservação maior em relação aos tons mais claros. Aminoácidos marcados em vermelho constituem o sitio catalítico destas enzimas. A região marcada em cinza mostra a alça catalítica das proteínas, enquanto os aminoácidos marcados em verde estão relacionados ao domínio de ligação ao Mg⁺². A região marcada em preto representa o peptídeo sinal para cada seqüência. A proteína Loxtox s10c não apresentou seqüência completa.

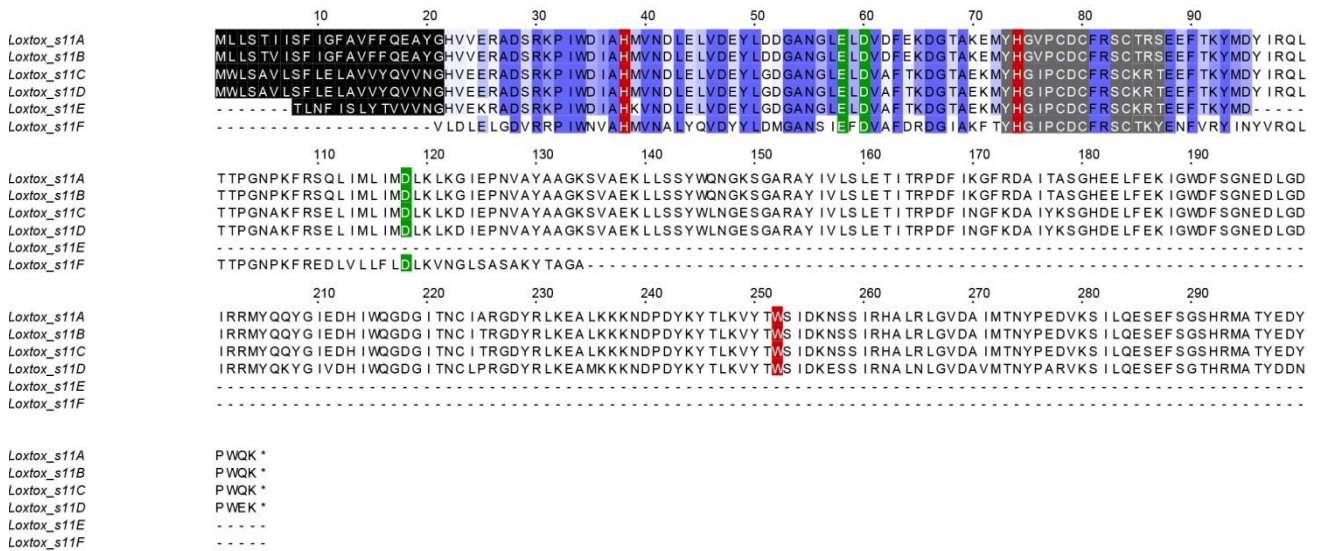


Figura 15: Alinhamento de todas as Loxtox pertencentes ao grupo Loxtox s11.

As seqüências foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W. Os aminoácidos marcados em diferentes tons de azul apresentam diferentes graus de conservação entre as seqüências, os azuis mais escuros indicam um grau de conservação maior em relação aos tons mais claros. Aminoácidos marcados em vermelho constituem o sitio catalítico destas enzimas. A região marcada em cinza mostra a alça catalítica das proteínas, enquanto os aminoácidos marcados em verde estão relacionados ao domínio de ligação ao Mg²⁺. A região marcada em preto representa o peptídeo sinal para cada seqüência. As proteínas s11E e s11F não apresentaram seqüência completa.

As proteínas incompletas foram alinhadas e agrupadas com o grupo Loxtox na qual elas apresentaram maior similaridade quando alinhadas. Com exceção da proteína Loxtox s9B, todas as proteínas incompletas encontradas apresentaram pelo menos parte de algum domínio principal das Loxtox.

5.7 Relação evolutiva das proteínas Loxtox com outras PLDs já descritas

Utilizando o alinhamento das seqüências completas das proteínas Loxtox, foi realizada em seguida a construção de uma árvore filogenética utilizando o método de *neighbor-join*. Para dar suporte à árvore, foram utilizadas 14 seqüências de proteínas obtidas do banco de dados não redundante GenBank ou do banco de dados UniProt. Para melhor visualização da árvore, as proteínas obtidas dos bancos de dados foram utilizadas na

montagem da árvore, porém foram removidas em seguida e colocadas ao lado do grupo na qual elas apresentaram maior similaridade (Figura 16). Ex.: as proteínas Loxtox i1, i2, i3, i4 apresentaram maior semelhança com o grupo Loxtox s1. Na coluna da direita, estão mostradas as atividades farmacológicas atribuídas às proteínas obtidas do banco de dados não redundante.

Para medir a confiabilidade dos ramos da árvore, foi utilizado o teste estatístico de Bootstrap. O valor considerado confiável para esta análise foi 70 (Hillis and Bull, 1993). Como as proteínas Loxtox apresentam alto valor de similaridade sua divisão muitas vezes não foi realizada com sucesso pelo programa, dessa forma o valor de Bootstrap ficou abaixo do limite de 70 em diversos ramos(Hillis and Bull, 1993)(Hillis and Bull, 1993). Quando este valor foi abaixo de 70, o ramo foi considerado politômico e o valor não foi mostrado.

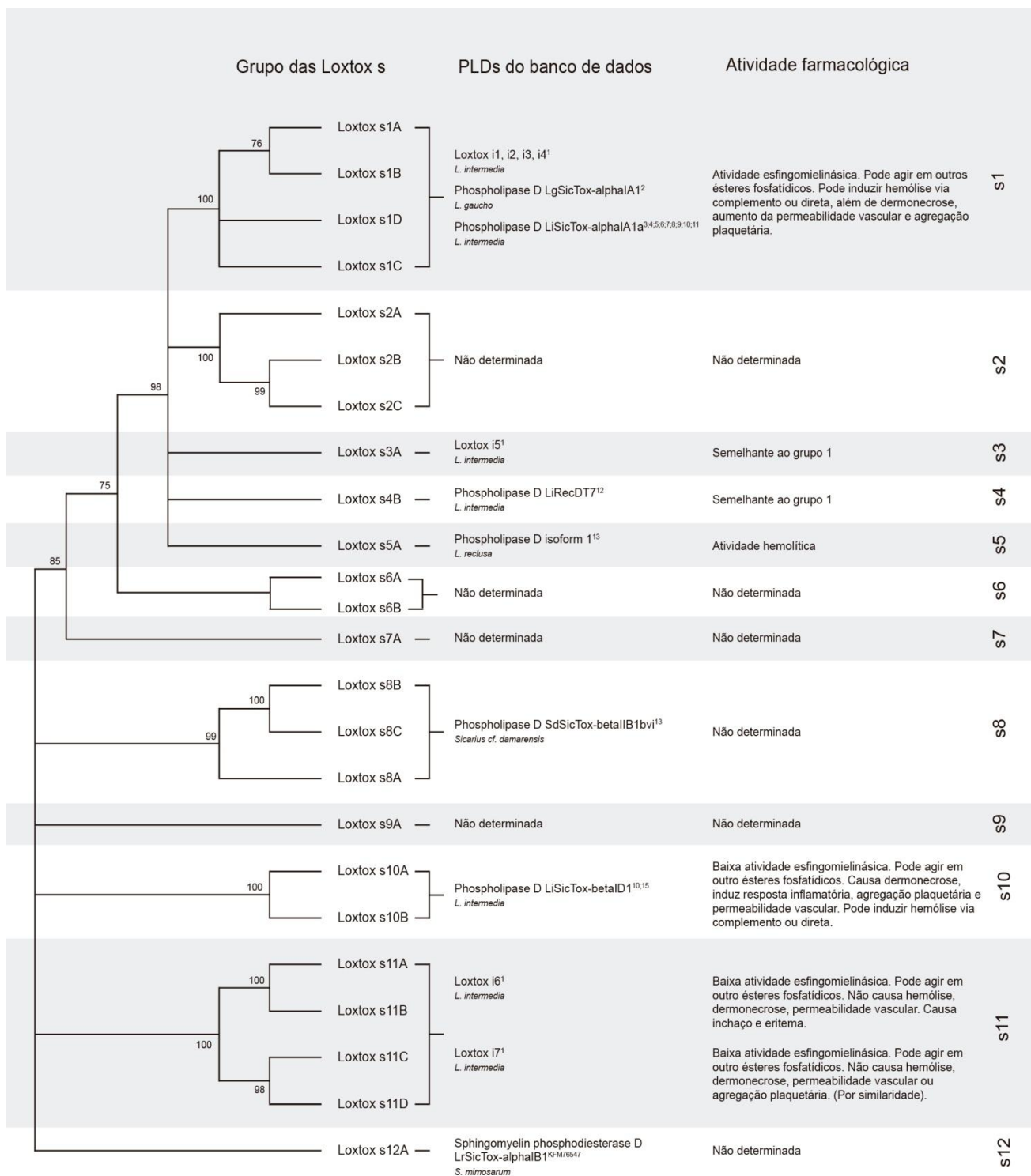


Figura 16: Árvore filogenética construída pelo método de neighbor-join com as proteínas Loxtox sequenciadas.

As proteínas obtidas do banco de dados não redundante do GenBank com alta similaridade com as Loxtox s estão listadas com seus nomes originais ao lado da árvore. As Loxtox sequenciadas foram separadas em 12 grupos. À esquerda, está mostrada a árvore com as proteínas Loxtox. Na coluna do meio, estão mostradas as PLDs obtidas do banco de dados, ao lado do grupo Loxtox s mais similar a cada uma delas. No lado direito da imagem, está mostrada a atividade farmacológica descrita para as PLDs do banco de dados. Os valores de bootstrap que excederam o limite de 70 estão mostrados nas divisórias dos ramos.

Notas: Referências: (¹ Kalapothakis *et al.*, 2007; ² Silvestre *et al.*, 2005; ³ Tambourgi *et al.*, 2004; ⁴ da Silveira *et al.*, 2006; ⁵ Chaim *et al.*, 2006; ⁶ Tambourgi *et al.*, 1998; ⁷ Kusma *et al.*, 2008; ⁸ de Oliveira Christoff *et al.*, 2008; ⁹ Chaves-Moreira *et al.*, 2009; ¹⁰ Chaves-Moreira *et al.*, 2011; ¹¹ Ullah *et al.*, 2011; ¹² Vuitika *et al.*, 2013; ¹³ Catalán *et al.*, 2011; ¹⁴ Binford *et al.*, 2009; ¹⁵ da Silveira *et al.*, 2007).

5.8 Padrão de expressão das proteínas Loxtox

Após o alinhamento e a construção da árvore com as proteínas Loxtox, foi realizado um mapeamento do sequenciamento utilizando a ferramenta RNA-seq analysis do CLC software para uma análise do padrão de expressão das Loxtox em relação ao transcriptoma (Figura 17).

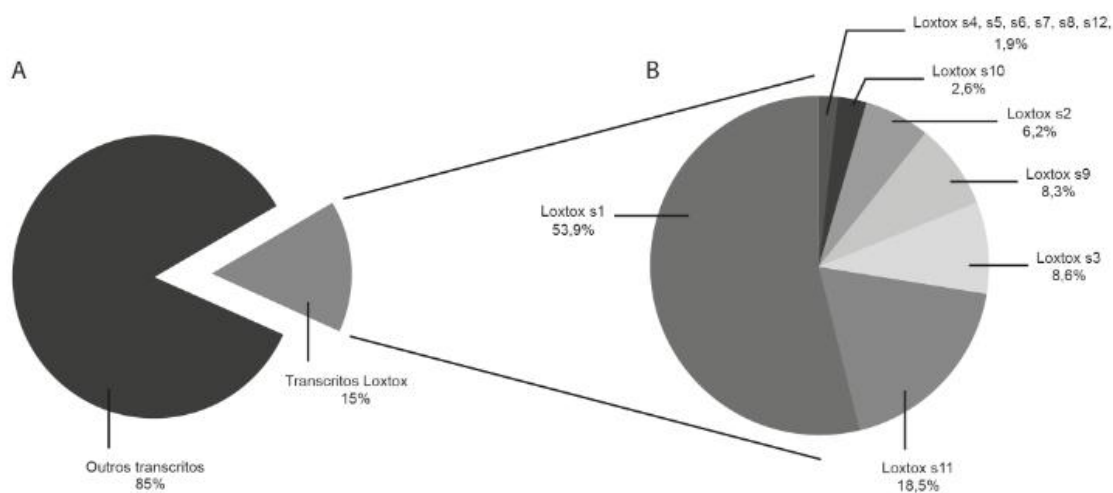


Figura 17: Classificação dos transcritos das proteínas Loxtox obtidas da glândula de peçonha da aranha *L. similis*.

A) A porcentagem de expressão das proteínas Loxtox quando comparadas com o transcriptoma total. **B)** A proporção relativa de cada grupo de proteínas Loxtox.

As proteínas Loxtox corresponderam ao total de 15% dos transcritos da glândula de peçonha da aranha *L. similis*. Considerando 15% como o total de proteínas Loxtox, o grupo mais expresso foi o grupo Loxtox s1, que representou 53,9%. Em seguida, veio o grupo Loxtox s11 com 18,5% dos transcritos. Esses dois grupos foram os mais expressos por uma margem considerável, uma vez que o próximo grupo (Loxtox s3) apresentou 8,6% dos

transcritos seguido pelo s9 com 8,3%. Após estes, o grupo Loxtox s2 apresentou 6,2% e o s10 apresentou 2,6% (Figura 17 e tabela 3).

Além desses grupos, nenhum outro apresentou porcentagem de expressão significativamente maior do que 1%, dessa forma os grupos s4, s5, s6, s7, s8, e s12 somados totalizaram 1,9% dos transcritos das proteínas Loxtox. Portanto, dois grupos somados foram responsáveis por 72,4% do total de transcritos dentro das proteínas Loxtox, indicando que essas podem ser importantes proteínas da peçonha.

A tabela 3 mostra a porcentagem de expressão para cada proteína Loxtox individualmente. As Loxtox s1A e s1C correspondem, respectivamente, a 24,8% e 12,6%, sendo as duas mais expressas da peçonha. O grupo 1 ainda apresentou duas proteínas com porcentagem de expressão acima de 5%, as Loxtox s1B e Loxtox s1D. Dos 18,5% de expressão do grupo 11, duas proteínas representaram 16,9% (Loxtox s11A e s11D). A proteína menos expressa foi a Loxtox s6A com 0,0009%.

As proteínas marcadas com um asterisco são as proteínas que não tiveram seu sequenciamento completo. Elas representaram um total de 3,64%, porém a proteína Loxtox s1E sozinha representou 3,61% dos transcritos.

Tabela 3: Valores de expressão para cada proteína Loxtox encontrada (%).

Proteínas Loxtox	Expressão individual %	Expressão por grupo %
Loxtox s1A	24,7987%	53,867%
Loxtox s1B	6,1997%	
Loxtox s1C	12,6813%	
Loxtox s1D	6,5496%	
Loxtox s1E*	3,6159%	
Loxtox s1F*	0,0187%	
Loxtox s1G*	0,0035%	
Loxtox s2A	0,0345%	6,238%
Loxtox s2B	4,6528%	
Loxtox s2C	1,5509%	
Loxtox s3A	8,6158%	8,616%
Loxtox s4A	1,0051%	1,005%
Loxtox s5A	0,0093%	0,009%
Loxtox s6A	0,0009%	0,024%
Loxtox s6B*	0,0235%	
Loxtox s7A	0,1221%	0,122%
Loxtox s8A	0,0226%	0,729%
Loxtox s8B	0,2931%	
Loxtox s8C	0,4136%	
Loxtox s9A	8,3304%	8,331%
Loxtox s9B*	0,0008%	
Loxtox s10A	1,9096%	2,548%
Loxtox s10B	0,6365%	
Loxtox s10C*	0,0022%	
Loxtox s11A	7,4210%	18,506%
Loxtox s11B	1,3411%	
Loxtox s11C	0,1788%	
Loxtox s11D	9,5612%	
Loxtox s11E*	0,0036%	
Loxtox s11F*	0,0004%	
Loxtox s12A	0,0025%	0,002%

Notas: * Proteínas com sequenciamento incompleto

5.9 Caracterização das PLDs-Ls

Além das proteínas Loxtox com os domínios canônicos de PLDs, foram encontradas também três outras proteínas classificadas como PLDs pelo Blastx que, no entanto, não apresentaram os domínios comuns às Loxtox e não apresentaram semelhança com proteínas PLDs de *Loxosceles*. Essas proteínas foram chamadas PLD-Ls (Fosfolipases D de *L. similis*), e numeradas de 1 a 3 (Tabela 4).

Tabela 4: Dados de bioinformática obtidos das proteínas PLD-Ls.

PLD-Ls	Blast hit	Tamanho (aa)	% de identidade com o hit	Espécie
PLD-Ls 1	N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D ¹ (GenBank: CCB88845.1)	94	56	<i>S. negevensis</i> Z (bactéria)
PLD-Ls 2	Phospholipase D3, partial (GenBank: KFM65948.1)	478	84	<i>S. mimosarum</i> (aranha)
PLD-Ls 3	N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D, partial (GenBank: KFM77789.1)	127	77	<i>S. mimosarum</i> (aranha)

Notas: Abreviaturas: *S. negevensis* Z (*Simkania negevensis* Z); *S. mimosarum* (*Stegodyphus mimosarum*);

Referências: ¹ (Collingro *et al.*, 2011)

Das três proteínas PLD-Ls encontradas, apenas uma foi completamente sequenciada, a PLD-Ls 2. Essa proteína apresentou 478 aminoácidos, tendo 112 aminoácidos a mais do que a maior Loxtox encontrada neste trabalho, Loxtox s9A. Além disso, a PLD-Ls 2 possui uma massa molecular predita de 54,3 kDa, enquanto a massa predita para a Loxtox s9A é de 42,2 kDa.

A figura 17 apresenta o alinhamento da proteína PLD-Ls 2 com o melhor *match* encontrado no banco de dados, a proteína Fosfolipase D3 (parcial) da aranha *Stegodyphus mimosarum*. Ao realizar o alinhamento das duas proteínas, nota-se que o sítio catalítico (marcado em vermelho na figura 18) possui os aminoácidos H¹⁹⁰, K¹⁹², S²⁰⁵, N²⁰⁷, e E²¹⁸. Para as toxinas Loxtox, o sítio catalítico é normalmente composto por duas histidinas e um triptofano (H⁴³, H⁹² e W²⁷⁸). A PLD-Ls 2 apresentou 93% de similaridade e 84% de identidade com a proteína Fosfolipase D3.

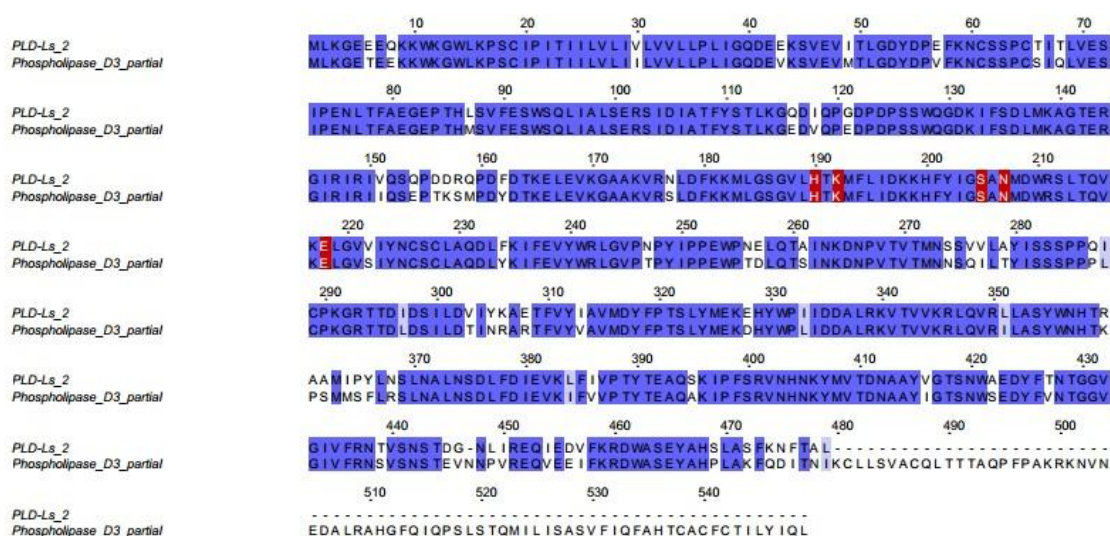


Figura 18: Alinhamento entre a PLD-Ls 2 e a sequência parcial da proteína Fosfolipase D3 de *Stegodyphus mimosarum* (GenBank database KFM65948.1).

Aminoácidos marcados em azul são comuns a ambas as proteínas. Os possíveis sítios catalíticos das enzimas estão marcados em vermelho.

A proteína PLD-Ls 1 apresentou como o melhor *match* no Blastx uma fosfolipase bacteriana, como mostrado na tabela 4. O alinhamento entre as duas proteínas está mostrado na figura 19. A PLD-Ls 1 cobriu 31% da fosfolipase D bacteriana, do aminoácido 135 a 228, com 56% de identidade.

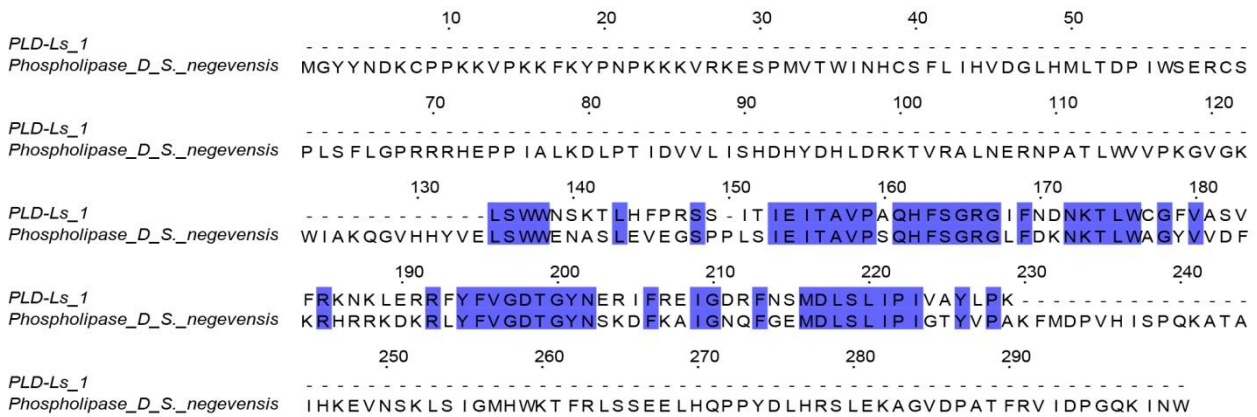


Figura 19: Alinhamento entre a PLD-Ls 1 e a sequência parcial da proteína N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzing_phospholipase D da bactéria *S. negevensis* Z (GenBank: CCB88845.1).

Aminoácidos marcados em azul são comuns a ambas as proteínas.

Já a proteína PLD-Ls 3 alinhou com outra PLD de *S.mimosarum*, a N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D, partial (GenBank: KFM77789.1). Houve 47% de cobertura com 77% de identidade, do aminoácido 16 ao 141. Tanto a proteína de *S. mimosarum* quanto a PLD de *S. negevensis* Z depositadas no banco de dados são sequências parciais. A figura 20 mostra o alinhamento da proteína PLD-Ls 3 com a PLD de *S. mimosarum*.

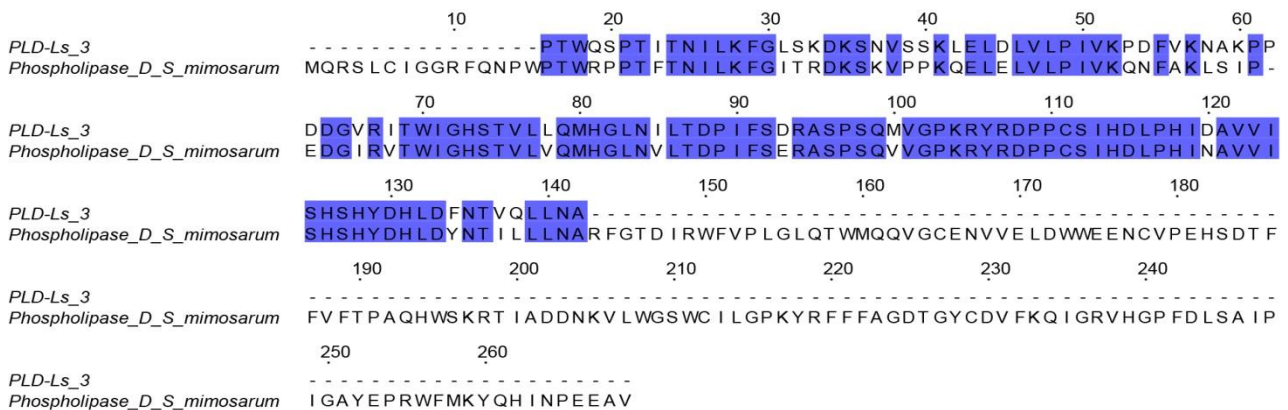


Figura 20: Alinhamento entre a PLD-Ls 3 e a sequência parcial da proteína N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzing_phospholipase D (parcial) da aranha *S. mimosarum* (GenBank: KFM77789.1).

Aminoácidos marcados em azul são comuns a ambas as proteínas.

5.10 Perfil de expressão de outras proteínas possivelmente importante para a peçonha

Além do perfil de expressão das proteínas Loxtox, fizemos ainda o perfil de expressão de outras famílias de proteínas que podem fazer parte da peçonha da aranha *L. similis* além de apresentarem possível função no quadro clínico de acidentes envolvendo essas aranhas.

Para esta análise escolhemos as proteases mais comuns da peçonha (metaloproteases, serino proteases e aspartato proteases), outras fosfolipases (fosfolipases A, B e C), proteínas com atividade em canais para sódio, hialuronidase e peptídeos inseticidas. Os dados obtidos estão mostrados na figura 21 e na tabela 5. Para o gráfico da figura 21, grupos com baixa porcentagem de expressão foram agrupados, estes foram detalhados na tabela 5.

Nenhum dos grupos estudados apresentou porcentagem de expressão maior do que 5%, sendo que o grupo com maior perfil de expressão foi o das proteases com 4,18% do total de expressão da glândula de peçonha. Os peptídeos inseticidas e a possível toxina com atividade em canal para cálcio encontrada apresentaram 2,15% e 2,76% do total de expressão da glândula respectivamente. Os outros grupos estudados não apresentaram perfil de expressão maior do que 1%.

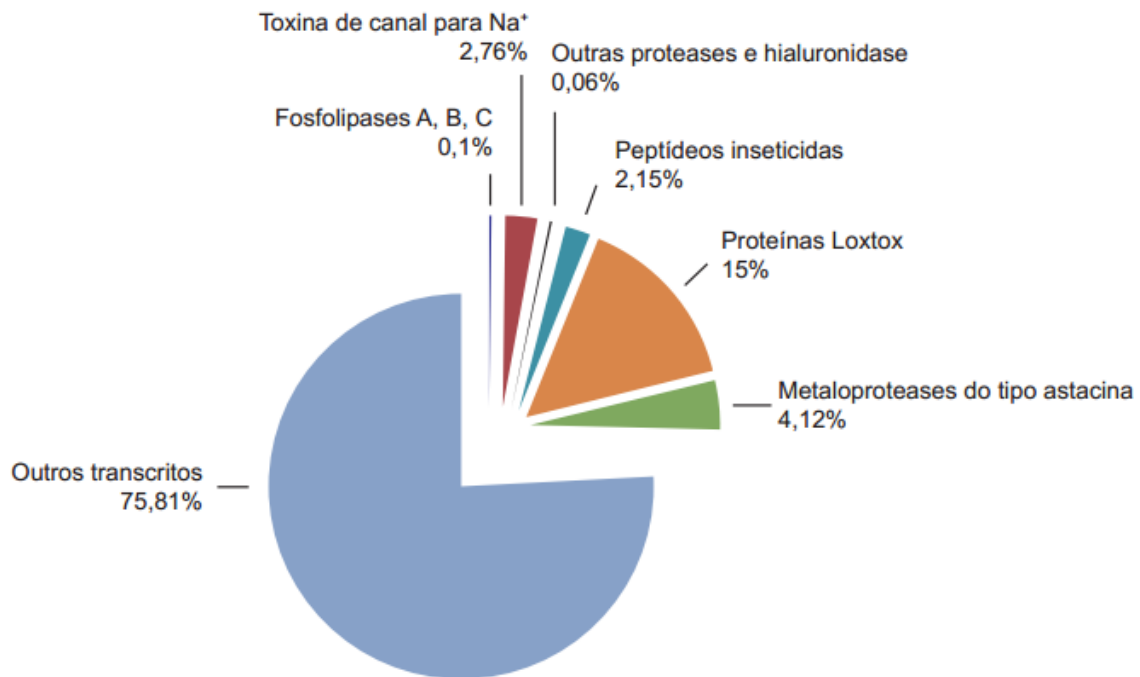


Figura 21: Gráfico da porcentagem de expressão dos outros grupos de proteínas anotados.

Os grupos anotados para este gráfico são outros possíveis componentes da peçonha da aranha *L. similis*. A categoria “Outros transcritos” corresponde a transcritos ainda não analisados após comparação com o banco de dados não redundante.

Dentre as proteases, o grupo que apresentou o maior perfil de expressão foi o grupo das metaloproteases do tipo Astacin, representando um total de 4,12% das proteases. Os demais grupos de proteases somados representaram um total de 0,06% da expressão da glândula de peçonha (tabela 5).

Tabela 5: Perfil de expressão de outros possíveis componentes da peçonha estudados.

Família do transcrito	% de expressão
Fosfolípases A, B, C	0,1
Hialuronidase	0,02
Possível toxina de canal para Na ⁺	2,76
Metaloproteases do tipo Astacinas	4,12
Outras Metaloproteases	0,01
Aspartato proteases	0,01
Serino proteases	0,04
Peptídeos Inseticidas	2,15
Proteínas Loxtox totais	18,64
Outros transcritos	72,15

6 Discussão

A família das proteínas Loxtox abrange as toxinas mais estudadas e caracterizadas derivadas da peçonha das aranhas *Loxosceles* (Kurpiewski *et al.*, 1981; Futrell, 1992; Tambourgi *et al.*, 1998; Kalapothakis *et al.*, 2007; Dias-Lopes *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2011; Gremski *et al.*, 2014; Coronado *et al.*, 2015). O conjunto de genes homólogos que codificam essa família de PLDs é bastante expresso na peçonha de aranhas do gênero *Loxosceles* e do outro gênero componente da família *Sicariidae*, o gênero *Sicarius* (Kalapothakis *et al.*, 2007; Binford *et al.*, 2009; Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010).

Em 2007, Kalapothakis *et al.* caracterizaram a família das proteínas Loxtox para a aranha *L. intermedia*. Nesse trabalho, eles agruparam as proteínas em 7 grupos de acordo com suas similaridades com PLDs previamente descritas (Kalapothakis *et al.* 2002; Tambourgi *et al.* 2004; da Silveira *et al.* 2006; Felicori *et al.* 2006; da Silveira *et al.* 2007). Ao agruparem as Loxtox por semelhança, Kalapothakis *et al.* (2007) mostraram que as Loxtox são uma família de isoformas de PLDs que possuem atividades farmacológicas diferentes. O isolamento de diferentes isoformas da família das Loxtox é muito importante, pois estudos com as isoformas isoladas podem detectar proteínas com aplicações farmacológicas e biotecnológicas a serem aplicadas, por exemplo, no melhoramento da produção de soro antiaracnídeo ou antiloxoscélico que será discutido mais adiante.

Já foi demonstrado que toxinas PLD recombinantes ou nativas de peçonhas de *Loxosceles* podem provocar resposta inflamatória exacerbada, dermonecrose, hemólise dependente ou independente do complemento e

agregação plaquetária (Barbaro *et al.*, 1996; Chaves-Moreira *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2014, 2012; Tambourgi *et al.*, 1998; Tavares *et al.*, 2011). Como esses sintomas estão entre os mais relevantes em casos de loxoscelismo, as PLDs/Loxtox são consideradas toxinas chaves na peçonha das *Loxosceles*, com alvos importantes na definição do quadro de envenenamento.

As peçonhas das diferentes espécies de *Loxosceles* possuem características bioquímicas e farmacológicas semelhantes, sendo a principal delas a atividade esfingomielinásica/fosfolipásica. Nosso grupo tem estudado a peçonha bruta de *L. similis* nos últimos 10 anos (Silvestre *et al.*, 2005; Chatzaki *et al.*, 2012; Horta *et al.*, 2013; Dantas *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2014). Neste trabalho, realizamos o transcriptoma da glândula de peçonha da aranha *L. similis* através do método de RNA-seq com o intuito de detectar isoformas pouco expressas das proteínas da família Loxtox. Foram detectadas 31 proteínas com alta semelhança a proteínas Loxtox, sendo que 23 destas foram obtidas com a sequência completa inteira (Fig. 7). Além das 31 proteínas Loxtox, foram detectadas outras 3 PLDs que apresentaram baixa similaridade com as PLDs de aranhas *Loxosceles*, mas que tiveram similaridade considerável com PLDs de outros seres vivos (tab. 4).

Segundo o SINAN, Minas Gerais apresenta, desde 2007, aproximadamente 200 casos de acidentes com aranhas *Loxosceles* por ano, com o número mais alto de acidentes nesse período sendo de 364 casos em 2013 (Ministério da saúde, 2016). Em Minas Gerais, a aranha *L. similis* é comumente encontrada em grutas na região metropolitana de Belo Horizonte (Ferreira *et al.*, 2005), porém há relatos da presença dessa espécie na cidade de Belo Horizonte (Machado *et al.*, 2005). Nosso estudo visa gerar dados sobre

a peçonha da espécie de aranha marrom encontrada em Minas Gerais. Além de fornecer material importante para o conhecimento mais profundo da peçonha de *L. similis*, esses dados podem ser utilizados como base para futuros estudos com espécies ainda mais relevantes do ponto de vista médico, como *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, uma vez que a similaridade entre as peçonhas de diferentes espécies é alta e há grande reatividade cruzada entre os soros anti-peçonha gerados contra diferentes peçonhas (Machado *et al.*, 2005; Kalapothakis *et al.*, 2007; Chatzaki *et al.*, 2012;).

Neste trabalho, nós identificamos as principais toxinas Loxtox da aranha *L. similis* e este é um importante passo na compreensão da composição da peçonha e respectivos efeitos potenciais em humanos.

Foram utilizados dois programas para a montagem do transcriptoma neste trabalho, o *CLC Genomics* e o Trinity Assembler. Após testar as duas montagens e verificar qual seria a mais adequada, decidimos pela montagem do CLC. Após obtermos as duas montagens, verificamos que o CLC conseguiu um maior número de proteínas Loxtox completas em relação ao Trinity. Apesar de ambos os programas terem utilizado o mesmo K-mer (tamanho da palavra) de 25, o ajuste do tamanho de bolha para o CLC gerou resultados mais satisfatórios para essa análise. Outros K-mers foram usados para o CLC, porém o de 25 se mostrou o melhor. A versão utilizada do Trinity Assembler para este trabalho ainda não possuía a customização do K-mer, o que impediu diversos testes com esse programa. Resultados melhores podem ser alcançados em uma versão mais recente do Trinity.

Como dito anteriormente, a montagem realizada no Trinity Assembler formou um total de 293446 contigs. Esse grande número de contigs pode ser

devido à presença de várias isoformas e genes com *splicing* alternativo, uma vez que utilizamos 35 indivíduos para a construção das bibliotecas, fazendo com que um único locus possa ser representado várias vezes. Um exemplo seria o contig nomeado c92712_g1_i22, neste caso, o contig apresentou 22 isoformas ou *splicings* alternativos.

A segunda montagem, realizada no programa CLC Genomics, obteve um total de 62152 contigs. Acreditamos que o número reduzido de contigs em relação ao programa Trinity Assembler se deve ao fato de que o *CLC Genomics*, como mostrado no item 3.12, quando encontra contigs com bolhas inferiores ao tamanho determinado pelo usuário, resolve a bolha e define o contig como apenas uma sequência utilizando a sequência com maior representatividade de *reads* como sendo a principal, enquanto o Trinity Assembler separa contigs com poucas variações em contigs diferentes. Dessa forma, a diferença entre o número total de contigs era esperada.

A análise de bioinformática gerou um total de 31 proteínas com similaridade a PLDs/Loxtox de *Loxosceles* e outras 3 PLDs que não apresentaram os domínios conservados das primeiras. Dentre as 31 PLDs/Loxtox geradas, 23 estão completas e mostraram os domínios conservados da família Loxtox. As proteínas Loxtox foram separadas em 12 grupos de acordo com o grau de similaridade entre si.

As 23 Loxtox completas são possíveis PLDs de *Loxosceles*, pois apresentaram em sua estrutura primária o sítio ativo, o domínio de ligação ao Mg^{2+} e foram similares a outras PLDs no banco de dados não redundante do GenBank. Quando analisadas no banco de dados, as Loxtox de *L. similis* foram altamente similares a PLDs de outras espécies do gênero *Loxosceles*, como: *L.*

gaucho, *L. laeta* e *L. intermedia*. Diversos trabalhos já mostraram a alta similaridade entre as peçonhas das aranhas *Loxosceles*. Buch *et al.* (2015) mostraram que as principais toxinas das *Loxosceles* apresentam epítomos imunogênicos conservados entre as espécies. Chatzaki *et al.* (2012) também mostraram que anticorpos anti-peçonha de *L. similis* possuem capacidade de neutralização contra a peçonha da aranha *L. intermedia*.

As três PLD-Ls encontradas no trabalho (tab. 4) diferiram das demais Loxtox descritas por não apresentarem domínio de ligação ao Mg^{2+} conhecido, sendo que este sítio é preponderante para a atividade das Loxtox (Murakami *et al.*, 2005), por apresentarem um sítio catalítico diferente e possuem baixa similaridade quando alinhadas contra as Loxtox deste trabalho. Uma possibilidade de interação com íons das PLD-Ls seria uma possível interação com cálcio. Fosfolipases relacionadas à sinalização celular apresentam atividade dependente de cálcio (Kolesnikov *et al.*, 2012). É possível que tal efeito ocorra e futuramente seja observado com as PLD-Ls, porém, como não foi obtida a sequência completa de duas dessas proteínas, não foi possível um estudo mais completo dos seus sítios de interação com íons. Para a PLD-Ls 2, nenhum sítio de interação iônica canônico foi encontrado nas análises de bioinformática.

Dentre as Loxtox encontradas neste trabalho, a Loxtox s7A, indicada com uma seta na figura 10, foi a única proteína que apresentou uma mutação no sítio catalítico (marcado em vermelho na figura 10). Loxtox s7A possui duas argininas substituindo as duas histidinas do sítio catalítico (H43R e H92R). Além disso, duas outras mutações foram identificadas no domínio de ligação ao Mg^{2+} (marcado em verde na figura 10), uma glutamina substituiu um glutamato

(E76Q) e um glutamato substituiu um aspartato (D78E). Pelo fato de essa proteína apresentar mutações em aminoácidos importantes para sua função (Vuitika *et al.*, 2013), ela pode apresentar uma diminuição ou até mesmo ausência de atividade em mamíferos. Como as PLDs de *Loxosceles* caracterizadas até a data deste trabalho apresentam estrutura terciária semelhante (de Giuseppe *et al.*, 2011; Murakami *et al.*, 2005; Ullah *et al.*, 2011), acredita-se que a Loxtox s7A possivelmente não apresenta grandes variações estruturais. Dessa forma, a Loxtox s7A é uma potencial candidata para uso na imunização para a produção de soro. Vários estudos já isolaram e caracterizaram peptídeos inativos que funcionaram como epítopos eficientes para a geração de anticorpos neutralizantes (Chávez-Olórtegui *et al.*, 1997; Martin-Eauclaire *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2013; Moreira-Ferreira *et al.*, 1998).

A análise do padrão de expressão das proteínas Loxtox apresentado neste trabalho mostrou que dois grupos foram os mais expressos, os grupos Loxtox s1 (53,9% do total das Loxtox) e o grupo s11 (18,5% do total das Loxtox). A análise sugere que esses dois grupos codificam proteínas que possivelmente são muito importantes para os efeitos tóxicos da peçonha. Além do alto nível de expressão, elas ainda apresentaram alta similaridade (acima de 89%) com outras proteínas que possuem atividades tóxicas previamente descritas. As proteínas Loxtox s1A, s1C e s11D foram as mais expressas do transcriptoma, com 24,8%, 12,68% e 9,5% do total de transcritos das proteínas Loxtox, respectivamente. Essas proteínas podem apresentar função importante no quadro de envenenamento, e por isso são boas candidatas a estudos de expressão heteróloga para análise de atividade farmacológica, buscando assim

uma melhor compreensão dos mecanismos e da ação da peçonha da aranha *L. similis*.

Existem dois estudos de transcriptoma para glândulas de aranhas *Loxosceles* já realizados (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010). O estudo de Fernandes-Pedrosa *et al.* (2008) analisou a glândula de peçonha da aranha *L. laeta* através do método de ESTs. Esse trabalho obteve 1357 clusters, nos quais 751 apresentaram hit significativo no banco de dados não redundante. Destes 751 clusters, 93 (16,4%) apresentaram semelhança com outras PLDs descritas para *Loxosceles*.

O trabalho de Gremski *et al.* (2010) apresentou os dados relativos ao transcriptoma da aranha *L. intermedia* também pelo método de ESTs. Foram obtidos 538 clusters, dos quais 281 foram singletons, 53% do total de ESTs obtidas foram similares com proteínas conhecidas no banco de dados. Do total de sequências obtidas por Gremski *et al.* (2010), 43,4% foram atribuídas a toxinas em geral, sendo que as PLDs representaram 9% do total do transcriptoma. No trabalho de Gremski *et al.*, é discutida a possibilidade de a diferença entre o padrão de expressão das PLDs nos transcriptomas de *L. laeta* (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008) e *L. intermedia* (Gremski *et al.*, 2010) ser devido ao uso de diferentes gêneros na construção das bibliotecas utilizadas em ambos os trabalhos. O trabalho de Fernandes-Pedrosa *et al.* (2008) utilizou apenas espécimes fêmeas na construção da biblioteca sequenciada, enquanto Gremski *et al.* (2010) utilizaram espécimes de ambos os sexos. É sabido que a peçonha derivada das fêmeas apresenta uma maior concentração de PLDs (de Oliveira *et al.*, 1999), o que poderia ter gerado a diferença encontrada pelos dois autores.

Há trabalhos que relatam a maior toxicidade da peçonha da fêmea. Em 1999, de Oliveira *et al.* mostraram que, para a aranha *L. intermedia*, as fêmeas são capazes de produzir uma quantidade maior de peçonha, ainda a peçonha das fêmeas apresentou maior atividade dermonecrótica e de hemólise dependente do complemento. De Oliveira *et al.* (2005) mostraram que a toxicidade da peçonha das fêmeas de *L. laeta* também era maior do que a toxicidade da peçonha dos machos. Por último, Chatzaki *et al.* (2012) mostraram que a peçonha das fêmeas de *L. similis* foi capaz de causar uma maior lesão cutânea em coelhos quando comparada com a peçonha dos machos.

Neste trabalho, realizado pelo método de RNA-seq, as proteínas Loxtox corresponderam a 15% do total de transcritos da glândula de peçonha de *L. similis*. Um valor quase idêntico ao obtido por Fernandes-Pedrosa *et al.* (2008), e 60% maior do que o obtido por Gremski *et al.* (2010). No presente trabalho, foram utilizados 35 indivíduos para a extração de RNA, sendo 10 machos e 25 fêmeas. Como, neste trabalho, foram utilizadas aranhas de ambos os gêneros, porém um número 2,5 vezes maior de fêmeas quando comparado ao trabalho de Fernandes-Pedrosa *et al.* (2008), não se pode afirmar qual seria a influência de cada um dos gêneros no total de expressão das Loxtox.

Na árvore filogenética da figura 15, observa-se que 6 dos 12 grupos descritos não foram agrupados com alguma PLD conhecida de *Loxosceles*. Dois destes 6 grupos foram agrupados com PLDs de peçonhas de outras aranhas, *S. mimosarum* e *S. damarensis*, a segunda aranha sendo da mesma família das *Loxosceles*. Portanto, 4 grupos (Loxtox s2, s6, s7, s9) não se agrupam com nenhuma PLD até então conhecida. Destes 4 grupos, apenas o

grupo das proteínas Loxtox s2 apresentou porcentagem de identidade média acima de 88% com PLDs conhecidas. Os outros 3 grupos tiveram porcentagens de identidade menores que 60%. Os valores foram: 51% para a proteína Loxtox s6A, 47% para a proteína s7A e 50% para a proteína Loxtox s9A. A proteína s9B apresenta baixa cobertura na análise do Blastx e por isso não podemos inferir sua porcentagem de identidade.

Apesar de apresentar alta identidade com PLDs conhecidas, o grupo Loxtox s2 não foi agrupado com nenhuma PLD obtida do banco de dados. Dentre as proteínas obtidas do banco de dados, o grupo s2 apresentou maior identidade com as PLDs que agruparam com o grupo s1. Entretanto, enquanto o grupo s2 apresentou porcentagem de identidade média de 88%, o grupo s1 apresentou esse valor acima de 91%. Dessa forma, durante a montagem da árvore filogenética, mesmo com a alta identidade apresentada pelo grupo s2 e as PLDs do banco de dados, elas foram agrupadas com o grupo s1.

Portanto, como apenas 1 dos 4 grupos que não encontraram *match* no banco de dados apresenta alta identidade com PLDs previamente descritas, acreditamos que os outros 3 grupos (Loxtox s6, s7, s9) são grupos que não haviam sido descritos anteriormente como PLDs para nenhuma aranha. Os grupos s6 e s7 apresentaram baixos níveis de expressão, abaixo de 1% do total de Loxtox, o que justifica a falta de descrição prévia de ambos, uma vez que a técnica de ESTs empregada nos trabalhos de transcriptoma anteriores para *Loxosceles* (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010) apresenta limitações para a detecção de contigs pouco expressos.

Nosso grupo realizou recentemente um trabalho de sequenciamento NGS do cDNA obtido a partir do RNA da glândula de peçonha do escorpião

Tityus serrulatus, extraído em diversos tempos após a extração da peçonha (Carmo, 2014). Neste trabalho, obtivemos em média 12 milhões de *reads* para cada sequenciamento, agrupadas em aproximadamente 70 mil contigs por biblioteca. No trabalho de Alvarenga *et al.* (2012), cujo transcriptoma da glândula de *T. serrulatus* foi realizado pelo método das ESTs randômicas, foram sequenciados 1629 ESTs que foram agrupadas em 185 contigs. Dessa forma, podemos observar que a tecnologia NGS se mostra altamente sensível e possui uma capacidade muito maior de gerar informações do que o método das ESTs randômicas.

Na análise do transcriptoma de *L. similis*, dentre os 3 grupos de Loxtox que não tinham sido descritos anteriormente, apenas o grupo s9 apresentou um nível de expressão elevado, ele representou 8,3% dos transcritos para Loxtox encontrados. Esse grupo apresentou o maior comprimento de todos os descritos, possuindo 366 aminoácidos, enquanto o comprimento médio das Loxtox ficou em torno de 305 aminoácidos. É a primeira vez que uma Loxtox com este comprimento é encontrada e mais estudos são necessários para a análise de qual seria sua atividade e função no quadro de envenenamento.

Além das proteínas que não foram agrupadas com as PLDs obtidas do banco de dados, dois outros grupos foram agrupados com PLDs de outras aranhas que não pertenciam ao gênero *Loxosceles*. Por exemplo, Loxtox s12 foi agrupado com a proteína “Sphingomyelin phosphodiesterase D LrSicTox-alpha1B1” da aranha *S. mimosarum*. As duas proteínas apresentaram 54% de identidade entre si. Não há estudos sobre essa proteína de *S. mimosarum* ou sobre possível atividade fosfolipásica na peçonha dessa aranha, uma vez que

a sequência foi submetida diretamente ao banco de dados (GenBank: KFM76547.1) após o sequenciamento do genoma da aranha *S. mimosarum*.

Já Loxtox s8 foi agrupado com a proteína “Phospholipase D SdSicTox-betaIIb1bvi” da aranha *Sicarius cf. damarensis*. Essa proteína foi descrita por Binford & Wells (2003). A proteína de *S. damarensis* agrupou com o grupo s8 com uma identidade média de 66%. O agrupamento de proteínas de *Sicarius* juntamente com proteínas de *L. similis* não é surpreendente, uma vez que estes são os dois únicos gêneros que compõem a família *Sicariidae* (Platnick, 2016). No trabalho de Binford & Wells (2003), foi testada a atividade esfingomielinásica das peçonhas de várias espécies *Loxosceles* e *Sicarius* e houve detecção para ambos os gêneros. Nesse trabalho, ainda é discutido que as peçonhas de *L. laeta* e *Sicarius* apresentaram atividade esfingomielinásica uma ordem de magnitude maior do que as outras espécies *Loxosceles* analisadas.

Tanto o grupo s8 quanto o grupo s12 apresentaram níveis de expressão abaixo de 1%, sua detecção para *Loxosceles* nos trabalhos de Fernandes-Pedrosa *et al.* (2008) e Gremski *et al.* (2010) possivelmente não foi realizada. Dessa forma, estudos mais profundos de ambos os grupos são necessários para se estabelecer sua atividade, toxicidade e possível função no quadro de envenenamento.

Kalapothis *et al.* (2007) descreveram 7 proteínas Loxtox para a aranha *L. intermedia*. Essas proteínas foram chamadas “Loxtox i” e numeradas de 1 a 7. Esse trabalho foi realizado com técnicas de proteômica e varredura de uma biblioteca de cDNA. Assim como os outros transcriptomas realizados para as aranhas marrons, proteínas pouco expressas na glândula de peçonha

difícilmente seriam encontradas com essa técnica. As sete proteínas Loxtox i encontradas por Kalapothakis *et al.* (2007) foram agrupadas em três grupos descritos no presente trabalho: Loxtox s1, s3 e s11.

As Loxtox i1, i2, i3 e i4 foram agrupadas com o grupo s1. A Loxtox i5 foi agrupada com o grupo s3 e as demais com o grupo s11. Os 3 grupos Loxtox s que foram agrupados com proteínas Loxtox i são os 3 grupos com maior nível de expressão dentre as PLDs da peçonha de *L. similis* (Fig. 13). Pela técnica de RNA-seq, foi possível a detecção de um total de 12 grupos com 31 proteínas, algumas com níveis de expressão abaixo de 0,1% dentre as Loxtox, que provavelmente não foram detectados em estudos prévios.

A tabela 4 mostrou os dados obtidos para as PLD-Ls 1, PLD-Ls 2, e PLD-Ls 3 após as análises com o Blastx. Das três proteínas, apenas a PLD-Ls2 apresentou sequência completa como citado na sessão 4.9. Duas dessas três PLDs foram similares às enzimas da aranha *S. mimosarum*, enquanto a PLD-Ls1 teve um melhor alinhamento com uma PLD da bactéria *Simkania negevensis* Z. Mesmo que todas as PLD-Ls tenham sido obtidas através do RNA-seq da glândula de peçonha, não podemos confirmar se elas contribuem para a letalidade da peçonha ou se elas estão relacionadas exclusivamente a processos celulares, uma vez que fosfolipases D participam de diversos processos nas células, como exocitose, tráfego entre as membranas e migração celular (Foster and Xu, 2003).

Como citado anteriormente, as PLD-Ls 2 e 3 foram alinhadas pelo programa Blastx com PLDs da aranha *S. mimosarum*. As sequências de PLDs dessa aranha foram depositadas após o sequenciamento do seu genoma e por isso não foram realizadas análises mais profundas da atividade dessas

enzimas. Quando alinhadas uma contra a outra, as duas proteínas PLD-Ls 2 e 3 não apresentam semelhança, indicando que provavelmente advêm de dois genes diferentes em que um, ambos ou nenhum podem fazer parte das proteínas secretadas para a peçonha.

A aranha *S. mimosarum* é conhecida como aranha de veludo africana e é encontrada nas regiões sudeste e nordeste da África e ainda em Madagascar. Ela apresenta comportamento social e vive em colônias. As colônias são propagadas por brotamento e por dispersão de fêmeas em curtas distâncias (Johannesen *et al.*, 2009). Até a data deste trabalho, a função ou localização celular das PLDs de *S. mimosarum* ainda devem ser determinadas.

A sequência parcial obtida para a PLD-Ls 1 mostrou 56% de identidade (dos resíduos 135 ao 228) com uma PLD descrita para a bactéria *Simkania negevensis* z. Assim, é possível que um organismo similar a essa bactéria esteja presente na glândula de peçonha da aranha *L. similis*. Alternativamente, pode ter ocorrido tanto uma transferência de genes entre a bactéria e a aranha, como pode ter ocorrido contaminação durante o processo de remoção da glândula. Contudo, acreditamos que a possibilidade de contaminação é improvável, pois as glândulas de peçonha foram cuidadosamente removidas do cefalotórax dos espécimes de *L. similis* com o RNA sendo extraído imediatamente.

O processo de transferência lateral de genes de PLD entre bactérias e aranhas já possui evidências (Cordes & Binford, 2006), dessa forma também há a possibilidade de ocorrência de transferência lateral. Acreditamos porém que a hipótese mais provável seria a de uma relação entre a bactéria e a aranha *L. similis*. A bactéria *S. negevensis* Z pertence à classe *Chlamydiae*,

uma classe de patógenos celulares obrigatórios (Everett *et al.*, 1999). As *Chlamydia* estão associadas a infecções pulmonares como pneumonia, bronquite e doença pulmonar obstrutiva crônica (Kose *et al.*, 2015). Além disso, *S. negevensis* é capaz de infectar e se replica com sucesso em células de insetos (Sixt *et al.*, 2012). Ainda, uma relação endossimbiótica entre bactérias e aracnídeos já foi descrita por Suesdek-Rocha *et al.* (2007), entre bactérias do gênero *Wolbachia* e o escorpião *T. serrulatus*. Encontramos ainda pelo menos 64 proteínas (não classificadas como PLDs) no transcriptoma da aranha *L. similis* que foram similares com sequências da bactéria *S. negevensis* Z. Porém estudos voltados para a análise da presença dessa bactéria seriam necessários para que se tenha confirmação de qualquer das hipóteses citadas. Por exemplo a tentativa de extração da glândula e cultivo da bactéria em meio de cultura.

Já foram encontradas PLDs semelhantes às proteínas Loxtox da peçonha das aranhas *L. similis* em outros organismos (Dias-Lopes *et al.*, 2013). Nesse trabalho, foram caracterizadas pela primeira vez proteínas PLDs em 19 gêneros de seres vivos, sendo a maioria de fungos. Essas proteínas apresentaram o domínio catalítico e importantes regiões C-terminais conservadas quando comparadas com as proteínas de *Loxosceles*. A proteína descrita para *S. negevensis* pode ser mais uma caracterizada para organismos não pertencentes ao Gênero *Loxosceles*.

A maioria das sequências incompletas descritas neste trabalho apresentaram nível de expressão inferior a 0,1%, com exceção da Loxtox s1E que apresentou 3,6%. Uma possível explicação para a falta da sequência completa dessas proteínas seria o baixo nível de expressão, uma vez que o

número de *reads* gerados para que contigs sejam formados depende do nível de expressão de cada proteína. Entretanto, este trabalho obteve tanto proteínas completas muito pouco expressas, como é o caso das Loxtox s6A, s11C e s12A, como proteínas incompletas com nível de expressão alto, como é o caso da Loxtox s1E. Portanto, estudos adicionais são necessários para se analisar outras hipóteses para esse acontecimento, como por exemplo, tempo de vida dos mRNAs na glândula, o que levaria a *reads* de tamanhos diferentes. Além disso, outros trabalhos indicam que uma edição constante dos RNAs pode funcionar como um fator de seleção para novas toxinas (Zhu and Gao, 2006), abrindo mais uma possibilidade para existência de transcritos não completos.

Os outros grupos para os quais realizamos o estudo do perfil de expressão apresentaram níveis de expressão inferiores aos das proteínas Loxtox. Destes outros grupos, o que apresentou maior porcentagem de expressão foi o grupo das proteases com 4,18%, um valor aproximadamente 3 vezes menor do que o valor das proteínas Loxtox (15%). No estudo de transcriptoma para a aranha *L. intermedia* as metaloproteases do tipo astacina corresponderam a aproximadamente 9% da expressão da glândula (Gremski et al., 2010), valor próximo também do valor detectado para a aranha *L. laeta* (Fernandes-Pedrosa et al., 2008). Em ambos os estudos citados, as outras proteases também apresentaram baixo nível de expressão, não ultrapassando nível superior a 0,5% ou no caso das aspartato proteases não sendo detectadas em um dos trabalhos. Como não realizamos estudos mais aprofundados com essas proteases, não podemos afirmar qual a porcentagem e quais fazem parte da atividade da peçonha da aranha *L. similis*.

Os peptídeos inseticidas encontrados neste trabalho representaram 2,15% do total de expressão da glândula. Para o trabalho de transcriptoma da aranha *L. laeta*, não há descrição de sequências relativas a essas proteínas. Para o transcriptoma da aranha *L. intermedia*, foi descrito que os peptídeos inseticidas encontrados representavam um total de 23,1% do total da glândula, valor muito acima do encontrado neste trabalho (2,15%).

Houve também a detecção de uma proteína que apresentou match com uma neurotoxina similar a Magi-3 da aranha *Macrothele gigas*. Essa possível neurotoxina apresentou 2,76% do total de expressão da glândula. Essa toxina foi detectada em ambos os estudos de transcriptoma realizado para as aranhas *L. intermedia* e *L. laeta*, sendo responsável por 1% e 0,1% respectivamente dos transcritos totais destes trabalhos.

Os grupos das fosfolipases A, B, C e da hialuronidase apresentaram baixo nível de expressão. Todas as fosfolipases somadas apresentaram 0,1% da expressão da glândula, enquanto a hialuronidase apresentou 0,02% do total. Nenhum dos outros trabalhos de transcriptoma para essas aranhas descreveu a presença de outras fosfolipases na glândula de peçonha. Entretanto ambos descreveram sequências correspondentes a hialuronidases, sendo 0,13% da expressão da glândula para *L. laeta* e 0,05% para *L. intermedia*, ambos apresentando baixo valor de expressão para essas enzimas. Em Relação às fosfolipases A, B e C encontradas neste trabalho, não podemos afirmar se elas fazem parte da peçonha ou do metabolismo da glândula, outros estudos serão necessários para se medir a real atividade e função dessas proteínas.

Como próximo passo deste estudo, há perspectiva de caracterização bioquímica e farmacológica de proteínas Loxtox de interesse, obtidas por meio de expressão heteróloga em sistema bacteriano. A caracterização das proteínas pode favorecer uma melhor compreensão dos mecanismos de ação da peçonha, bem como atividade sinérgica de algumas PLDs ou a ausência de atividade (Catalán *et al.*, 2011; Kalapothakis *et al.*, 2002; Magalhães *et al.*, 2013; Moreira-ferreira *et al.*, 1998). Proteínas que não apresentarem atividade significativa podem ser usadas, por exemplo, em estudos para melhoramento da qualidade do soro anti*Loxosceles* (Chávez-Olórtegui *et al.*, 1997; Martin-Eauclaire *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2013; Moreira-Ferreira *et al.*, 1998). Como próximo passo já em andamento, será realizada a anotação completa do transcriptoma da glândula de peçonha da aranha *L. similis*, para análise do perfil completo de expressão e para a busca de outros grupos de toxinas ainda não descritos.

7 Conclusões

- Neste trabalho, Identificamos 12 grupos de PLDs que contêm 23 sequências de possíveis proteínas completas da família de proteínas Loxtox, além das sequências completas, foram encontradas 8 incompletas.
- As 23 possíveis proteínas completas Loxtox apresentaram os domínios conservados da família, o sítio catalítico, a domínio de ligação ao magnésio e a alça catalítica.
- Foram detectadas ainda 3 sequências de proteínas que não apresentaram as principais características das PLDs das aranhas *Loxosceles* e foram classificadas como PLD-Ls (*Phospholipase D from L. similis*).

8 Perspectivas

- Clonagem e expressão de pelo menos 3 proteínas da família Loxtox. Atualmente as proteínas Loxtox s11A e s12A já estão clonadas em vetor de expressão (pET26-b e pET-11a respectivamente) e os testes de expressão devem iniciar em breve. Além destas, as Loxtox s10A e s10B já estão em vetores de propagação e devem ser clonadas em vetores de expressão em breve.
- Anotação completa do transcriptoma e análise dos demais componentes da glândula de peçonha em busca de novas toxinas ou outras proteínas importantes para a peçonha.
- Ensaio bioquímico e farmacológico. Ensaio de atividade fosfolipásica e ELISA, para a caracterização da atividade das proteínas e confirmação da clonagem e expressão correta.

9 Referências

- Abdulkader, R.C.R.M., Barbaro, K.C., Barros, E.J.G., Burdmann, E.A., 2008. Nephrotoxicity of Insect and Spider Venoms in Latin America. *Semin. Nephrol.* 28, 373–382. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.semnephrol.2008.04.006>
- Alvarenga, É.R., Mendes, T.M., Magalhães, B.F., Siqueira, F.F., Dantas, A.E., Barroca, T.M., Horta, C.C., Kalapothakis, E., 2012. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. *Open J. Genet.* 2, 210–220. doi:[10.4236/ojgen.2012.24027](https://doi.org/10.4236/ojgen.2012.24027)
- Alvares ESS, Rodrigues T, D.M.M., 2004. On *Loxosceles anomala* (Mello-Leitão) (Araneae: Sicariidae). *Rev. Iber. Aracnol.* 10, 293–295.
- Andersen, R.J., Campoli, J., Johar, S.K., Schumacher, K.A., Allison, E.J., 2011. Suspected Brown Recluse Envenomation: A Case Report and Review of Different Treatment Modalities. *J. Emerg. Med.* 41, e31–e37. doi:[10.1016/j.jemermed.2009.08.055](https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2009.08.055)
- Andersen, R.J., Campoli, J., Johar, S.K., Schumacher, K.A., Allison Jr, E.J., 2011. Suspected Brown Recluse Envenomation: A Case Report and Review of Different Treatment Modalities. *J. Emerg. Med.* 41, e31–e37. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jemermed.2009.08.055>
- Andrade, R.M.G. De, Galati, E.A.B., Tambourgi, D. V, 2001. Presença de *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae) na Serra da Bodoquena, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34, 275–277.

- Barbaro, K.C., Cardoso, J.L., Eickstedt, V.R., Mota, I., 1992. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. *Toxicon* 30, 331–8.
- Barbaro, K.C., Ferreira, M.L., Cardoso, D.F., Eickstedt, V.R., Mota, I., 1996. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. médicas e biológicas / Soc. Bras. Biofísica ... [et al.]* 29, 1491–7.
- Barrett, S.M., Romine-Jenkins, M., Blick, K.E., 1993. Passive hemagglutination inhibition test for diagnosis of brown recluse spider bite envenomation. *Clin. Chem.* 39, 2104–7.
- Binford, G.J., Bodner, M.R., Cordes, M.H.J., Baldwin, K.L., Rynerson, M.R., Burns, S.N., Zobel-Thropp, P. a., 2009. Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms. *Mol. Biol. Evol.* 26, 547–566. doi:10.1093/molbev/msn274
- Binford, G.J., Wells, M. a., 2003. The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogyne spiders. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 135, 25–33. doi:10.1016/S1096-4959(03)00045-9
- Buch, D.R., Souza, F.N., Meissner, G.O., Morgon, A.M., Gremski, L.H., Ferrer, V.P., Trevisan-Silva, D., Matsubara, F.H., Boia-Ferreira, M., Sade, Y.B., Chaves-Moreira, D., Gremski, W., Veiga, S.S., Chaim, O.M., Senff-Ribeiro, A., 2015. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: Evaluation of biological conservation by immune cross-reactivity. *Toxicon* 108, 154–166. doi:10.1016/j.toxicon.2015.09.041

- Catalán, a., Cortes, W., Sagua, H., González, J., Araya, J.E., 2011. Two new phospholipase D isoforms of *Loxosceles laeta*: Cloning, heterologous expression, functional characterization, and potential biotechnological application. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 25, 393–403. doi:10.1002/jbt.20399
- Chaim, O.M., Da Silveira, R.B., Trevisan-Silva, D., Ferrer, V.P., Sade, Y.B., Bóia-Ferreira, M., Gremski, L.H., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Takahashi, H.K., Toledo, M.S., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2011. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: Endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1811, 84–96. doi:10.1016/j.bbalip.2010.11.005
- Chaim, O.M., Sade, Y.B., da Silveira, R.B., Toma, L., Kalapothakis, E., Chávez-Olórtegui, C., Mangili, O.C., Gremski, W., von Dietrich, C.P., Nader, H.B., Sanches Veiga, S., 2006. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211, 64–77. doi:10.1016/j.taap.2005.05.015
- Chatzaki, M., Horta, C.C., Almeida, M.O., Pereira, N.B., Mendes, T.M., Dias-Lopes, C., Guimarães, G., Moro, L., Chávez-Olórtegui, C., Horta, M.C.R., Kalapothakis, E., 2012. Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom. *Toxicon* 60, 21–30. doi:10.1016/j.toxicon.2012.03.007
- Chaves-Moreira, D., Chaim, O.M., Sade, Y.B., Paludo, K.S., Gremski, L.H., Donatti, L., de Moura, J., Mangili, O.C., Gremski, W., da Silveira, R.B., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2009. Identification of a direct hemolytic

- effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. *J. Cell. Biochem.* 107, 655–66. doi:10.1002/jcb.22148
- Chaves-Moreira, D., Souza, F.N., Fogaça, R.T.H., Mangili, O.C., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2011. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. *J. Cell. Biochem.* 112, 2529–40. doi:10.1002/jcb.23177
- Chávez-Olórtegui, C., Kalapothakis, E., Ferreira, A.M., Ferreira, A.P., Diniz, C.R., 1997. Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 35, 213–21.
- Chávez-Olórtegui, C., Zanetti, V.C., Ferreira, a P., Minozzo, J.C., Mangili, O.C., Gubert, I.C., 1998. ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. *Toxicon* 36, 563–9.
- Collingro, A., Tischler, P., Weinmaier, T., Penz, T., Heinz, E., Brunham, R.C., Read, T.D., Bavoil, P.M., Sachse, K., Kahane, S., Friedman, M.G., Rattei, T., Myers, G.S.A., Horn, M., 2011. Unity in variety--the pan-genome of the Chlamydiae. *Mol. Biol. Evol.* 28, 3253–70. doi:10.1093/molbev/msr161
- Cordes, M.H.J., Binford, G.J., 2006. Lateral gene transfer of a dermonecrotic toxin between spiders and bacteria. *Bioinformatics* 22, 264–268. doi:10.1093/bioinformatics/bti811

- Coronado, M.A., Ullah, A., Silva, L.S., Vuitika, L., Chaim, O.M., Veiga, S.S., Chahine, J., Murakami, M.T., Arni, R.K., 2015. Structural Insights into Substrate Binding of Brown Spider Venom Class II Phospholipases D. *Curr. Protein Pept. Sci.* 1, 768–774.
- Cunha, R.B., Barbaro, K.C., Muramatsu, D., Portaro, F.C.V., Fontes, W., de Sousa, M.V., 2003. Purification and characterization of loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucho* brown spider venom. *J. Protein Chem.* 22, 135–46.
- da Silva, P.H., da Silveira, R.B., Appel, M.H., Mangili, O.C., Gremski, W., Veiga, S.S., 2004. Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon* 44, 693–709. doi:10.1016/j.toxicon.2004.07.012
- da Silveira, R.B., dos Santos Filho, J.F., Mangili, O.C., Veiga, S.S., Gremski, W., Nader, H.B., von Dietrich, C.P., 2002. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. *Toxicon* 40, 815–22.
- da Silveira, R.B., Pigozzo, R.B., Chaim, O.M., Appel, M.H., Dreyfuss, J.L., Toma, L., Mangili, O.C., Gremski, W., Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2006. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. *Biochimie* 88, 1241–53. doi:10.1016/j.biochi.2006.02.008
- da Silveira, R.B., Pigozzo, R.B., Chaim, O.M., Appel, M.H., Silva, D.T., Dreyfuss, J.L., Toma, L., Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., Gremski, W., 2007. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. *Biochimie* 89, 289–300. doi:10.1016/j.biochi.2006.12.002

- da Silveira, R.B., Wille, A.C.M., Chaim, O.M., Appel, M.H., Silva, D.T., Franco, C.R.C., Toma, L., Mangili, O.C., Gremski, W., Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2007. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochem. J.* 406, 355–363. doi:10.1042/BJ20070363
- Dantas, a E., Horta, C.C.R., Martins, T.M.M., Do Carmo, a O., Mendes, B.B.R.D.O., Goes, a M., Kalapothakis, E., Gomes, D. a, 2014. Whole venom of *Loxosceles similis* activates caspases-3, -6, -7, and -9 in human primary skin fibroblasts. *Toxicon* 84, 56–64. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.04.002
- de Castro, C.S., Silvestre, F.G., Araújo, S.C., Gabriel, D.M.Y., Mangili, O.C., Cruz, I., Chávez-Olórtegui, C., Kalapothakis, E., 2004. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon* 44, 273–80. doi:10.1016/j.toxicon.2004.05.028
- de Giuseppe, P.O., Ullah, A., Silva, D.T., Gremski, L.H., Wille, A.C.M., Chaves Moreira, D., Ribeiro, A.S., Chaim, O.M., Murakami, M.T., Veiga, S.S., Arni, R.K., 2011. Structure of a novel class II phospholipase D: Catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 622–627. doi:10.1016/j.bbrc.2011.05.053
- de Oliveira, K.C., Gonçalves de Andrade, R.M., Giusti, A.L., da Silva, W.D., Tambourgi, D. V, 1999. Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. *Toxicon* 37, 217–221. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0041-

0101(98)00130-5

- De Oliveira, K.C., Gonçalves De Andrade, R.M., Piazza, R.M.F., Ferreira, J.M.C., Van Den Berg, C.W., Tambourgi, D. V., 2005. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. *Toxicon* 45, 421–429. doi:10.1016/j.toxicon.2004.08.022
- de Oliveira Christoff, A., de Oliveira, A., Chaim, O.M., Lugarini, D., Bastos Pereira, A.L., Paludo, K.S., Queiroz Telles, J.E., Bracht, A., Veiga, S.S., Acco, A., 2008. Effects of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. *Toxicon* 52, 695–704. doi:10.1016/j.toxicon.2008.08.001
- de Santi Ferrara, G.I., Fernandes-Pedrosa, M. de F., Junqueira-de-Azevedo, I. de L.M., Gonçalves-de-Andrade, R.M., Portaro, F.C. V, Manzoni-de-Almeida, D., Murakami, M.T., Arni, R.K., van den Berg, C.W., Ho, P.L., Tambourgi, D. V., 2009. SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: Molecular cloning, expression, function and structural analysis. *Toxicon* 53, 743–753. doi:10.1016/j.toxicon.2009.02.013
- Día, I., Manríquez, J.J., Sergio, M., 2009. Loxoscelismo cutáneo y cutáneo-visceral: Revisión sistemática 26, 420–432.
- Dias-Lopes, C., Felicori, L., Guimarães, G., Gomes, E.R.M., Roman-Campos, D., Duarte, H., Damasceno, D., Martins, M., Kalapothakis, E., Almeida, A.P., Granier, C., Cruz, J.S., Guatimosim, S., Chávez-Olórtegui, C., 2010. Cardiotoxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom and the recombinant venom toxin rLiD1. *Toxicon* 56, 1426–1435.

doi:10.1016/j.toxicon.2010.08.008

Dias-Lopes, C., Neshich, I.A.P., Neshich, G., Ortega, J.M., Granier, C., Chávez-Olortegui, C., Molina, F., Felicori, L., 2013. Identification of new sphingomyelinases D in pathogenic fungi and other pathogenic organisms. *PLoS One* 8, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0079240

Everett, K.D., Bush, R.M., Andersen, A.A., 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 Pt 2, 415–40. doi:10.1099/00207713-49-2-415

Ewing, B., Ewing, B., Hillier, L., Hillier, L., Wendl, M.C., Wendl, M.C., Green, P., Green, P., 1998. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using. *Genome Res.* 175–185. doi:10.1101/gr.8.3.175

Felicori, L., Araujo, S.C., de Avila, R.A.M., Sanchez, E.F., Granier, C., Kalapothakis, E., Chávez-Olórtegui, C., 2006. Functional characterization and epitope analysis of a recombinant dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider. *Toxicon* 48, 509–19. doi:10.1016/j.toxicon.2006.06.019

Fernandes-Pedrosa, M.D.F., Junqueira-de-Azevedo, I.D.L.M., Gonçalves-de-Andrade, R.M., Kobashi, L.S., Almeida, D.D., Ho, P.L., Tambourgi, D. V, 2008. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. *BMC Genomics* 9, 279. doi:10.1186/1471-2164-9-279

- Fernandes Pedrosa, M. de F., Junqueira de Azevedo, I. de L.M., Gonçalves-de-Andrade, R.M., van den Berg, C.W., Ramos, C.R.R., Ho, P.L., Tambourgi, D. V, 2002. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 638–45.
- Ferreira, R.L., Prous, X., Machado, S.F., Martins, R.P., 2005. Population dynamics of *Loxosceles similis* (Moenkhaus, 1898) in a brazilian dry cave: a new method for evaluation of population size. *Rev. Bras. Zool.* 7, 129–141.
- Ferrer, V.P., de Mari, T.L., Gremski, L.H., Trevisan Silva, D., da Silveira, R.B., Gremski, W., Chaim, O.M., Senff-Ribeiro, A., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2013. A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, 1–12. doi:10.1371/journal.pntd.0002206
- Foster, D.A., Xu, L., 2003. Phospholipase D in cell proliferation and cancer. *Mol. Cancer Res.* 1, 789–800.
- Futrell, J.M., 1992. Loxoscelism. *Am. J. Med. Sci.* 304, 261–7.
- Futrell, J.M., Morgan, P.N., Su, S.P.C., 1979. Localization of Brown Recluse Venom Attachment Sites on Human Erythrocytes by the Ferritin-Labeled Antibody Technique.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A., 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the

- ExPASy Server. *Proteomics Protoc. Handb.* 571–607. doi:10.1385/1-59259-890-0:571
- Gertsch, W.J., 1967. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae). *Bull. Am. Museum Nat. Hist.* 136, 117–174.
- Glasel, J.A., 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques* 18, 62–3.
- Gomes, M.T.R., Guimarães, G., Frézard, F., Kalapothakis, E., Minozzo, J.C., Chaim, O.M., Veiga, S.S., Oliveira, S.C., Chávez-Olórtegui, C., 2011. Determination of sphingomyelinase-D activity of *Loxosceles* venoms in sphingomyelin/cholesterol liposomes containing horseradish peroxidase. *Toxicon* 57, 574–9. doi:10.1016/j.toxicon.2011.01.001
- Gonçalves-de-Andrade, R.M., Bertani, R., Nagahama, R.H., Barbosa, M.F.R., 2012. *Loxosceles niedeguidonae* (Araneae, Sicariidae) a new species of brown spider from Brazilian semi-arid region. *Zookeys* 36, 27–36. doi:10.3897/zookeys.175.2259
- Gremski, L.H., da Silveira, R.B., Chaim, O.M., Probst, C.M., Ferrer, V.P., Nowatzki, J., Weinschutz, H.C., Madeira, H.M., Gremski, W., Nader, H.B., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2010. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Mol. Biosyst.* 6, 2403–2416. doi:10.1039/c004118a
- Gremski, L.H., Trevisan-Silva, D., Ferrer, V.P., Matsubara, F.H., Meissner, G.O., Wille, A.C.M., Vuitika, L., Dias-Lopes, C., Ullah, A., De Moraes, F.R., Chávez-Olórtegui, C., Barbaro, K.C., Murakami, M.T., Arni, R.K., Senff-

- Ribeiro, A., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2014. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. *Toxicon* 83, 91–120. doi:10.1016/j.toxicon.2014.02.023
- Hillis, D.M., Bull, J.J., 1993. An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. *Syst. Biol.* 42, 182–192. doi:10.1093/sysbio/42.2.182
- Hogan, C.J., Barbaro, K.C., Winkel, K., 2004. Loxoscelism: Old obstacles, new directions. *Ann. Emerg. Med.* 44, 608–624. doi:10.1016/j.annemergmed.2004.08.028
- Horta, C.C.R., de Magalhães, B.F., Oliveira-Mendes, B.B.R., Carmo, A.O. Do, Duarte, C.G., Felicori, L.F., Machado-de-Ávila, R.A., Chávez-Olórtegui, C., Kalapothakis, E., 2014. Molecular, Immunological, and Biological Characterization of *Tityus serrulatus* Venom Hyaluronidase: New Insights into Its Role in Envenomation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8. doi:10.1371/journal.pntd.0002693
- Horta, C.C.R., Oliveira-Mendes, B.B.R., do Carmo, A.O., Siqueira, F.F., Barroca, T.M., dos Santos Nassif Lacerda, S.M., de Almeida Campos, P.H., de França, L.R., Ferreira, R.L., Kalapothakis, E., 2013. Lysophosphatidic acid mediates the release of cytokines and chemokines by human fibroblasts treated with *loxosceles* spider venom. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1682–5. doi:10.1038/jid.2013.40
- Isbister, G.K., Fan, H.W., 2011. Spider bite. *Lancet (London, England)* 378, 2039–47. doi:10.1016/S0140-6736(10)62230-1

- Isbister, G.K., Graudins, A., White, J., Warrell, D., 2003. Antivenom treatment in arachnidism. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 41, 291–300.
- Isbister, G.K., Vetter, R.S., 2005. Loxoscelism and necrotic arachnidism: more myths and minor corrections. *Ann. Emerg. Med.* 46, 205-6-7. doi:10.1016/j.annemergmed.2005.01.043
- Johannesen, J., Wickler, W., Seibt, U., Moritz, R.F.A., 2009. Population history in social spiders repeated: colony structure and lineage evolution in *Stegodyphus mimosarum* (Eresidae). *Mol. Ecol.* 18, 2812–8. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04238.x
- Kalapothakis, E., Araujo, S.C., de Castro, C.S., Mendes, T.M., Gomez, M.V., Mangili, O.C., Gubert, I.C., Chávez-Olórtegui, C., 2002. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon* 40, 1691–9.
- Kalapothakis, E., Chatzaki, M., Gonçalves-Dornelas, H., de Castro, C.S., Silvestre, F.G., Laborne, F. V., de Moura, J.F., Veiga, S.S., Chávez-Olórtegui, C., Granier, C., Barbaro, K.C., 2007. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. *Toxicon* 50, 938–946. doi:10.1016/j.toxicon.2007.07.001
- Kleiner, D.E., Stetler-Stevenson, W.G., 1993. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 891–7.
- Kolesnikov, Y.S., Nokhrina, K.P., Kretynin, S. V, Volotovski, I.D., Martinec, J., Romanov, G. a, Kravets, V.S., 2012. Molecular structure of phospholipase

- D and regulatory mechanisms of its activity in plant and animal cells. *Biochem. Biokhimiia* 77, 1–14. doi:10.1134/S0006297912010014
- Kose, M., Ekinci, D., Gokahmetoglu, S., Elmas, T., Öztürk, M.K., 2015. *Simkania negevensis*: Is it a real respiratory pathogen? *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 62, 161–6. doi:10.1556/030.62.2015.2.6
- Kurpiewski, G., Forrester, L.J., Barrett, J.T., Campbell, B.J., 1981. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. *Biochim. Biophys. Acta* 678, 467–76.
- Kusma, J., Chaim, O.M., Wille, A.C.M., Ferrer, V.P., Sade, Y.B., Donatti, L., Gremski, W., Mangili, O.C., Veiga, S.S., 2008. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. *Biochimie* 90, 1722–36. doi:10.1016/j.biochi.2008.07.011
- Lajoie, D.M., Zobel-Thropp, P. a., Kumirov, V.K., Bandarian, V., Binford, G.J., Cordes, M.H.J., 2013. Phospholipase D Toxins of Brown Spider Venom Convert Lysophosphatidylcholine and Sphingomyelin to Cyclic Phosphates. *PLoS One* 8, 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0072372
- Lee, S., Lynch, K.R., 2005. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem. J.* 391, 317–323. doi:10.1042/BJ20050043
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M., 2012. Comparison of next-generation sequencing systems. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. doi:10.1155/2012/251364
- Machado, E.O., Alvares, E.S.S., de Maria, M., Kalapothakis, E., 2005. Sobre a

- presença de três espécies de *Loxosceles* Heineken & Lowe (Araneae: Sicariidae) no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Lundiana* 6, 113–115.
- Machado, É.O., Álvares, É.S.S., de Maria, M., Kalapothakis, E., 2005. Sobre a presença de três espécies de *Loxosceles* Heineken & Lowe (Araneae: Sicariidae) no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Lundiana* 6, 113–115.
- Machado, L.F., Laugesen, S., Botelho, E.D., Ricart, C.A.O., Fontes, W., Barbaro, K.C., Roepstorff, P., Sousa, M. V, 2005. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. *Proteomics* 5, 2167–76. doi:10.1002/pmic.200401096
- Magalhães, G.S., Caporrino, M.C., Della-Casa, M.S., Kimura, L.F., Prezotto-Neto, J.P., Fukuda, D. a., Portes-Junior, J. a., Neves-Ferreira, A.G.C., Santoro, M.L., Barbaro, K.C., 2013. Cloning, expression and characterization of a phospholipase D from *Loxosceles gaucho* venom gland. *Biochimie* 95, 1773–1783. doi:10.1016/j.biochi.2013.06.002
- Málaque, C.M.S., Castro-Valencia, J.E., Cardoso, J.L.C., França, F.O.D.S., Barbaro, K.C., Fan, H.W., 2002. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 44, 139–43.
- Malaque, C.M.S., Santoro, M.L., Cardoso, J.L.C., Conde, M.R., Novaes, C.T.G., Risk, J.Y., França, F.O.S., de Medeiros, C.R., Fan, H.W., 2011. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. *Toxicon* 58, 664–71. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.09.011

- Manfred G. Grabherr, Brian J. Haas, Moran Yassour, Joshua Z. Levin, Dawn A. Thompson, Ido Amit, Xian Adiconis, Lin Fan, Raktima Raychowdhury, Qiandong Zeng, Zehua Chen, Evan Mauceli, Nir Hacohen, Andreas Gnirke, Nicholas Rhind, Federica di Palma, Bruce W., N., Friedman, and A.R., 2011. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nat. Biotechnol.* 29, 644–652. doi:10.1038/nbt.1883.Trinity
- Marković-Housley, Z., Miglierini, G., Soldatova, L., Rizkallah, P.J., Müller, U., Schirmer, T., 2000. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure* 8, 1025–1035. doi:10.1016/S0969-2126(00)00511-6
- Marques-da-silva, E., Luciane, M., 2005. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heinecken & Lowe , 1835 (Araneae ; Sicariidae) no Estado do Paraná species distribution in the State of Paraná 38, 331–335.
- Martin-Eauclaire, M.-F., Alami, M., Giamarchi, A., Missimilli, V., Rosso, J.-P., Bougis, P.E., 2006. A natural anatoxin, Amm VIII, induces neutralizing antibodies against the potent scorpion alpha-toxins. *Vaccine* 24, 1990–6. doi:10.1016/j.vaccine.2005.11.016
- Mcglasson, D.L., Green, J.A., Stoecker, W. V, James, L., Calcara, D.A., 2009. *NIH Public Access* 22, 216–222.
- Mendes, T.M., Oliveira, D., Figueiredo, L.F.M., Machado-de-Avila, R. a., Duarte, C.G., Dias-Lopes, C., Guimarães, G., Felicori, L., Minozzo, J.C., Chávez-Olortegui, C., 2013. Generation and characterization of a recombinant chimeric protein (rCpLi) consisting of B-cell epitopes of a dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom. *Vaccine* 31, 2749–2755.

doi:10.1016/j.vaccine.2013.03.048

- Merchant, M.L., Hinton, J.F., Geren, C.R., 1998. Sphingomyelinase D activity of brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom as studied by ³¹P-NMR: effects on the time-course of sphingomyelin hydrolysis. *Toxicon* 36, 537–45. doi:S0041-0101(97)00078-0 [pii]
- Merchant, M.L., Hinton, J.F., Geren, C.R., 1997. Effect of hyperbaric oxygen on sphingomyelinase D activity of brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom as studied by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 335–8.
- Miller, M.J., Gomez, H.F., Snider, R.J., Stephens, E.L., Czop, R.M., Warren, J.S., 2000. Detection of *Loxosceles* venom in lesional hair shafts and skin: application of a specific immunoassay to identify dermonecrotic arachnidism. *Am. J. Emerg. Med.* 18, 626–8. doi:10.1053/ajem.2000.9272
- Ministério da saúde, 2016. Sistema nacional de notificação de agravos. Ministério da Saúde, Brasília, Dist. Fed.
- Moreira-Ferreira, A.M., Kalapothakis, E., Diniz, C.R., Chávez-Olórtegui, C., 1998. In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization of mice with a non-toxic protein. *Toxicon* 36, 333–9.
- Moreira-ferreira, A.N.A.M.B., Kalapothakis, E., Diniz, C.R., 1998. In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization of mice with with a non-toxic protein 36, 333–339.
- Morin, R.D., Bainbridge, M., Fejes, A., Hirst, M., Krzywinski, M., Pugh, T.J., McDonald, H., Varhol, R., Jones, S.J.M., Marra, M.A., 2008. Profiling the

- HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing. *Biotechniques* 45, 81–94. doi:10.2144/000112900
- Mortazavi, A., Williams, B. a, McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B., 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods*. doi:10.1038/nmeth.1226
- Mota, I., Barbaro, K.C., 1995. Biological and Biochemical Properties of Venoms from Medically Important *Loxosceles* (Araneae) Species in Brazil. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 14, 401–421.
- Murakami, M.T., Fernandes-Pedrosa, M.F., Tambourgi, D. V., Arni, R.K., 2005. Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. *J. Biol. Chem.* 280, 13658–13664. doi:10.1074/jbc.M412437200
- Ozsolak, F., Milos, P.M., 2011. NIH Public Access. *Nat. Rev. Genet.* 12, 87–98. doi:10.1038/nrg2934.RNA
- Pauli, I., Minozzo, J.C., da Silva, P.H., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2009. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). *Toxicon* 53, 660–71. doi:10.1016/j.toxicon.2009.01.033
- Pereira, N.B., Campos, P.P., De Jesus Oviedo Socarrás, T., Pimenta, T.S., Parreiras, P.M., Silva, S.S., Kalapothakis, E., Andrade, S.P., Moro, L., 2012. Sponge implant in Swiss mice as a model for studying loxoscelism.

- Toxicon 59, 672–679. doi:10.1016/j.toxicon.2012.02.005
- Pereira, N.B., Campos, P.P., Parreiras, P.M., Chiarini-Garcia, H., Socarrás, T.O., Kalapothakis, E., Andrade, S.P., Moro, L., 2014. Apoptosis, mast cell degranulation and collagen breakdown in the pathogenesis of loxoscelism in subcutaneously implanted sponges. *Toxicon* 84, 7–18. doi:10.1016/j.toxicon.2014.03.003
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8, 785–6. doi:10.1038/nmeth.1701
- Pretel, F., Gonçalves-De-Andrade, R.M., Magnoli, F.C., Da Silva, M.E.R., Ferreira, J.M.C., Van Den Berg, C.W., Tambourgi, D. V., 2005. Analysis of the toxic potential of venom from *Loxosceles adelaida*, a Brazilian brown spider from karstic areas. *Toxicon* 45, 449–458. doi:10.1016/j.toxicon.2004.12.002
- Quintero-Hernández, V., Ortiz, E., Rendón-Anaya, M., Schwartz, E.F., Becerril, B., Corzo, G., Possani, L.D., 2011. Scorpion and spider venom peptides: Gene cloning and peptide expression. *Toxicon* 58, 644–663. doi:10.1016/j.toxicon.2011.09.015
- Rendón-Anaya, M., Delaye, L., Possani, L.D., Herrera-Estrella, A., 2012. Global transcriptome analysis of the scorpion *Centruroides noxius*: New toxin families and evolutionary insights from an ancestral scorpion species. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0043331
- Ribeiro, M.F., Oliveira, F.L., Monteiro-Machado, M., Cardoso, P.F., Guillarducci-

- Ferraz, V.V.C., Melo, P. a., Souza, C.M.V., Calil-Elias, S., 2015. Pattern of inflammatory response to *Loxosceles intermedia* venom in distinct mouse strains: A key element to understand skin lesions and dermonecrosis by poisoning. *Toxicon* 96, 10–23. doi:10.1016/j.toxicon.2015.01.008
- Rodríguez de la Vega, R.C., Schwartz, E.F., Possani, L.D., 2010. Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon* 56, 1155–1161. doi:10.1016/j.toxicon.2009.11.010
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–25.
- Sambrook and Russell, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd editio. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sams, H.H., Dunnick, C.A., Smith, M.L., King, L.E., 2001. Necrotic arachnidism. *J. Am. Acad. Dermatol.* 44, 561-73–6. doi:10.1067/mjd.2001.112385
- Schenone, H., Saavedra, T., Rojas, A., Villarroel, F., 1989. Loxoscelism in Chile. Epidemiologic, clinical and experimental studies. *Rev. do Inst. Med. Trop. São Paulo* 31, 403–15.
- Schmieder, R., Edwards, R., 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27, 863–864. doi:10.1093/bioinformatics/btr026
- Schwartz, E.F., Diego-Garcia, E., Rodríguez de la Vega, R.C., Possani, L.D., 2007. Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). *BMC Genomics* 8, 119. doi:10.1186/1471-2164-8-119

- Senff-Ribeiro, A., Henrique da Silva, P., Chaim, O.M., Gremski, L.H., Paludo, K.S., Bertoni da Silveira, R., Gremski, W., Mangili, O.C., Veiga, S.S., 2008. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. *Biotechnol. Adv.* 26, 210–8. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.12.003
- Sezerino, U.M., Zannin, M., Coelho, L.K., Gonçalves Júnior, J., Grando, M., Mattosinho, S.G., Cardoso, J.L., von Eickstedt, V.R., França, F.O., Barbaro, K.C., Fan, H.W., 1998. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92, 546–8.
- Silvestre, F.G., de Castro, C.S., de Moura, J.F., Giusta, M.S., De Maria, M., Alvares, E.S.S., Lobato, F.C.F., Assis, R. a, Gonçalves, L. a, Gubert, I.C., Chávez-Olórtegui, C., Kalapothakis, E., 2005. Characterization of the venom from the Brazilian Brown Spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). *Toxicon* 46, 927–36. doi:10.1016/j.toxicon.2005.09.002
- Singleton, P.A., 2014. Hyaluronan regulation of endothelial barrier function in cancer. *Adv. Cancer Res.* 123, 191–209. doi:10.1016/B978-0-12-800092-2.00007-1
- Sixt, B.S., Hiess, B., König, L., Horn, M., 2012. Lack of effective anti-apoptotic activities restricts growth of Parachlamydiaceae in insect cells. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0029565
- Suesdek-Rocha, L., Bertani, R., da Silva Jr., P.I., Selivon, D., 2007. The first record for *Wolbachia* in a scorpion: the parthenogenetic yellow scorpion *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). *Rev. Ibérica Aracnol.* 14, 183–

184.

Swanson, D.L., Vetter, R.S., 2006. Loxoscelism. *Clin. Dermatol.* 24, 213–221.

doi:10.1016/j.clindermatol.2005.11.006

Tambourgi, D. V, de F Fernandes Pedrosa, M., van den Berg, C.W.,

Gonçalves-de-Andrade, R.M., Ferracini, M., Paixão-Cavalcante, D.,

Morgan, B.P., Rushmere, N.K., 2004. Molecular cloning, expression,

function and immunoreactivities of members of a gene family of

sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. *Mol. Immunol.* 41,

831–40. doi:10.1016/j.molimm.2004.03.027

Tambourgi, D. V, Magnoli, F.C., van den Berg, C.W., Morgan, B.P., de Araujo,

P.S., Alves, E.W., Da Silva, W.D., 1998. Sphingomyelinases in the venom

of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis

and complement-dependent hemolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

251, 366–73. doi:10.1006/bbrc.1998.9474

Tavares, F.L., Peichoto, M.E., Rangel, D. de M., Barbaro, K.C., Cirillo, M.C.,

Santoro, M.L., Sano-Martins, I.S., 2011. *Loxosceles gaucho* spider venom

and its sphingomyelinase fraction trigger the main functions of human and

rabbit platelets. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 1567–74.

doi:10.1177/09603271110393761

Thermo, n.d. T009-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop 1000 & 8000.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the

sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic*

- Acids Res. 22, 4673–80.
- Trevisan-Silva, D., Gremski, L.H., Chaim, O.M., da Silveira, R.B., Meissner, G.O., Mangili, O.C., Barbaro, K.C., Gremski, W., Veiga, S.S., Senff-Ribeiro, A., 2010. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). *Biochimie* 92, 21–32. doi:10.1016/j.biochi.2009.10.003
- Ullah, A., de Giuseppe, P.O., Murakami, M.T., Trevisan-Silva, D., Wille, A.C.M., Chaves-Moreira, D., Gremski, L.H., da Silveira, R.B., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O.M., Veiga, S.S., Arni, R.K., 2011. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 67, 234–6. doi:10.1107/S1744309110050931
- Van Meeteren, L. a., Frederiks, F., Giepmans, B.N.G., Fernandes Pedrosa, M.F., Billington, S.J., Jost, B.H., Tambourgi, D. V., Moolenaar, W.H., 2004. Spider and Bacterial Sphingomyelinases D Target Cellular Lysophosphatidic Acid Receptors by Hydrolyzing Lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* 279, 10833–10836. doi:10.1074/jbc.C300563200
- Veiga, S.S., da Silveira, R.B., Dreyfuss, J.L., Haoach, J., Pereira, A.M., Mangili, O.C., Gremski, W., 2000. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* 38, 825–839. doi:10.1016/S0041-0101(99)00197-X
- Vetter, R.S., 2009. The distribution of brown recluse spiders in the southeastern quadrant of the United States in relation to loxoscelism diagnoses. *South. Med. J.* 102, 518–22. doi:10.1097/SMJ.0b013e3181a0abb3

- Vetter, R.S., Isbister, G.K., 2008. Medical aspects of spider bites. *Annu. Rev. Entomol.* 53, 409–29. doi:10.1146/annurev.ento.53.103106.093503
- Vuitika, L., Gremski, L.H., Belisário-Ferrari, M.R., Chaves-Moreira, D., Ferrer, V.P., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2013. Brown spider phospholipase-D containing a conservative mutation (D233E) in the catalytic site: Identification and functional characterization. *J. Cell. Biochem.* 114, 2479–2492. doi:10.1002/jcb.24594
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 57–63. doi:10.1038/nrg2484
- Zhu, S., Gao, B., 2006. Molecular characterization of a new scorpion venom lipolysis activating peptide: Evidence for disulfide bridge-mediated functional switch of peptides. *FEBS Lett.* 580, 6825–6836. doi:10.1016/j.febslet.2006.11.040
- Zobel-Thropp, P. a, Bodner, M.R., Binford, G.J., 2010. Comparative analyses of venoms from American and African Sicarius spiders that differ in sphingomyelinase D activity. *Toxicon* 55, 1274–82. doi:10.1016/j.toxicon.2010.01.019
- Župunski, V., Kordiš, D., Gubenšek, F., 2003. Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. *FEBS Lett.* 547, 131–136. doi:10.1016/S0014-5793(03)00693-8

10 Anexos

10.1 Sequência de todas as proteínas caracterizadas neste trabalho:

Sequências cDNA e aminoácidos das Loxtox completas

Loxtox s1A

GGGAACGTGCGGATAAACGGGGGGACATTGCTCTTTTCGAGTTACCAACTCCACCATC

ATGTTGCTGCACATTGCCTTAATTCTTGGCTGTTGGAGCGCCTTATCTGAGGGAGCCCAA
 M L L H I A L I L G C W S A L S E G A Q
 ACAGAAGTTGGGGAACGTGCGGATAAACGGCGGCCTATATGGATTATGGGTCCACATGGTC
 T E V G E R A D K R R P I W I M G H M V
 AACTCCCTCGCTCAGATAGACGAATTTGTAAACCTTGGATCGAATTCCATCGAAACAGAC
 N S L A Q I D E F V N L G S N S I E T D
 GTGTCATTCGATAAAACAAGCTAATCCTGAATACACATACCATGGGATTCCTTGGCATTGC
 V S F D K Q A N P E Y T Y H G I P C D C
 GGAAGGTCTTGCCTCATTTCGACGAACTTCAATGATTTCTGAAAGGTCTACGAAAGGCC
 G R S C T H S T N F N D F L K G L R K A
 ACTACACCTGGTGATTCGAAATATCACGAAAAGCTGATCTTGGTTGTGTTTCGACTTAAAA
 T T P G D S K Y H E K L I L V V F D L K
 ACTGGTAGCCTTTACGACAACCAAGCCTACGACGCAGGAACGAAATTTGGCGAAAAATCCT
 T G S L Y D N Q A Y D A G T K L A K N L
 CTCCAACATTACTGGAACAATGGCAACAATGGTGGAAGAGCATAACATAACTATCCATA
 L Q H Y W N N G N N G G R A Y I I L S I
 CCAAACCTGAACATTATAAACTCATAACAGGATTTAAAGAAACACTTAAAAACGAAGGA
 P N L N H Y K L I T G F K E T L K N E G
 CATGAAGAGTTGTTGGAAAAAGTTGGACATGACTTCTCTGGAACGACGACATCAGTGAT
 H E E L L E K V G H D F S G N D D I S D
 GTTCAGAAAACTTACAATAAAAGCCGGAGTAACAGGTCATGTGTGGCAGAGCGACGGCATT
 V Q K T Y N K A G V T G H V W Q S D G I
 ACCAACTGTTTATTGCGTGGTCTTACTCGTGTAAAGGCAGCTGTGGCAAACAGAGACTCC
 T N C L L R G L T R V K A A V A N R D S
 GGAAGCGGGATCATTAACAAAGTGTACTATTGGACAGTGGACAAACGCGCAACAACAAGA
 G S G I I N K V Y Y W T V D K R A T T R
 GATTCACTTGATGCTAAAAGTTGACGGCGTAATGACCAATTACCCGGATGTCATTGTTGAT
 D S L D A K V D G V M T N Y P D V I V D
 GTCCTCAATGAAGACGCTTACAAGATAAAATTCAGGGTCGCCACATACGAGGACAATCCT
 V L N E D A Y K N K F R V A T Y E D N P
 TGGGAAACTTTCAAGGAATAA
 W E T F K E -

ATTATGTAGGTTGATTCGTGCCAGTACACGATGACTCTGATTTCTTAGTTTACATAGGACTTTGTTAAAACAGTTTGGTGTGTTGAAATAAAAAAAAAATAT
 GATGCTCAATGGAACCTGTTTCTGTAGTTTACTAGATTTTTGTGGAAAAATATTTTTTGGAGAATAAAAAATTCAGTCATAAAAAATTCGCGTTGTCATTCT
 TTGCAAAATCAAGTTGAAATAACATTTACACATCTCAAAATGACCATATCTGAATTATGTTTCACTCTTTCAGATTAATGCGAAATATTTCTCCCTTGATAT
 CAGGGTTAGCGAGAAATAAGTTACCTACTTCAGAGAGCTCAGGAGATCGTTGTACTTCTCCAATGAGACAAACTTTATAACAACAGATAATTTGAATGATG
 CGCTTGTCATTTAGTTAATAAACATTTTAAGTACCCAAATTCACCTATATATGGCACTGGAGCACGCATATAAATATAGAATGTGCTTAACATAAACATAT
 TCAACATGCAGCACTAAATCTGCTCAGAATTTAGCCCTTCAAATGAAACAATGTGCTCTAATCACAAAACCAATTGGCATTGTCACAGTTGCAACGGGGCT
 TTGTTTATATATATGATGATGAT
 CCTGTGATGTAAGTTGCATTCGATTGCATTATATACATATACCAGCAATGAAAGTTTTAAAAACAG

Loxtox s1B

GGGAACGTGCGGATAAACGGGGGGACATTGCTCTTTTCGAGTTACCAACTCCACCATC

ATGTTGCTGCACATTGCCTTAATTCTAAGTTGTTGGAGCGCCCTATCTGAAGGAACCCAA
M L L H I A L I L S C W S A L S E G T Q
ACAGATGTTGAGGAACGTGCAGATAACCGTCGTCCCATATGGATTATGGGCCACATGGTC
T D V E E R A D N R R P I W I M G H M V
AACAACCTCAAACAGATAGACGAATTTGTGAACCTCGGATCGAATGCCATCGAAACAGAC
N N L K Q I D E F V N L G S N A I E T D
GTGTCTTTGATAAGCAAGCTAATCCTGAATACACATACCATGGGATTCCTTGGCATTGC
V S F D K Q A N P E Y T Y H G I P C D C
GGAAGGTCTTGCATTTCGACGAACTTCAATGATTTCCCTGAAAGGTCTACGAAAGGCC
G R S C T H S T N F N D F L K G L R K A
ACTACACCTGGTGATTTCGAAATATCACGAAAAGCTGATCTTGGTTGTGTTTCGACTTAAAA
T T P G D S K Y H E K L I L V V F D L K
ACTGGTAGCCTTTACGACAACCAAGCCTACGACGCAGGAACGAAATTTGGCGAAAAATCCTT
T G S L Y D N Q A Y D A G T K L A K N L
CTACAACATTACTGGAACAATGGCAACAATGGTGGAAAGAGCATAACATAACTATCCATT
L Q H Y W N N G N N G G R A Y I I L S I
CCAAACCTTAATCATTATAAACTCATAACAGGATTTCAACAAACACTCAAAGACGAAGGA
P N L N H Y K L I T G F Q Q T L K D E G
CATGAAGAGTTGTTGGATAAAGTCGGATATGACTTCTCTGGAAACGACGACATCAGCGAT
H E E L L D K V G Y D F S G N D D I S D
GTTTCAGAAAACCTTACAATAAAGCCGGAGTAACAGGTCATGTGTGGCAGAGCGACGGTATC
V Q K T Y N K A G V T G H V W Q S D G I
ACCAACTGTTTACTGCGTACTCTTACTCGTGTAAGGCAGCTGTAGCAAACAGAGACTCC
T N C L L R T L T R V K A A V A N R D S
GGAAGCGGGATCATTAAACAAAGTGTACTATTGGACAGTGGACAAACCGCGCAACAACAAGA
G S G I I N K V Y Y W T V D K R A T T R
GATTCACTTGATGCTAAAGTTGACGGCGTAATGACCAATTACCCGGATGTCATTGTTGAT
D S L D A K V D G V M T N Y P D V I V D
GTCCTCAATGAAGACGCTTACAAGAATAAATTCAGGGTCGCCACATACGAGGACAATCCTT
V L N E D A Y K N K F R V A T Y E D N P
TGGGAAACTTTCAAGGAATAA
W E T F K E -

ATTATGTAGGTTGATTCTGTGCCAGTACACGATGACTCTGATTTCTTAGTTTACATAGGACTTTGTTAAAACAGTTTGGTGTGTTGAAATAAAAAAATAT
GATGCTCAATGGAACCTGTTTCTGTAGTTTACTAGATTTTGTGGAAAAATTATTTTTGGAGAATAAAAAATTCAGTCATAAAATTCGCGTTGTCAATTCT
TTGCAAAATCAAGTTGAAATAACATTTACACATCTCAAATGACCATATCTGAATTATGTTTCACTCTTCAGATTAATTCGCAAAATATTTCTCCCTGATAT
CAGGGTTAGCGAGAAATAAGTTACTACTTCAGAGAGCTCAGGAGATCGTTGTACTTCTCCAAATGAGACAAACTTTATAACAACAGATAATTTGAATGATG
CGCTTGTCATTTAGTTAATAAACATTTTAAAGTACCCAAATTCACCTATATATGGCACTGGAGCACGCATATAAATATAGAATGTGCTTAACATAAACATAT
TCAAATGCAGCACTAAATCTGCTCAGAATTTAGCCCTTCAAATGAAACAATGTGCTTAATCACAAAACCATTTGGCATTGTTGCACAGTTGCAACGGGGCT
TTGTTTATATATGATGTAT
CCTGTGTATGTAAGTTGCATTTCGATTGCATTATATACATATACCAGCAATTGAAAGTTTTAAAAACAG

Loxtox s1C

ACATAAACATCTTTTCGAGATGTTGAAGAAATATGTGTCCATTTCTCAAAGAATAATATAAATAAGCTGATATATATAAATTTGGGTTGCATTGCTCTTTTCG
AGTTAACAACCTCCACCGTC

ATGCTGCTGCACATTGCCTTAATTCTAAGTTGTTGGAGCGCCCTATCTGAAGGAACCCAA
M L L H I A L I L S C W S A L S E G T Q
ACAGATGTTGAGGAACGTGCAGATAACCGTCGTCCCATATGGATTATGGGCCACATGGTC
T D V E E R A D N R R P I W I M G H M V
AACAACCTCAAACAGATAGACGAATTTGTGAACCTCGGATCGAATGCCATCGAATCAGAC
N N L K Q I D E F V N L G S N A I E S D
GTGTCTTTGATAAGAAAAGCTAATCCTGAATACACATACCACGGAATCCATGCGATTGT
V S F D K K A N P E Y T Y H G T P C D C
GGAAGGGATTGTCTTCGATGGGAATATTTCAACGAATTCGTAAAGGGTCTGCGAAGAGCC
G R D C L R W E Y F N E F V K G L R R A
ACAACACCTGGTGATTCCAAATATCATGAAAACTGGTCTTAGTTGTGTTTCGACTTAAAA
T T P G D S K Y H E K L V L V V F D L K
ACTGGTAGCCTTACGACTATCAAGCCTCCGACGAGGAACTAAATTTGGCGAAAAAGTCTC
T G S L Y D Y Q A S D A G T K L A K S L T
CTACAAAATTAATGGAACAATGGCAACAATGGTGGAAAGAGCATAACATAACTATCCATT
L Q N Y W N N G N N G G R A Y I I L S I

CCAAACCTTAATCATTATAAACTCATAACAGGATTTCAACAAACACTCAAAGACGAAGGA
 P N L N H Y K L I T G F Q Q T L K D E G
 CATGAAGAGTTGTTGGATAAAGTCGGATATGACTTCTCTGGAAACGACGACATCAGCGAT
 H E E L L D K V G Y D F S G N D D I S D
 GTTCAGAAAACTTACAATAAAGCCGGAGTAACAGGTCATGTGTGGCAGAGCGACGGTATC
 V Q K T Y N K A G V T G H V W Q S D G I
 ACCAACTGTTTACTGCGTACTCTTACTCGTGTAAAGGCAGCTGTAGCAAACAGAGACTCC
 T N C L L R T L T R V K A A V A N R D S
 GGAAGCGGGATCATTAACAAAGTGTACTATTGGACAGTGGACAAACGCGCAACAACAAGA
 G S G I I N K V Y Y W T V D K R A T T R
 GATTCACTTGATGCTAAAAGTTGACGGCATAATGACCAATTACCCAGATGTCATTGCTGAT
 D S L D A K V D G I M T N Y P D V I A D
 GTCTCAACGAAGCCGCTTACAAGACGAAATTCAGGCTCGCCACATACGAGGACAATCCT
 V L N E A A Y K T K F R L A T Y E D N P
 TGGGAACTTTCAAGGAATAA
 W E T F K E -

ATTTTGCAGATTGATGATGTGCCAGCTCATGACGGCTCGGATTTCTCAGTTTACATAGAAGTTTGTAAAAAACTAAATTTATATTTAAAAATAAACTAG
 TGATGTTCCATGGGACGGCAGATGTCATTGCTGATGTCTCAACGAAGCCGCTTACAAGACGAAATTCAGGCTCGCCACA

Loxtox s1D

GCATCGGCTTCTCTCAAGTGCAGATGCTTTTTGGCGCATTTTCTGCAATTAGAACCCTCATATGACAATATGACATTGTGAATATAGAATCGCGTCATC
 TTGAGTTATCCGTGCTACTGTGTGACATAAACATCTTTTCGAGATGTTAGAAGAAAACCCAGAAAAATAACATTTGTCAAAGACAAATATAAATAACCT
 G

ATGTTTCATAACTGGGTTACATTCGCTCTTTTCGAGCTACCAACTCCACCATCATGTTGCTG
 M F I T G L H S L F R A T N S T I M L L
 CACATTGTCTTAGTTTTAAGTTGTTGGGGCGCCTTATCTGAAGGAACCGAAAACGATGTT
 H I V L V L S C W G A L S E G T E N D V
 GGGGAACGTGCAGATAAACGGCGGCTATTTGGATTATGGGTACATGGTCAATTCATC
 G E R A D K R R P I W I M G H M V N S I
 GCTCAGATAGACGAATTCGTAAACCTTGGATCAAATTCATTGAAACTGACGTGTCTTTT
 A Q I D E F V N L G S N S I E T D V S F
 GATGATAGTGCTAACCCCGAATACACATACCATGGTATTCCATGCGATTGTGGAAGGGCT
 D D S A N P E Y T Y H G I P C D C G R A
 TGCTTTCATTGGGAGTATTTCAATGATTTTCTAAAGGGTCTGCGGAAAGCCACAACACCT
 C L H W E Y F N D F L K G L R K A T T P
 GGTGATTCCAAATATCATAAAAACTGATCTTAGTTGTGTTGACTTAAAACTGGTAGC
 G D S K Y H K K L I L V V F D L K T G S
 CTCTACGACAATCAAGCCTACGACGCAGGAAAGAAATTTGGCGAAAAATCTCCTGAAACAT
 L Y D N Q A Y D A G K K L A K N L L K H
 TACTGGAACAATGCAATAATGGTGAAGAGCATATATAAATACTATCCATTCCAAACCTT
 Y W N N G N N G G R A Y I I L S I P N L
 AACCATTTAAAACTCATAACAGGATTTAAGGAAACACTTAAGAAAGAAGGACATGAAGAG
 N H Y K L I T G F K E T L K K E G H E E
 CTGCTGAAAAAAGTCGGAAGTACTTCTCTGGAAATGACGACATCAGCGATGTTTCAGAAA
 L L K K V G T D F S G N D D I S D V Q K
 ACTTATAAAAAAGCAGGAGTAACAGGTCACGTGTGGCAGAGTACGGTATCACCAACTGT
 T Y K K A G V T G H V W Q S D G I T N C
 TTATTGCGTGGTCTTACTCGTGTAAAGGCAGCTGTGGCAAACAGAGACTCCGGAAGCGGG
 L L R G L T R V K A A V A N R D S G S G
 ATCATTAACAAAGTGTACTATTGGACAGTGGACAAACGCGCAACAACAAGAGATTCACTT
 I I N K V Y Y W T V D K R A T T R D S L
 GATGCTAAAAGTTGACGGCATAATGACCAATTACCCGGATGTCATTACTGACGTCCTCAAC
 D A K V D G I M T N Y P D V I T D V L N
 GAAGCAGCTTACAAGAAGAAATTCAGGATCGCCACATACGAAGACAATCCTTGGGAAACG
 E A A A Y K K K F R I A T Y E D N P W E T
 TTCAAAGAATAA
 F K E -

ATTCTGTAGATTGATGGTGTGCCAGCACATGATGGCTCGGATTTTGCAGTTTACATAGAACTTTGTTAAAAAACTAATTTTATATTTGAAATAAACTA
GTGATGTTCCATGGAATTTACTTAATATAGTTTATCAGATTTGTGTAGAAAAAT

Loxtox s2A

CTTCTCTCAGGTGTAGGATTGTTTCTTACCTGCAGGCTCACTCTTGGAACACATGTGTGAGTACGTTTATGAATAAAGAAATGGGGCAAACCTTATGCAAAG
CAAAGGCATAACCATCTATCGCAGGTGTTCTATAAGTTCCATAACGTGTGAATCTGCACGGGAGTTATATAAATCACGAAATCCCTGTCCGACTTGCATT
CGTTTTACGGCTACCTCCACC

ATGTTTCTTCACATTGCCTTAAACCTTAGGGTGTGGAGCATCTTTTCTGAGGGTGCCGAA
M F L H I A L T L G C W S I F S E G A E
ACAGATGTTGCGGAACGAGTTGATACTCGCCGGCCTATATGGATCATGGGACACATGGTG
T D V A E R V D T R R P I W I M G H M V
AACAGCATTGGGCAGATCGACGAGTTTATGAGGCTTGGATCCAATTCCTCGAATTTGAT
N S I G Q I D E F M R L G S N S L E F D
ATAAACTTTGACAAGGATGCCAAACCTGTCTACACATACCACGGGGTCCCTTGGCATTGC
I N F D K D A K P V Y T Y H G V P C D C
TTCAGGAGTTGCCTGTATTGGGAATACATCGGCGACTATTTGACCGCCTTGGCAGAGCGC
F R S C L Y W E Y I G D Y L T A L R E R
ACAACACCTGGTAACCCAAAAGTATAGAGAGAACCTCAGTCTATTGGTCTTTGATCTGAAA
T T P G N P K Y R E N L S L L V F D L K
ACAAATAGTCTCTATGACTCGCAGGCTGCCGAAGCCGGTCGAAACTTGGCAGACGATATC
T N S L Y D S Q A A E A G R N L A D D I
TTTAAGTATTACTGGAACGAAGGTAACAACGGTGAAGAGCATATATGATAATATCAATA
F K Y Y W N E G N N G G R A Y M I I S I
CCCAATCTCGAACACTATGACTTAATAACGGCATTAAACATAAGTTCACAAGCAATGGA
P N L E H Y D L I T A F K H K F T S N G
CATGAAGATCTACTGGATTATGTTGGATTTGATTTCTCTGCTAACGACAATATCCCAGAT
H E D L L D Y V G F D F S A N D N I P D
GTCGAGAGAGTGTTCGAAAAAGTCAAAGTCTCAGGTGTACCAGACCGAGTGTGGCAGAGT
V E R V F E K V K V S G V P D R V W Q S
GACGGTATCACTAACTGCATAGCACGGAGTCTCGATCGTGTGAAAGAAGCTGTAAAAGAG
D G I T N C I A R S L D R V K E A V K E
AGAGATGCTGGTGGATCATAAACAAAATCTACGTTTGGACTTTGGACAAGGTTTCGTCT
R D A G G I I N K I Y V W T L D K V S S
ATCAAAGAGGCACTTGACGCTGGTGTGATGGAGTAATGACCAACCACCCCGATGTTGTT
I K E A L D A G V D G V M T N H P D V V
GTTGGTGTCTAAGGGAAGATGCTTACAAAACGAAATTCAGGTACGCCAGCTACAGTGAT
V G V L R E D A Y K T K F R Y A S Y S D
AACCTTGGGAAACCTTCAAGGCGGAATAA
N P W E T F K A E -

AGCACTTTTTCAGGTGATGGTGTGGGAAGAATTAACGATGCGGATCTCTCTAAACGTTTATAAAAAGTTTTTCATATAACCATTATAGATATAGAACTGTGTT
TCGGCGCCATTGCAGAACTATACGCAAAATTTAGTCGAAATGTAAGATATTATGCTTAGTAACATAATTTGAATTATGTAATCATGACGACCAATACTCT
GTGAAAACACGAAATCCCTCAGCTGTTAAACCATGCATTTGTTAAATTTTATATTTGTTTACAAATTTCTGTGGTTCGTAATAAAGTGTCAACCAAGCAA
AAAAAAAAAAGGA

Loxtox s2B

CTTCTCTCAGGTGTAGGATTGTTTCTTACCTGCAGGCTCACTCTTGGAACACATGTGTGAGTACGTTTATGAATAAAGAAATGGGGCAAACCTTATGCAAAG
CAAAGGCATAACCATCTATCGCAGGTGTTCTATAAGTTCCATAACGTGTGAATCTGCACGGGAGTTATATAAATCACGAAATCCCTGTCCGACTTGCATT
CGTTTTACGGCTACCTCCACC

ATGTTTCTTCACATTGCCTTAAACCTTAGGGTGTGGAGCATCTTTTCTGAGGGTGCCGAA
M F L H I A L T L G C W S I F S E G A E
ACAGATGTTGCGGAACGAGATGATACTCGCCGGCCTATATGGATCATGGGACACATGGTG
T D V A E R D D T R R P I W I M G H M V
AACAGCATTGGGCAGATCGACGAGTTTATGAGGCTTGGATCCAATTCCTCGAATTTGAT
N S I G Q I D E F M R L G S N S L E F D
ATAAACTTTGACAAGGATGCCAAACCTGTCTACACATACCACGGGGTCCCTTGGCATTGC
I N F D K D A K P V Y T Y H G V P C D C

TTCAGGAGTTGCCTGTATTGGGAATACATCGGCGACTATTTGACCGCCTTGCGAGAGCGC
 F R S C L Y W E Y I G D Y L T A L R E R
 ACAACACCTGGTAACCCAAAAGTATAGAGAGAACCTCAGTCTATTGGTCTTTGATCTGAAA
 T T P G N P K Y R E N L S L L V F D L K
 ACAAATAGTCTCTATGACTCGCAGGCTGCCGAAGCCGGTCGAAACTTGGCAGACGATATC
 T N S L Y D S Q A A E A G R N L A D D I
 TTTAAGTATTACTGGAACGAAGGTAACAACGGTGGAAAGAGCATATATGATAATATCAATA
 F K Y Y W N E G N N G G R A Y M I I S I
 CCCAATCTCGAACACTATGACTTAATAACGGCATTAAACATAAGTTCACAAGCAATGGA
 P N L E H Y D L I T A F K H K F T S N G
 CATGAAGATCTACTGGATTATGTTGGATTTGATTTCTCTGCTAACGACAATATCCCAGAT
 H E D L L D Y V G F D F S A N D N I P D
 GTCGAGAGAGTGTTCGAAAAAGTCAAAGTCTCAGGTGTACCAGACCGAGTGTGGCAGAGT
 V E R V F E K V K V S G V P D R V W Q S
 GACGGTATCACTAACTGCATAGCACGGAGTCTCGATCGTGTGAAAGAAGCTGTAAAAGAG
 D G I T N C I A R S L D R V K E A V K E
 AGAGATGCTGGTGGGATCATAAACAAAATCTACGTTTGGACTTTGGACAAGGTTTCGTCT
 R D A G G I I N K I Y V W T L D K V S S
 ATCAAAGAGGCCTTGACGCTGGTGTGATGGAGTAATGACCAACCACCCCGATGTTGTT
 I K E A L D A G V D G V M T N H P D V V
 GTTGGTGTCTAAGGGAAGATGCTTACAAAACGAAATTCAGGTACGCCAGCTACAGTGAT
 V G V L R E D A Y K T K F R Y A S Y S D
 AACCTTGGGAAACCTTCAAGGCGGAATAA
 N P W E T F K A E -

AGCACTTTTCAGGTCGATGGTCTGGGAAGAATTAACGATCGGATCTCTCTAAACGTTTATAAAAAGTTTTTCATATACCATTATAGATATAGAAGTGTGTT
 TCGGCGCCATTGCAGAACTATACGAAAATTTAGTCGAAATGTAAGATATTATGCTTAGTAACATAATTTGAATTATGTAATCATGACGACCAATACTCT
 GTGAAAACAGGAAATCTCCAGCTGTTAAACCATGCATTTGTTAAATTTTATATTTGTTTACAAATTTCTGTGGTCCGTAATAAAGTGTCAACCAAGCAAA
 AAAAAAAAAAAGGA

Loxtox s2C

CTTCTCTCAGGTGTAGGATTGTTTCTTACCTGCAGGCTCACTCTTGGAACACATGTGTGTCAGTAGCGTTATGAATAAAGAAATGGGGCAAACCTTATGCAAAG
 CAAAGGCATAACCATCTATCGCAGGTGTTCTATAAGTTCCTAATACGTGTGAATCTGCACGGGAGTTATATAAATCACGAAATCCCTGTCCGACTTGCATT
 CGTTTTACGGCTACCTCCACC

ATGTTTCTTCACATTGCCTTAACCTTAGGGTGTGGAGCATCTTTTCTGAGGGTGCCGAA
 M F L H I A L T L G C W S I F S E G A E
 ACAGATGTTGCGGAACGAGATGATACTCGCCGGCCTATATGGATCATGGGACACATGGTG
 T D V A E R D D T R R P I W I M G H M V
 AACAGCATTGGGCAGATCGACGAGTTTATGAGGCTTGGATCCAATTCCTCGAATTTGAT
 N S I G Q I D E F M R L G S N S L E F D
 ATAAACTTTGACAAGGATGCCAAACCTGTCTACACATACCACGGGGTCCCTTGGCATTGC
 I N F D K D A K P V Y T Y H G V P C D C
 TTCAGGAGTTGCCTGTATTGGGAATACATCGGCGACTATTTGACCGCCTTGCGAGAGCGC
 F R S C L Y W E Y I G D Y L T A L R E R
 ACAACACCTGGTAACCCAAAAGTATAGAGAGAACCTCAGTCTATTGGTCTTTGATCTGAAA
 T T P G N P K Y R E N L S L L V F D L K
 ACAAATAGTCTCTATGACTCGCAGGCTGCCGAAGCCGGTCGAAACTTGGCAGACGATATC
 T N S L Y D S Q A A E A G R N L A D D I
 TTTAAGTATTACTGGAACGAAGGTAACAACGGTGGAAAGAGCATATATGATAATATCAATA
 F K Y Y W N E G N N G G R A Y M I I S I
 CCCAATCTCGAACACTATGACTTAATAACGGCATTAAACATAAGTTCACAAGCAATGGA
 P N L E H Y D L I T A F K H K F T S N G
 CATGAAGATCTACTGGATTATGTTGGATTTGATTTCTCTGCTAACGACAATATCCCAGAT
 H E D L L D Y V G F D F S A N D N I P D
 GTCGAGAGAGTGTTCGAAAAAGTCAAAGTCTCAGGTGTACCAGACCGAGTGTGGCAGAGT
 V E R V F E K V K V S G V P D R V W Q S
 GACGGTATCACTAACTGCATAGCACGGAGTCTCGATCGTGTGAAAGAAGCTGTAAAAGAG
 D G I T N C I A R S L D R V K E A V K E
 AGAGATGCTGGTGGGATCATAAACAAAATCTACGTTTGGACTTTGGACAAGGTTTCGTCT
 R D A G G I I N K I Y V W T L D K V S S

ATCAAAGAGGCACTTGACGCTGGTGTGATGGAGTAATGACCAACCACCCCGATGTTGTT
 I K E A L D A G V D G V M T N H P D V V
 GTTGGTGTCTAAGGGAAGATGCTTACAAAACGAAATTCAGGTACGCCAGCTACAGTGAT
 V G V L R E D A Y K T K F R Y A S Y S D
 AACCCCTTGGGAAACCTTCAAGGCGGAATAA
 N P W E T F K A E -

AGCACTTTTCAGGTCGATGGTCTGGGAAGAATTAACGATGCGGATCTCTAAACGTTTATAAAAGTTTTTCATATACCATTATAGATATAGAAGTGTGTT
 TCGGCGCCATTGCAGAATAACGAAAATTTAGTCGAAATGTAAGATATTATGCTTAGTAACTAATTTGAATTATGTAATCATGACGACCAATACTCT
 GTGAAAACACGAAATCCTCCAGCTGTTAAACCATGCATTTGTTAAATTTATATTTGTTTACAAATTCCTGTGGTCGGTAATAAAGTGTCAACCAAGCAAA
 AAAAAAAAAAAGGA

Loxtox s3A

c

ATGTTACTTCATGTTGTCTTAATCTTAGGGTGTGGAGCATCTTATCAGAGGGGGCCGAA
 M L L H V V L I L G C W S I L S E G A E
 AATGACGTAGCGGAACGCGACGATGACAAGCGTCTTATATGGAATATGGCCACATGGTG
 N D V A E R D D D K R P I W N M A H M V
 AATTCCATTGCACAGATACAGGAATTCGTGGCTCTCGGAGCAAATTCATCGAAACGGAC
 N S I A Q I Q E F V A L G A N S I E T D
 ATCTCCTTCGATAAGAACGCTGACCCGGAATACACGTTCCATGGCGTTCCTTGGCGACTGC
 I S F D K N A D P E Y T F H G V P C D C
 TTCAGAACTGCATGAACCTGGGAACATGCCACTCATTTCTTTGAAGGTCTCCGTAATGCA
 F R N C M N W E H A T H F F E G L R N A
 ACATTACCCGGTAATCCAAAATTTAAAGAACGGTTAGTCCTTGTGTTGATTTCGACTTAAAA
 T L P G N P K F K E R L V L V V F D L K
 TCTAATGGTCTTCAACACGATGAGCAAGCCTACGACGCTGGGAAAAGACTGGCGATAAAG
 S N G L Q H D E Q A Y D A G K R L A I K
 CTGCTGAGGCATTATTGGAACCTTTGGTGAAGATGGTGGAAAGAGCATAACATAGTACTGTGC
 L L R H Y W N F G E D G G R A Y I V L S
 GTACCACTAGTCAAGCATTACAACTATTTCTAGGATTTAGAGATACCATGTTTAACTTA
 V P L V K H Y K L F L G F R D T M F N L
 GGGCATGAAAAATTAATGGAAAAAGTAGGACATGATTTCTCCGGTAATGACGACATAAGC
 G H E K L M E K V G H D F S G N D D I S
 GATATTGTAGAAGGTTACAGCAGAGCCGAAGTAACGGAACACATCTGGCAATCCGACGGT
 D I V E G Y S R A E V T E H I W Q S D G
 ATCACAACCTGCATATACCGTGGTTACGATCGAATAAAACAATGTGTGAATGCGAGGGAT
 I T N C I Y R G Y D R I K Q C V N A R D
 TCTGGAACCTGATCAACAAAGTATATTTCTGGACCGCAGACAAAGCTTCAACGATCCGG
 S G N L I N K V Y F W T A D K A S T I R
 GGTGCACTAGATGAGGCGTTGATGGTATAATGACAAATCATCCGAATAACGTTAATGAT
 G A L D E G V D G I M T N H P N N V N D
 GTCTCAAGGAAGATGCTTACAGCAGCAAATTTAGATATGCAAATATCGACGACAACCC
 V L K E D A Y S S K F R Y A N I D D N P
 TGGCTGACCATCAAGAAATAA
 W L T I K K -

AACGCCTCTGCATGTCGTATTCCAGTGAGTATTCGACATGCAGAGCGGATTTATTTCTTGTATGGTCAGCCAGGGGTTGTCGTGATATTTGCATATCTAA
 ATTTGCTGCTGAAGCATCTTCCCTTGAGGACATCATTAACGTTATTCGGATGATTTGTTCATTATACCATCAACGCCCTCATCTAGTGCA

Loxtox s4A

AGAGTGTGACAGCACCATCGTTTTGCACGTATAGGTGCAACATGTTCTTACAAAATGACATTTATGAACTACTATATAAAGTCATGGATTCTACACAACAT
 TATAGCTGAAGAAAAGCATTTCGCTC

ATGCTGTGTGCTATTGCTTTAATTTTTTGTCTTCTGGGCCACCGGGCTAGAGGGTGCAGAA
 M L C A I A L I F C F W A T G L E G A E
 ACGGAAGTTATGAGCGCGCAGATCGGCGCCGCAATATGGAACATGGGGCACATGGTA
 T E V M E R A D R R R P I W N M G H M V

AACGAAATCTACCAAATGACGAATTTGTCGACCTTGGAGCTAATTCATCGAAACAGAT
 N E I Y Q I D E F V D L G A N S I E T D
 ATAACATTTGGCGACGATGCTATGGCAGAATATTCATTCCACGGAGTCCCTTGGCGACTGC
 I T F G D D A M A E Y S F H G V P C D C
 AGAAGATGGTGCCACAAGTGGGAATATGTTAACACATTTTTGGAAGGATTGCGACGAGCT
 R R W C H K W E Y V N T F L E G L R R A
 ACAACCCCTGGTGATTCCAAGTATCGCAAAGAACTGATCTTAGTTGTCTTCGATTTGAAA
 T T P G D S K Y R K E L I L V V F D L K
 ACTGGTGATCTTCTTCCAGTGCCTACAAAGGTGGAAGGTTGTTTCGCAGAGAAGCTC
 T G D L S S S S A Y K G G R L F A E K L
 CTGAGGCATTACTGGAATGGAGGAAGTAATGGTGGGAGAGCATATATTATAATATCAATC
 L R H Y W N G G S N G G R A Y I I I S I
 CCAGATATAGATCACCATGCGTTTTATATTAGGATTCAGAGACTTCCCTTGCAAAGTCCGGC
 P D I D H H A F I L G F R D F L A K S G
 CATGAAGACCTTCTTGCAAAAAGTAGGCTATGACTTCTCCGGTAATGATGACCTGAACCAG
 H E D L L A K V G Y D F S G N D D L N Q
 ATTCGCACAGCTTTCATATAAAGGCGGAGTGGGAGATAGGGAGCACGTGTGGCAAAGTGAT
 I R T A L H K G G V G D R E H V W Q S D
 GGTATCACCAACTGTATTTTACGAAGTCTCGATCGAGTAAATAAAGCCGTCAGCAACCGA
 G I T N C I L R S L D R V N K A V S N R
 GATTCTACAAACGGTTATATTAACAAAGTTTACTATTGGACTATAGAAAGATACGTGTCA
 D S T N G Y I N K V Y Y W T I E R Y V S
 GTCAGAGACGCTCTTGACGCTGAAGTTGACGGCATCATGACTAACTATCCAGACGTCATT
 V R D A L D A E V D G I M T N Y P D V I
 GTTAATGTCTAAAGGAAAAACAACCTACAAAAACAGGTTCAAGATGGCAAACCTACGAAGAC
 V N V L K E N N Y K N R F K M A T Y E D
 AACCCATGGGTCTTTTCAAGAGATAA
 N P W V L F K R -

AAAAGTGGAAAAACGCTTCTTATATACTTAGTTGGCGCCTCCATGGGAACTTCGAACTCAGCTGTTAAAGAAATGTGAATACTCCATATGGAATAACA
 CCATATCAAAAAGAACTGACTGAAATGGCGTCAGTGTGTTGATGAAAACAATTATATATATATACATATATAGCTTTTTTAAATATATAAGAACGC
 ATTTTGCTTTTTCCAGGATTAATTTCCATTTTCAAATTTGATTTCATATGCTACGCACCTAGAAATATTATAACGATTAATAATTTGTTTCGAAATGTAA
 AGTTTACATTTCTATACTAATTTTCTTCTATGAGTTATACTAGACAAAGATATGCAGCAAATTTGCAATTTGTACATAAGTTGCTATTAAATGCTATGTTT
 GAAATGACCCACAATAAATGTCTTGAATCTTGAAAAAGCTATATATGTATATATA

Loxtox s5A

GAAGCGGATATTGTTACGCGAGAGGCTAGCCTAGAACTCCAATTTTCGTC

ATGTACGTTTCATCTCGCGTTAATCTTAGGATGTTGGACAATAATCTTACAGGGGTCCGAA
 M Y V H L A L I L G C W T I I L Q G S E
 GCGGATATTGTTACGCGAGCAGATAATCGTCGTCCTCAATTTGGAACATGGGACACATGGTT
 A D I V Q R A D N R R P I W N M G H M V
 AATGCTGTAGCTCAAATAAATACATTTTTGGACCTTGGTTCAAACGCGCTAGAAATGGAT
 N A V A Q I N T F L D L G S N A L E M D
 ATAACCTTTTAAACAAACAAGCGATGCCTGTATACACTTACCATGGAACCCCTTGGGATTGC
 I T F N K Q A M P V Y T Y H G T P C D C
 CTCAGGGACTGCCTGAGATGGGAATATTTTTCCACGTTTGTCCAGGAACCTAAGACAACGG
 L R D C L R W E Y F S T F V Q E L R Q R
 ACCACACCAGGAGATGCAAAAATATCGCCAACAGTTGATCTTACTTATTTTTCGATTTGAAA
 T T P G D A K Y R Q Q L I L L I F D L K
 ACGGGTAGTATTAATAACAACCAAGCACGCACCGCTGGAATAAATATGGCGCAGCAACTC
 T G S I N N N Q A R T A G I N M A Q Q L
 TTGCAACATTACTGGAACAACGGTAATAATGGTGGGAAGGGCGTACATAGTATTGTCAATT
 L Q H Y W N N G N N G G R A Y I V L S I
 CCATATCTCGAACATTACGAATTTGTAAGAGGATTTCAGGGACACACTTAGAGGAGAAGGC
 P Y L E H Y E L V R G F R D T L R G E G
 CAAGAGAGATTATTGGAAGAAAGTAGGATACGATTTCTCTGGGAGACACCAACTGAGTTCA
 Q E R L L E K V G Y D F S G R H Q L S S
 ATTTGGCGAAGCCTACAAGAAAGCTGGAGTAAACGGTCATGTCTGGCAAAGTGATGGCATT
 I G E A Y K K A G V N G H V W Q S D G I
 ACGAATTTGTTGCCACTTGTAGATGATCTTCTCGAGTAAGAGAAGCTGTGAGAAATAGG

T N C L P L V D D L P R V R E A V R N R
 GATTCGTCAAATGGGTTTATTAACAAAGTTTACTATTGGACTGTAGACAAAGTTTCAACA
 D S S N G F I N K V Y Y W T V D K V S T
 ACGAAGAAGGCACTCAGTGTGGCGTTGATGGAATAATGACTAACAAGCCAAGCGTTATC
 T K K A L S A G V D G I M T N K P S V I
 GTTGACGTCTCAACGAAAGCGGGATCAGGGATAAAATAGACTGGCAACGTACGAGGAC
 V D V L N E S G I R D K Y R L A T Y E D
 AATCCATGGGAAACATTCAGAAATTAA
 N P W E T F R N -

CAACAGGTGGAGTCTACGTGCATATGAAAACTTAGAGAAACAAGTTTATAGAAGGACTTGAGGCTGCACCTTCTTTTAAATATCATTATGGATCTTA
 TGGCATATATTTATAGAGGCGATAAATTATGTGGTTGATAGCACAGAAGTAAACTTGTACTCCATCCGAATGCCTATGTTTCGTGCATGCTCTCTATGCGGA
 ATATTTATGAATAATGTCAAATTTATAACAAATGTTTACAATATCTGCTTTTGTGTAATAGAGATGAAAAATTTATCATGTTTTCCAAATGTTTCAAATA
 ATGCTGATTTGTCGTAACGCTTTATGCTTCAATATTTAATATTTCAAAATATATTGCTCTCACAGTTATACCTGATGATGTCATACACTAGGCAATATT
 GCCTCTCGTTTGACATTTCAAGTGATTTAAAAATATCGATGATTGAAACAGTTCTTC

Loxtox s6A

GAGTGAACACTTGTCTGATATTAGTTTGTGGTTTGAGTTATAAAAAACAGACACGTCAGTAAACAGGCTAAATTTAGTGGATTATATCTTTGATTGAT

ATGCTGCTTAAGTATCTTCTATTCCTGGCATTGGCATCATTATATCACAGGTAGCTGCA
 M L L K Y L L F L A F G I I I S Q V A A
 TCTGCTCCTTATAATGCCACCAATGATCTGAAACCTATATGGATTATGGGACACATGGTG
 S A P Y N A T N D L K P I W I M G H M V
 AATGCTATTAGTCAGATCAAAGAGTTTTTGAACCTCGGCGCAAATTTCTCTCGAGTTCGAT
 N A I S Q I K E F L N L G A N S L E F D
 ATAGCCTTTGACTCGCAAGCGAAGGCGCAATACACTTACCACAAAATGCCATGCGACTGC
 I A F D S Q A K A Q Y T Y H K M P C D C
 TTCAGAGTATGCGCAAGTGGGAGTACATTTCAAGTTATCTGAGTGAGATCAGAGAAGTC
 F R V C A K W E Y I S S Y L S E I R E V
 ACAACGCTGGTAACCCCTAAGTTAAGCACAGATTTAATACTTCTCATACTGGATTTAAAA
 T T P G N P K L S T D L I L L I L D L K
 ATTGACTGGATGTCTGGTGGGCGAGTCATATGTTGCAGGAGGAGACATGGCTTCAAACCTT
 I D W M S G G Q S Y V A G G D M A S K L
 CTCGATTACTACTGGCAAAAGAAAAATGACTAGTGGCAGGGCATATATCGTTTTGTCCATA
 L D Y Y W Q R K M T S G R A Y I V L S I
 CCAGCATTAATAAATACGGATTTATTCGAGGCTTCAGGAAAAGCTTCAATCTGAAGGA
 P D I K N Y G F I R G F R E K L Q S E G
 TACTTTGATCAATATAAGGACAAGATAGGATACGACTTTTTCAGGAAATGAGCATCTGAGT
 Y F D Q Y K D K I G Y D F S G N E H L S
 TCAATCCGCAAAGCACTCCAACGTGCTGGTGAACATGTTTGGCAAAGCGATGGC
 S I R K A L Q R A G V T E H V W Q S D G
 GTTAGCAACTGTTTTGCGAGAAGCACAGCTAGATTAAAAAAAGCGTTGAGAAACAGAGAT
 V S N C F A R S T A R L K K A L R N R D
 TCCCCGGAGGATACATCAATAAGATATACTATTGGACTGTGGATAAATACAGTACAATG
 S P G G Y I N K I Y Y W T V D K Y S T M
 AGAAAAGCAATCAGTTTGGGAGTGGACGGTGTGATGACCAACCATCCGAATCGTGCTAAC
 R K A I S L G V D G V M T N H P N R A N
 TTCGTCCTTGGTGAAGGAGCATTTAGAGATAAATTCAGACCAGCTTATTACGAAGATATT
 F V L G E G A F R D K F R P A Y Y E D I
 CCGTGGTGA
 P W -

CCAAATAATAAAGTGGTTCCTGTTGAAACCCCTGTTTCATGAACTTTTGCAGCTTCTCACAGCCAGTTTTTAAGAGCTGAAGTTGTCATGTGATA
 ACAGCAACGAAATCTAAAGAGAAACTAGAAAACAGCGGTTCTGAAATGTCAGTTTGCCGAGTTAATAAGACTTTCAATGAAATTTCTAGCCAGTTTGTGT
 CAAACATTTGTTTTAAAAATTTGTAACATATTACGTAACCTTATATATTTGTTGTGTAATGAATACATATGTACTCTCACTAATTGACAAGTGTCAA
 ACTCATATTACTTCTCCTCGTTATTTAGAAGTGTATTAGCAGGAATTTGTATTTCGTTTCAATTCATTAATAAATAAAAAATAGTGTACAGTGTGTTATCA
 ATGGTAAACACATGATATTTAATGTACATAACAAAACAATGTTGTTAAGTTTCTTATCTGACCCCTGAAATAAAT

Loxtox s7A

GACAGGGATACAATGAACACTTTTTGCAGCTGTTGCAGAAGACTTGTGTCTAGGCTCCACACCGTTAATCTGTAGGAGAATATATATATACGTATTCTTG
 ATTTGTAAC TGAGACTATACATTTTGTAGCTGAGAAATAATTTTGGC

ATGTTATTTCTTGTCTTTAGAACATTATGCTGCTGGATTCTTATACTACAGGGCGCAGAA
 M L F L V F R T L C C W I L I L Q G A E
 GCAGATGTTAGTAAAATGGGAGAAAATCGTCTCCAATATGGAACATTGCACGAACAGTG
 A D V S E M G E N R R P I W N I A R T V
 AATGCCGAATACCAATCGACATGTTTTGGAGGACGATGCAAATCCCATCGGAATCGCC
 N A E Y P I D M F L E D D A N P I G I A
 GAATTCCTAGATTTCTGGGGCAAATGCTCTCCAAATCGAGGTAATGTTCTGACTCGTCTGGGG
 E F L D F G A N A L Q I E V M F D S S G
 ACTGCTCAATCTGTCTCCCGCAAATCTCCTTGTGACTGCAGCAGGACGTGTGTCAAGTGG
 T A Q S V S R K S P C D C S R T C V K W
 ATTGACTTCAGTTATTATTTGGATGACTTACGACATTTACCACACCAGACGATTCATG
 I D F S Y Y L D D L R H F T T P D D S M
 TTTTCGAGAAGAATTAGTTCTAATTGTGTTGGACTTGAAAGTTAGTACTTTAATCCCAGC
 F R E E L V L I V L D L K V S D F N P S
 CTATCTTTCAAAGCTGGGAAAGACTTGGGCGAGAAACTTTTAGATCATTACTGGCAAAG
 L S F T K A G K D L A Q K L L D H Y W Q K
 GAAAGTAGCGGTGCAAGAGCATAATGCTGTCTGTCCCAAGTACAAAAAATGCAGCG
 E S S G A R A Y I L L S V P S T K N A A
 TTAATTAGAGCTTTCAACCTTACACTTCAAAAAGGAGAATTTGCATTCCTTTGGAGAGAAA
 L I R A F N L T L Q K G E F A F F G E K
 GTAGGAATAGACATTTCCGGAGACGATGACTTGTCTCCGTTAGACGTATTGTAGAACGA
 V G I D I S G D D D L F S V R R I V E R
 CTGGGCATGACTGGATGGCATGTGTGGCAAAGTGACGTCATCACCACACTGTTTATTACGC
 L G M T G W H V W Q S D V I T N C L L R
 GAGAAAAGCCAATTGCGTGAAGCTGTGGAAGAACGAGATTCACAAGGTTATATGAACAAA
 E K S Q L R E A V E E R D S Q G Y M N K
 GTGTACTCTAACTGCAGACAGACATGCGACAATCAGAAATGCATTAAGAGCTGGCGTT
 V Y T L T A D R H A T I R N A L R A G V
 GACGGCGTGATGACAACTTTCCAAATCATCTTACGGATGTTCTCAAAGAAACTGAATTT
 D G V M T N F P N H L T D V L K E T E F
 AAGGACAAATCAAGTTAGCTACATATGACGACAGTCCCTGGGAAACGTATATGGAAGAC
 K D K F K L A T Y D D S P W E T Y M E D
 ACTGAATACATCTCAAATACGCTTAATGTAGATGACATTTCAATAGCGAAGAAATAA
 T E Y I S N T L N V D D I S I A K K -

TGTGAATTTTTTCATCAACCTGTTGTTAACAATGTGATTGTTCAACGTTCCACAGCACCAGTAACCAAACCTTCTTACAGGAAAGGCCTTTTACAAATTA
 CATACGACATTCACCCTAACCACGGACCTATATTTAGCAAAATTTCTAGTATTCCAGTCACGTTTATTATCTATGTATAGAATAGAGTGACGCATC
 AGTCTGGAATTGAATTTCTGGCAAGATACAAATCATTTGCATCAATAAATATTAATAAACATCAAAAAAGTAAAGTACGCATTTTGTACTTCTTACCAGA
 GTTAAATGAGTGTGTAGATAGACAGATAGAGATAGATAAATGCTATTGATATATACATGGTGTCCAAGAAAGTCCGGGCCCAATGCTTATTTCCTCAA
 CTTTACTTGGATATGCTCCAAATAGAAAACAACATGTTTCAAATAAGGAAACATTTATCTAAAAACAATTTTAAATGAAGAAACACAATTTGATAAA
 AAAAAATAAGCACCTAAAATTGTAAGCGG

Loxtox s8A

GAACGTTTGTACCCTTATTCTGATTCTTTCGGTTCCTACTAACTTTTGTTCCTCCATTTTATTACAGGTAACATTTATACGCTGAATCTCTTGACACTA
 GTGAATCTACACATCTATATCACT

ATGTCATTTACTACAGCTATTTCCCTTATTAGTCCCTGTCCATCGTATTGCAGCAGGGGACG
 M S F T T A I S L L V L S I V L Q Q G T
 CAAAACCCAGGTAGTTGCGGATTCAGACGTCATTTCTGGAACATTGCACACATGGTAAAC
 Q T Q V V A D S R R P F W N I A H M V N
 GCAATTGACCAGATCGAACCTTTCTCAAACGAGGAGCAAACGCTATTGAATTCGACATA
 A I D Q I E P F L K R G A N A I E F D I
 GAATTTGATTCGAAAGCATAGCGCAACAAACCCACCACGGTGTACCTTGGACTCGCGGA
 E F D S E G I A Q Q T H H G V P C D C G
 AGAATATGCAACGAAAAGATGATTTCTGTCAAATACCTGGATCACATTCGTCAAGTTACT
 R I C N R K D D F V K Y L D H I R Q V T
 TCGCCAGGTACCAAGGAATATCGAGAGCAGCTGATACTACTTGCACCTTGATCTAAAGCTT
 S P G T K E Y R E Q L I L L A L D L K L
 CAACGCATATCGGTGAATCTAGCGTACGCTGCTGGTACAGATATAGCAAATAAATTAATT

Q R I S V N L A Y A A G T D I A N K L I
 GATCATTACTGGAAAAGAGGAAATAGCACTGCAAGGCATATATATTGCTCAATATCCCG
 D H Y W K R G N S T A R A Y I L L N I P
 AGTATCCGCCACTTCGATTTTCATCAATGGTTTTAAGCATAACGATTATTTCGACGAGAAGGT
 S I R H F D F I N G F K H T I I R R E G
 TATGAAAGATATGATGATAAAATACGGCATAAACTTCACCGGGAATGATGACTTGGAAATTA
 Y E R Y D D K Y G I N F T G N D D L E L
 ACACGTTTGATGCTGGGAAGAATGAACATCACATAACAATATTTGGCAAGCTGATGGTATC
 T R L M L G R M N I T Y N I W Q A D G I
 ACCAGCTGTTTACCACGAGGTACTAGACGATTGAAAGAGGCTATACGCAGAAGAGACAG
 T S C L P R G T R R L K E A I R R R D T
 GAGGGTTACAAAATTTATTTACAAAAGTATATTCCTGGACTTTGGTTGCATATTCTACAATG
 E G Y K F I Y K V Y S W T L V A Y S T M
 AGGAGATCAATGAGATTAAGCGTTGATGGTATAATGTCCAATCATCCAGAGCGTGTGGTG
 R R S M R L S V D G I M S N H P E R V V
 TATATCCTTGGCGAAGGGTATTTTGTCTAATCGTTTCAGAATGGCTACTTTAGAAGACAAC
 Y I L G E G Y F A N R F R M A T L E D N
 CCGTGGCAGAAGTACCATGTGTAA
 P W Q K Y H V -

TGAATGCATTGATTGCAACAGCCAATGGCATTATTTTCTAAAAGCTGAAAGAGTTTACCTACAATGTGAATATGCGTGCCTACTTGAACACATTTTCAT
 AGCTCAGTGGTATTGTCGTATGTAGACCACCAAATCGTAGTCATTTTCATCCTCATTAACATCACGGTAATAACATTGCGTTTTGATGCATTTCTGAG
 GTTAGAAAGTAGAGAAAGAATGGAAGAATATCTCATGAGTGTATATTGCTTTCTAGTCACTTTGTTTCCTAA

Loxtox s8B

GCGCAGAACGTGATGATACCAGGCAAGACCTTTGATCTCTCCTTCTACTACAGCCATC

ATGCTGTTTCGGCATTACACTCTGCATTGCGGGATTGTCTGTGCGCTATAAAGGGAGCTGAG
 M L F G I T L C I A G L S V A I K G A E
 ATAAGTAGCGCAGAACGTGATGATACCAGGCGCCCGTTCTATAACATAGCTCACATGGTA
 I S S A E R D D T R R P F Y N I A H M V
 AACGGAATTGTTCAAATAAACCAATTCCTTGGATAAAGGAGCTAACGCCATAGAATTCGAC
 N G I V Q I N Q F L D K G A N A I E F D
 ATTGAGTTTGACGCCAATGGGACAGCTCAGCATAACCACCATGGTTTCCCATGTGACTGC
 I E F D A N G T A Q H T H H G F P C D C
 GGAAGAAAATGCTTCCACAAGGAAAATGTTACCGAGTATTTGGATCATATACGACAGGTT
 G R K C F H K E N V T E Y L D H I R Q V
 ACTACACCTGGTGATCCTTTATTTTCGTGAGCAGCTCGTGCTACTCGCGCTGGACTTGAAA
 T T P G D P L F R E Q L V L L A L D L K
 CTACAGAGGATAGATTCGCAAACTCACATACAGCTGGCGTAGATGTAGCGAAGAAACTA
 L Q R I D S Q N S H T A G V D V A K K L
 CTTGACCATTATTGGCAGAGAGGAAAAAGTAAGGCACGGGCTTATTTGTTGCTAAACCTC
 L D H Y W Q R G K S K A R A Y L L L N L
 CCTCTACTAGAAGATTACGAATTTGTTTCGAGGATTCAAAGAACTCTTAAAGATGAAGGT
 P L L E D Y E F V R G F K E T L K D E G
 TACGAACAGTACAATGATGTAACAGGCATTAACCTTCACGGGTAACGAAGACTTGAAAAAA
 Y E Q Y N D V T G I N F T G N E D L K K
 ACACGAGAAGTGTATGAGAAACTTAGTGTCAGTAGCCACATTTGGCAATCTGATGGAATC
 T R E V Y E K L S V S S H I W Q S D G I
 ACCAGTTGCTTACCTTGGGGCACAAAACGTCTGACAGAAATTTTAAAAC TAAGAAATGAT
 T S C L P W G T K R L T E I L K L R N D
 CCTGATTACAACATATGTGACGAAGGTTTACCCGTGGACAATTATAAGATACTCGATAATC
 P D Y N Y V T K V Y P W T I I R Y S I I
 AGGAGATCACTCAGATTAGACGTTGATGGTATACAGACAAACCTACCGGATCGCGTGATC
 R R S L R L D V D G I Q T N L P D R V I
 GAAGTCTTGAAAAGAAGAATTCGCCAGTAAATTCGGTCTGGCAACCTATGAGGACGAT
 E V L K E E E F A S K F R L A T Y E D D
 CCATGGAAAAAGTTCATACGCATTTAA
 P W K K F I R I -

ATTAGTTGCCATTCAGCAGCCACTCACAATCATTATCTTGGATGAAAGTTCCTGATCATCAATCCCTCTATATAATCATCTGGTCTCGAGAATACCATGC
 AATAGAATTCTGTAACCTGATGTATGTGAGGTATACAAGAGTTAGAGATAGAGAGACAGAGATTCATGTTGTAATTTTAAATATATGGCTAAACACAAA
 TTTTATATGTTTCTGATTATATCTTTCTGAATGTTTCATCCATATGGTAAATTTTGAAGTGTGTAATAATAGAAAATAAATAGTAAAAAGTAAATG
 AATAAAAAGATTCAACAAATTAAGAACAAATCCATGGGAGAGATATAGT

Loxtox s8C

GACTACATCGCAGCGTCGATTTCTCGCAATTTGACATGACAATGTAGGGAACGAATGTTTCTCATCAGAGACAGCTGTTACTGTCAAATTATGTGCTAAAT
 CCCTGTATTTGATGTGCAAGCAGAATAGTTACATGATTGTATATATATCTATATATATTATACATTCAGTACTGAGACCTCTAATTTCTCCTTCTACTAAAGTT
 ATC

ATGCTATTCGGCATTGCACTCTGCATTGTGGGTTTGTCTTTTCGTTATAAAGGGAGCTGAG
 M L F G I A L C I V G L S F V I K G A E
 ATAAGTAGCGTAGAACGTGATGATACCAGGCGCCGTTCTATAACATAGCTCACATGGTA
 I S S V E R D D T R R P F Y N I A H M V
 AACGGAATTGTTCAAATAAACCAATTCCTGGATAAAGGAGCTAACGCCATAGAATTCGAC
 N G I V Q I N Q F L D K G A N A I E F D
 ATTGAGTTTGACGCCAATGGGACAGCTCAGCATACCCACCATGGTTTCCCATGTGACTGC
 I E F D A N G T A Q H T H H G F P C D C
 GGAAGAAAATGCTTTCACAAGGAAAATGTTACCGAGTATTTGAATCATATACGGCAAGTT
 G R K C F H K E N V T E Y L N H I R Q V
 ACTACACCTGGTATCCTTTATATCGTGAGCAGCTCGTGCTACTTGCGGTGGACTTGAAA
 T T P G D P L Y R E Q L V L L A V D L K
 CTCCAAAGGATAGATTCACAAAAATCGCATACGGCTGGCGTAGATGTGGCGAAGAACTA
 L Q R I D S Q K S H T A G V D V A K K L
 CTTGATCATTATTGGCAGAGAGGAAAAAGTAAGGCACGGGCTTATTTGTTGCTAAACCTC
 L D H Y W Q R G K S K A R A Y L L L N L
 CCTCTACTAGAAGATTACGAATTTGTTCGAGGCTTCAAAGAACTCTTAAAGATGAAGGT
 P L L E D Y E F V R G F K E T L K D E G
 TTCGAACAGTACAATGATGTAATAGGCATTAACCTCACGGGTAACGAAGACTTGAATAAA
 F E G Q Y N D V I G I N F T G N E D L N K
 ACACGGGAAGTGTATGAGAACTTAATGTCAATAGCCATATTTGGCAATCTGATGGAATC
 T R E V Y E E L N V N S H I W Q S D G I
 ACCAGTTGTTTTGCTAGGCGCACGAAACGTCTAGAAAAAGTTTTTAAACTAAGAAATGAT
 T S C F A R R T K R L E K V L K L R N D
 CCTAATTACAATATGTGACAAAAGGTTTACCCGTGGACAATTGTAAGATACACGATAATC
 P N Y N Y V T K V Y P W T I V R Y T I I
 AGGAGATCACTCAGATTTGACGTTGATGGTATACAGACAAACCTTCCGCATCGCGTGAGC
 R R S L R F D V D G I Q T N L P H R V S
 AAAGTCTGAAAGAAAAAGAATTCGCCAGTAAGTTTCGTCTGGCAACCTATGAGGACGAT
 K V L K E K E F A S K F R L A T Y E D D
 CCATGGAAAAAGTTCATACGCATTTAA
 P W K K F I R I -

ATTAGTTGCCATTCAGCAGCCACTCAAATCATTATCCTGGATGAAAGTTCCTGAGCATCAATCCATCTATATAAATATCTGGTCTCAAGAATACCATG
 CAATAGAATTCCGTGAACCTGCTGTATGTGAGGTATACAAGATTAGAGATAGAGAGAAGAGACAGAGATTCATGTTGTAATTTTAAATATACGAGTCTTC
 TAGTCATTTTAAATGTAACACAAGTTTATATATTTCTGATTTATAATTTTCGGAATGTTACCTACGTGGTAAATTTTGAAGTATGTAATAAAAA
 AATAAAAACGTAAGAAATAATTAATAAAAAATTAACAAATTTATATAA

Loxtox s9A

CGCCGAAGAAAAAGATGTTATCGAGCGTGCCTCTTTTCGTTCTACGTTCTTAAATTAAG

ATGTTGCTTAGAATTCATACTTTGTATGTTTGGTCCAATACAAGTATATAGTTTCAGGT
 M L L R I L Y F V C L V Q Y K Y I V S G
 GCAGCCGAAGAAAAAGATGTTATCGAGCGTGTATGATGATGGACGACGTCCGGTGTGGAAC
 A A E E K D V I E R D D D G R R P V W N

ATCGCCACATGACCAACGATATCGAAATTGTGAAAACATACTTGGACGATGGTGCCAAT
 I A H M T N D I E I V K T Y L D D G A N
 GCTCTCGAGTTTCGACATAGAGTTTAAACGAGAGGGGGCAGCCCTTGAGGACTTACCATGGT
 A L E F D I E F N E R G Q P L R T Y H G
 GTTCCATGTGACTGTTGCAGAAAAATGTGGTAGAACTGAACTTTCTCTACGTTTCATGGAC
 V P C D C C R K C G R T E T F S T F M D
 CAAATGAGAAAATTTACTACCCCGGCGATCCGGAATTTTCGCGAGAACTTGTGTTACTT
 Q M R K F T T P G D P E F R E K L V L L
 ATGCTGGATTTGAAAGTGAAGGATTTTGTATTCAAGCCTTGCCTTAGAAGCTGGACAGAAC
 M L D L K V K D F D S S L A L E A G Q N
 ATAGCGAAGGTGCTTCTGGATTCTGACTGGCAAAGAGGTAAAGCTGATACAAGGCCAT
 I A K V L L D S Y W Q R G K A D T R A Y
 ATAGTACTGTGATTCCATCTCTCGATTACGCTAAACTTATCAGAGGCTTCTATAATGAA
 I V L S I P S L D Y A K L I R G F Y N E
 GTGAAAAAACAAAATTTTCCGACATATCGGAGAAGAGTGGGCGTTGATTTCTCTGGTAAC
 V K K Q N F P T Y R R R V G V D F S G N
 GATGATTTAGACGACACGCGTAGAGCCTTGGAGAGAGTAAATATAACGCGGCGCATTGG
 D D L D D T R R A L E R V N I T R R I W
 CAGAGTGATGGTATTACGAATTGTCTCCCACGTGGCACCGGCCCTAGCAGCAGCTATA
 Q S D G I T N C L P R G T G R L A A A I
 AAAAGGAGGGACGATCCTGAATACAGGTTTATCAATAAGGTATATTATTGGAGCGTGGAC
 K R R D D P E Y R F I N K V Y Y W S V D
 AGGAAGTCGACTATACGAACAGTTCTAGACCTGGAAGCTGATGGTATGATTACCAATTTT
 R K S T I R T V L D L E A D G M I T N F
 CCCGATAATTTCCGACGCTACTGAACGAAAAGTAAATACGCCAGTCGGTTCAGATTGGCT
 P D N F A S V L N E S K Y A S R F R L A
 AATTACATGGACAATCCCTGGAAGAAATTCATTCCAAGTGGATCGCGCATGATTACAGAA
 N Y M D N P W K K F I P S G S R M I Q E
 AAATCTCTCGAACGAATTAGCCAGCTAGATGCTGAAGAATTCACTGACAACACGTTGGCA
 K S L E R I S Q L D A E E F T D N T L A
 CCAAAGAGTCAAAAATTTCCCTCATTCTTTTCTGACTGAGCTGTTTTTCTCCTGCGGTGGC
 P K S Q N F L I P F L T E L F F S C G G
 AAAGGATTATTCTGA
 K G L F -

TTTAGATAATCAACTGAGAAGGAAATTTCCGGATTGACTCTATGTACTGAATTCAAATGGACCTTCTGGTTTCTGTACAAGGAGAAAAAGAATCGTACACA
 GTTGATCTTTGTATGCTATTCTGTGAAAGTGAATACAAAATATAATAAAAAATATTATATGTGAGGAATCAGTAATAATTTTTACAGTTGTGGTAA
 ACTTCTGAAGTACTAAATATTTACTCGCATTACTGTAAATATCGAACGTACCCGCTGACTTATCTTATGCGCTACTGCACATTGGCATGTACAGAAAGAA
 TAACGATTCGATCCTTGTACGAACTGGAACATATTCAGAGAGTGCCTGACAATTCGCGTGGTTAGAAATTTGCTGATAATTCGCGTTAATGTGAAACA
 TTTAGCAATTCGCGTTTTGGCGGAAATGTCCAAAAGAAATGTCCATAGGGATGTGAAGGTGGTAGTATGGATGTGAATGTAGTAGTAGGGATGTGAATGTA
 GTAGTAGGGATGTGAAGGTGTAATAGGAATTGGTAGGTGTTAGTATGGATGTGAATGT

Loxtox s10A

TGCTGTGAGAAATAAGAAGTGACATGGAAGAAATGAATTCGCAGCTGTTTGCTGTCAACATTTTCATTCTTTAGACTTCATTAGTGACATGAGACACAGT
 ATGTTTCTTCAAACAATATATATAAAAAGTCGAAAGAAGCCTTGCATCGTATCATTCTTGTGAGCGTGATTTAATCTGAA

ATGTGGTTAGCGATTGTTTTGTGTCTTGCGGGATCAGCTGTGTTACTTGGGGCGCAGAA
 M W L A I V L C L A G S A V L L E G A E
 GCAGATACTAGAGAACVTGGAGATGGCCGCCCTCCTATATGGAATATAGCACACATGGTC
 A D T R E R G D G R R P I W N I A H M V
 AACGATAAGGAGATCATAGATAAAATCTTGAATAATGGGGCAAACAGTGTGAGTCTGAC
 N D K E I I D K F L N N G A N S V E S D
 GTATCGTTGATTCCAATGGCAGGCCAGAGAAAAATGCATCATGGTGCCCCATGTGACTGT
 V S F D S N G R P E K M H H G A P C D C
 GGTAGAAAATGCGACAGGCAAATGAGTTTTGATGACTATGTTGACTATATGAGGCAGCTC
 G R K C D R Q M S F D D Y V D Y M R Q L
 ACCACTCCTGGTGACCCAAAATTTCTGTGAGAGTTTAGTATTAATTATGTTTCGATTTCAAG
 T T P G D P K F R E S L V L I M F D F K
 TTGAAAAGTCTTTTCGTCGAGTGTGCGTACGCAGCCGGACAGGAAGTAGCACTCCGAATG
 L K S L S S S V A Y A A G Q E V A L R M
 TTGGATAACTATTGGAAAACGAGGTGAAAAGTGGAGGAAGAGCTTACATTGTGCTGTGATT

L D N Y W K R G E S G G R A Y I V L S I
 CCGACCATCAAACGTATCACATTTGCAACTGGGTTCTATGACAAGCTTCACAGCGAAGGT
 P T I K R I T F A T G F Y D K L H S E G
 TTTGACCAGTATCGGGACAAAGTTGGGATAGACTTCTCAGGTAACGAGGACCTAGACGAG
 F D Q Y R D K V G I D F S G N E D L D E
 ACTGGTCAATTTCTGCAGTCATCGAATATCGTCGACCATATATGGCAAAGTGATGGCATA
 T G R I L Q S S N I V D H I W Q S D G I
 ACTAATTGCCTGTTTAGAGTCATGACTCGTCTGAAGAAGGCGATTAGCAAAGAGATTCA
 T N C L F R V M T R L K K A I S K R D S
 AATGGATACATGGCAAAGTGTATACATGGAGTGTGGACAAGTACACAACAATGAGGAAA
 N G Y M V K V Y T W S V D K Y T T M R K
 GCACTCCGTGTGGCCGCTGATGGTATGATAACCAATTTTCCGGCAGCTTTGTATCTGTG
 A L R V A A D G M I T N F P A R L V S V
 CTCAACGAGTCTGAATTTTCTGGCAAATTCAGGCTGGCTACTTATGATGACAATCCATGG
 L N E S E F S G K F R L A T Y D D N P W
 GAGAGATATAGTTCTTGA
 E R Y S S -

ACATATAGCCTAACGGTGTTCAGGGTTTTAACATGAAGAGCAAGTGACATTTTTTATCATGCCGCTTCTTAAAATTTCTGTGAATATATGTTCTCTATTCT
 GTACGTATAGGTTAATTGGTGTGCTTTGTATTATGAATAAAATCTTGAATAAATTATTTCATTCTTTTACATTTCATTCTGTTACGGTACTTA
 AGCTGGCATCTGGATTCAAACAACGCTTTTCCACCCCGGCAGAAAGTCTTTGTATCGCTAAGCCATGAGGGTGATGGATGAAACAGCTAAAAAACTAA
 TGCAATTAGCTAATGTGCATTCTCAGAGTCCACGTTTGGGGCCCTATTATTCTTATTATTAACGATATCTATCTATCTATATATATATATAT
 ATATATATATATATATATATAAACAAGAAAGTTGTGTGTCCACAAATATTTATGTGACGGTAATGTATTTACAAA

Loxtox s10B

TGCTGTGAGAAATAAGAAGTGACATGGAAGAAATGAATTCGCAGCTGTTTGTGTCAACATTTTCATTCTTTAGACTTCATTAGTGACATGAGAGCACAGT
 ATGTTTGTCTCAAACAATATATATAAAGTCGAAAGAAGCCTTGCATCGTATCATTCTTGTGAGCGTGATTTAATCTGAA

ATGTGGTTAGCGATTGTTTTGTGTCTTGCGGGATCAGCTGTGTTACTTGAGGGCGCTGAA
 M W L A I V L C L A G S A V L L E G A E
 GCAGATACTAGAGAACGTGGAGATGGCCCGCTCCTATATGGAATATAGCACACATGGTC
 A D T R E R G D G R R P I W N I A H M V
 AACGATAAGGAGATCATAGATAAATCTTGAATAATGGGGCAAACAGTGTGAGTCTGAC
 N D K E I I D K F L N N G A N S V E S D
 GTATCGTTCGATTCCAATGGCAGGCCAGAGAAAATGCATCATGGTGCCCCATGTGACTGT
 V S F D S N G R P E K M H H G A P C D C
 GGTAGAAAATGCGACAGGCAAATGAGTTTTGATGACTATGTTGACTATATGAGGCAGCTC
 G R K C D R Q M S F D D Y V D Y M R Q L
 ACCACTCCTGGTGACCCAAAAGTTTCGTGAGAGTTTAGTATTAATTATGTTTCGATTTCAAG
 T T P G D P K F R E S L V L I M F D F K
 TTGAAAAGTCTTTCGTGAGTGTGCGTACGCAGCCGGACAGGAAGTAGCACTCCGAATG
 L K S L S S S V A Y A A G Q E V A L R M
 TTGGATAACTATTGAAAACGAGGTGAAAGTGGAGGAAGAGCTTACATTGTGCTGTGCGATT
 L D N Y W K R G E S G G R A Y I V L S I
 CCGACCATCAAACGTATCACATTTGCAACTGGGTTCTATGACAAGCTTCACAGCGAAGGT
 P T I K R I T F A T G F Y D K L H S E G
 TTTGACCAGTATCGGGACAAAGTTGGGGTAGACTTCTCAGGTAACGAGGACCTAGACGAG
 F D Q Y R D K V G V D F S G N E D L D E
 ACTGGTCAATTTCTGCAGTCATCGAATATCGTCGACCATATATGGCAAAGTGATGGCATA
 T G R I L Q S S N I V D H I W Q S D G I
 ACTAATTGCCTGTTTAGAGTCATGACTCGTCTGAAGAAGGCGATTAGCAAAGAGATTCA
 T N C L F R V M T R L K K A I S K R D S
 AATGGATACATGGCAAAGTGTATACATGGAGTGTGGACAAGTACACAACAATGAGGAAA
 N G Y M A K V Y T W S V D K Y T T M R K
 GCACTCCGTGTGGCCGCTGATGGTATGATAACCAATTTTCCGGCAGCTTTGTATCTGTG
 A L R V A A D G M I T N F P A R L V S V
 CTCAACGAGTCTGAATTTTCTGGCAAATTCAGGCTGGCTACTTATGATGACAATCCATGG
 L N E S E F S G K F R L A T Y D D N P W
 GAGAGATATAGTTCTTGA
 E R Y S S -

ACATATAGCCCTAACGGTGTTCAGGGTTTTAACATGAAGAGCAAGTGACATTTTTTATCATGCCGCTTCTTAAAAATCTCTGTAATATATGTTCTTATCT
GTACGTATAGTTAATGGTGTGCTTTGTATTATGAATAAAAATACTTGAAAAATATTCATTCATTTATTACATTCATTCACCTCGTTACGGTGACTTA
AGCTGCATCTGGATTCAAACACAGCTCTTTCCACCCCGGGCAGAAGTCTTTGTATCGCTAAGCCATGAGGGTGATGGATGAAACAGCTAAAAAACTAA
TGCAATTAGCTAATGTGCATTCCTCAGAGGTCACGTTGGGGCCCTTATTATTTCTTATTATTAACGATATCTATCTATCTATATATATATATAT
ATATATATATATATATATATATAAACAGAAAGTTGTGTGTGCCACAAATATTTATGTGACGGTAATGTATTTACAAA

Loxtox s11A

TGAGTACTATGACATTTATTTCAGTGACATCCACATTTGTAACACCGCAAAGACGTGAAAGGCCAAAAATGGCAGAGTATTTCAGCTGGTAGACATCTGTTGAT
ATGATTTCTGGTGTCAATTTTGAATGATCTAATGCAATGAACGATTATATAAAGATCAGCTAACATTCAACTACTCGCATCTTCCGCTTCGCCGGCTCTGCTT
CACC

ATGTTGCTTTTCGACTATCATATCTTTTCATCGGATTTGCCGTTTTCTTCCAGGAAGCTTAT
M L L S T I I S F I G F A V F F Q E A Y
GGACATGTTGTAGAAAAGCTGACAGTCCGGAAGCCAATTTGGGATATAGCCACATGGTG
G H V V E R A D S R K P I W D I A H M V
AACGATCTTGAGCTGGTGGACGAATACTTAGATGATGGCGCAAACGGCCTTGAGTTGGAT
N D L E L V D E Y L D D G A N G L E L D
GTTGACTTCGAAAAGGACGGGACAGCAAAGGAGATGTATCATGGAGTTCCATGTGACTGT
V D F E K D G T A K E M Y H G V P C D C
TTTGAAGCTGCACGAGATCAGAGGAATTCACCAAGTACATGGACTACATACGTCAACTT
F R S C T R S E E F T K Y M D Y I R Q L
ACAACACCTGGAAACCCCAAGTTCGGAAGCCAGCTCATTATGTTAATCATGGATCTGAAA
T T P G N P K F R S Q L I M L I M D L K
TTGAAGGGCATCGAGCCAAAATGTGGCGTATGCCGGCAGGAAAGAGCGTTGCCGAGAAACTC
L K G I E P N V A Y A A G K S V A E K L
CTGAGCAGTTACTGGCAGAAATGGAAAAAGTGGAGCGAGGGCGTATATAGTCCTTTCCCTT
L S S Y W Q N G K S G A R A Y I V L S L
GAGATATCACCCGACCAGATTTTCATCAAGGGTTTCAGAGATGCGATTACAGCGAGTGGG
E T I T R P D F I K G F R D A I T A S G
CACGAAGAGTTATTTCGAAAAAATAGGTTGGGATTTCTCTGGCAACGAAGACTTGGGCGAC
H E E L F E K I G W D F S G N E D L G D
ATCCGTAGAATGTACCAGCAATATGGAATCGAGGATCACATTTGGCAAGGCGACGGTATC
I R R M Y Q Q Y G I E D H I W Q G D G I
ACCAACTGTATTGCGCGAGGGGACTATCGTCTGAAAGAAGCCTTGAAAAAGAAAAACGAT
T N C I A R G D Y R L K E A L K K K N D
CCCGACTACAAGTACACTTTGAAAGTGTACACCTGGAGCATAGATAAAAACTCCTCCATC
P D Y K Y T L K V Y T W S I D K N S S I
CGACATGCACTAAGACTTGGCGTAGATGCTATCATGACAAATTATCCAGAAGATGTAAAG
R H A L R L G V D A I M T N Y P E D V K
AGCATCTTGCAAGAAAAGCGAATTTCTCCGGCTCACATAGGATGGCAACGTATGAGGACTAT
S I L Q E S E F S G S H R M A T Y E D Y
CCCTGGCAGAAGTGA
P W Q K -

GAACTATCTCCAAATGTGTCTCACTAAAAGAAAGACAATTTATTAATGTTATTTAAATGTATTGAAATTTGTTCAAGTGTCAAAGAATAATCTAGAGCTC
AATCTTGTCTGTCTTCTTCAATTTCTTCTTCTTATGATAAAAATATAAAACATTATAAAAATATCCCTTATTTTCAGAACTCTAATTAACGTAGATA
GCCGATAATGGAGATTTGTATTTTAAACAGGGTTAAATATTTTTTCTGTATTTGATAGTTGACATTTAACGAGTTCGTATCAAGATAAGATTTAAAT
TTGTGATGTTGGACTAAGCCATGACAATTTACTATGAACCTTCTTATTTAGAAATATAAGCATTACAGACAGAGTTCAATTTTTCAGTTCCGTATAAC
GGAAACAAAAGTTCCACTTACACTATTCGAAAAGCAAATAAAAATAAATATAGCAATACGTATGCAAAATATATATGAATACACACAGCAATACGAATACGAA
CTTTAGGTGAAAAATGGAACGATGCGAAGTCAAGATGTATAACATAAATTAATAAATTAATAAATGAAATCAACCAGATCCAAGTGAAGACATAG
GTAACATAATATACATGCTAACACATAAACTATATAAAAACCAAAATATTTTAAAGAAAATGTACAAAACATTTGTGAAGCAACTCACTAAAAATTTATCAA
GTACTAAAAAAAATAAACACAAAATTTAAATCAAATTAATAATAGTCACTGCGCATCAATATGACATTGAAATGAGAAACAAAACACGATTTTGGCG
CGAAAAGGGGGCAGTCTTGTAAAATTCACAAAATGCAAAAAGACCTCATTTCCCTGACAGTCCAGCATGGAACAAAAGCAAGGTGCAACAAGACAATG
ATTCCATACACACAGCAAACAGTGACAGACAGTGGATTTTCGATAAGGAAATTAACGTCATGGACTGGCCTTGTGTTTCTCCAGATTTGAACCCCATGGAG
AGTGTTTGGAGCGTGTAGTATGAACAGTCTATGCTAATGGAAATCAATATTAATAATGTTACTTCACTGTTGCACACAGGTTGTTCTGCTGTCTAACTCA
CCTAGTCTTGGGCACAGTTAAAAAAAACCTTGAATTTAGGAAGTTATCAATTTTTCAATGGGAAAGTCAATGTTAAAATATGATCCGATAAGCCAAAAG
ACTTTATATCCAACTTTGGTCTATTCTTTAGGGAATGGTATATATATATATATATATAATATAATATATAGCATTATTAAGAAAATAAAAATTCACAA
AAATCACGAGACTCCTTAACTAAGGAAAAATTTGAAAAGAAAGAAAAACAAAAATTTGAAAAGAAAAATGGAAGGAGTGTTCAGTTTGTGATGCCGTT
GTCAAGGGGGGGGGTACCAAAGAACGCATCTAACTGCTTTCTAG

GGGCATGTTGAAGAAAAGAGCTGACAGTCGGAAGCCAATTTGGGATATTGCTCACATGGTA
 G H V E E R A D S R K P I W D I A H M V
 AACGATCTTGAGCTGGTGACGAATACTTAGGCGACGGCGCAAACGGCCTTGAGTTAGAT
 N D L E L V D E Y L G D G A N G L E L D
 GTGGCTTTACAAAAGGATGGGACAGCAGAGAAGATGTATCATGGAATTCGGTGTGACTGC
 V A F T K D G T A E K M Y H G I P C D C
 TTCAGAAGCTGTAAAAGAACAGAGGAATTCACCAAGTACATGGACTACATACGTCAACTT
 F R S C K R T E E F T K Y M D Y I R Q L
 ACAACACCTGGCAACGCCAAGTTCGGAAGTGAGCTCATAATGTTAATCATGGATCTGAAA
 T T P G N A K F R S E L I M L I M D L K
 CTGAAGGACATTGAGCCAAATGTTGCGTATGCGGCAGGAAAAGAGCGTTGCTGAGAAACTC
 L K D I E P N V A Y A A G K S V A E K L
 TTGAGCAGTTACTGGCTGAATGGAGAAAAGTGGAGCGAGAGCATATATAGTGTCTTCCCTT
 L S S Y W L N G E S G A R A Y I V L S L
 GAGACTATCACCCGACCAGATTTTCATCAACGGCTTCAAGGATGCCATTTATAAAAAGTGA
 E T I T R P D F I N G F K D A I Y K S G
 CACGACGAGTTATTCGAAAAAATAGGTGGGATTTCTCTGGCAACGAGGACTTGGGCGAC
 H D E L F E K I G W D F S G N E D L G D
 ATCCGTAGAATGTACCAGCAATATGGAATCGAGGATCACATTTGGCAAGGCGACGGTATC
 I R R M Y Q Q Y G I E D H I W Q G D G I
 ACCAACTGTATTACCGGAGGGGACTATCGTCTGAAAAGAAGCCTTGAAAAGAAAACGAT
 T N C I T R G D Y R L K E A L K K K N D
 CCGACTACAAGTACACTTTGAAAAGTGACACCTGGAGCATAGATAAAAACTCCTCCATC
 P D Y K Y T L K V Y T W S I D K N S S I
 CGACATGACTAAGACTTGGCGTAGATGCTATCATGACAAATTATCCAGAAGATGTAAAG
 R H A L R L G V D A I M T N Y P E D V K
 AGCATCTTGCAGAAAAGCAATTCCTCGGCTCACATAGGATGGCAACGTATGAGGACTAT
 S I L Q E S E F S G S H R M A T Y E D Y
 CCCTGGCAGAAGTGA
 P W Q K -

GAACTATCCTCCAAATGTGTCTCACTAAAAGAAAGACAATTTATTAATGTTATTTAAATGTTAATGTTGAAATTTGTTCAAGTGTCAAAGAATAATCTAGAGCTC
 AATCTTGCTGTTGTTCTCATTCTTTCCTTTCCCTTTATGATAAAAAATATAAACATTTATAAAAAATATCCCTTATTTTCAGAACTCTAATTAACGTAGATA
 GCCGATAATGGAGATTTGTTTATTAAACAGGGTTAAATATTTTCTGTTATTGATAGTTGACATTTAACGAGTTCCGTATCAAGATAAGATTTAAAT
 TTGTCGATGTGGGACTAAGCCATGACAATTTTACTATGAACTTCTTTATTTAGAAAATAAAGCATTACAGACAGAGTTTCAATTTTCAAGTTCCGTTAATC
 GGAACAAAAGTTCCTTACTATTTCGAAAAGCAAATAAAAATTAATATAGCAATACGTTATGCAAAATATATGAATACACACAGCAATACGAATACGAA
 CTTTAGGTGAAAATGGAACGATGCGAAGTCATGAAGTATGTATAACATAAATAAATAAATAAATGAAATTCACCCAGATCCAAGTGAAGACATAG
 GTAACATAATATACATGCTAACACATAAACTATATAAAACCAAAATTTTAAAGAAAATGTACAAAACATTTGTGAAGCAACTCACAAAATTTATCAA
 GTACTAAAAAATAAACAACAAAACTTAAATTAATAAATAGTCACTGCGCATCAATATGACATTTGAAATGAGAACAAAAACAGATTTTGCAG
 CGAAAAGGGGCGCTGTTGTTAAAAATCCAACAAAATGCAAAAAGACCTCATTCCCTGACAGTCCAGCATGAAAACAAAAGAGGTGCAACAAGCAATG
 ATTCCATACACAGCAAACAGTGACAGACAGTGGATTTTCGATAAGGAAATTAACGTCATGGACTGGCCTTGTGTTTCCTCCAGATTTGAACCCCATGGAG
 AGTGTGTTGAGCGTGTTAGTATGAACAGTCTATGCTAATGAAATCAATATAAAATGTGTACTTCACTGTTGCACAGAGTTGTTCTGCTGTCTAATCA
 CCTAGTCTTGGGCACAGTTAAAAAATAAATTAAGAAAGTTATTAATAAATTAAGAAAGTCAATGAAAATGAGAACAAAAACAGATTTTGCAG
 ACTTTATATCAATCTTGGTCTATTGTTTAGGGAATGGTATATATATATATATATATATATATATATATAGCATTTAAAGAAAATAAATAAATTCACAA
 AAATCACGAGACTCCTTAACTAAGGAAAAATTTGAAAAGAGGAAAAAACAATAAATGAAAAGAAAAAATGGAAGGAGTGTGTCAAGTTTGATGCCGTT
 GTCAGGGGGGGGGGTACCAAAGAAGCATCTAACTGCTTTCTAG

Loxtox s11D

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCTACGCTCGCTTTGCTTCACC

ATGTGGCTTTTCGGCTGTCTTATCATTTTTGGAATTTGGCGTCTACCAGTTGTTAAT
 M W L S A V L S F L E L A V V Y Q V V N
 GGGCATGTTGAAGAAAAGAGCTGACAGTCGGAAGCCAATTTGGGATATTGCTCACATGGTA
 G H V E E R A D S R K P I W D I A H M V
 AACGATCTTGAGCTGGTGACGAATACTTAGGCGACGGCGCAAACGGCCTTGAGTTAGAT
 N D L E L V D E Y L G D G A N G L E L D
 GTGGCTTTACAAAAGGATGGGACAGCAGAGAAGATGTATCATGGAATTCGGTGTGACTGC
 V A F T K D G T A E K M Y H G I P C D C
 TTCAGAAGCTGTAAAAGAACAGAGGAATTCACCAAGTACATGGACTACATACGTCAACTT
 F R S C K R T E E F T K Y M D Y I R Q L
 ACAACACCTGGCAACGCCAAGTTCGGAAGTGAGCTCATAATGTTAATCATGGATCTGAAA
 T T P G N A K F R S E L I M L I M D L K
 CTGAAGGACATTGAGCCAAATGTTGCGTATGCGGCAGGAAAAGAGCGTTGCTGAGAAACTC

L K D I E P N V A Y A A G K S V A E K L
TTGAGCAGTTACTGGCTGAATGGAGAAAAGTGGAGCGAGAGCATATATAGTGCCTTTCCCTT
L S S Y W L N G E S G A R A Y I V L S L
GAGACTATCACCCGACCAGATTTTCATCAACGGCTTCAAGGATGCCATTTATAAAAAGTGG
E T I T R P D F I N G F K D A I Y K S G
CACGACGAGTTATTCGAAAAAATAGGTTGGGATTTCTCTGGCAACGAGGACTTGGGCGAC
H D E L F E K I G W D F S G N E D L G D
ATCCGTAGAATGTACCAAAAAATATGGAATCGTGGATCACATTTGGCAAGGTGACGGC
I R R M Y Q K Y G I V D H I W Q G D G I
ACCAACTGTTTCCCGGAGTGCATCTGAAAHAGCCATGAAAAAGAAAAACGAT
T N C L P R G D Y R L K E A M K K K N D
CCCGACTACAAGTACACTTTGAAAAGTATACACCTGGAGCATAGATAAAGAGTCCCTCCATC
P D Y K Y T L K V Y T W S I D K E S S I
CGAAATGCACTCAACCTTGGCGTAGATGCTGTCTGACTAATTATCCTGCACGTGTAAG
R N A L N L G V D A V M T N Y P A R V K
AGCATCCTCCAAGAAAGCGAATTTCTCCGGTACACATAGGATGGCGACATATGATGACAAT
S I L Q E S E F S G T H R M A T Y D D N
CCCTGGGAGAAGTGA
P W E K -

GAACTACTCACCATTGCCTCTGACTAAAAGGAAATTTTATTAGCCAAATGACTGAAATTTGTTCAAGCGTCAAAGAATGATTTAGAAGTGTCTCGTCTTGT
TTTTTCATTTATTTTCGTCCTTTTACATCAGAATTCCAATTAACGTACATAAAAAGATGATAATGACTTTTATTTAAAGCAGCGTTGAGTATATTTTATA
TATTTGCATTTGCTACACGTTAAGGAGTTCACATTTGTTAAATATAGCACTTGAGTTTGTCTGGATGATTTCAATAGTCAAAAAGTTACCATGAAATTTCTT
CGTGTGTGACACATGCCGAAATAAATACACACCCTACATGTTTACATACAAATAAAGGATAGATACAAAGTCAAAAACGAAGTGCCTGATGACGTAAT
TAAATAATAAAATTTGACCAGATCTCAGTACAAGATATAAATACAGCTGCAATAATAAATAATATGATAGCAAAATATGAATATAATTAGAATATTAAT
GATATTGAATGACGAACACTCACACACACAAACATCTAT
AATTCATAATTTATTTGTAATATAATGTTTCTATGTTGAGTTTGTCTGGCAATATGCGCAACTTCCCTTGGAAAAACAGAGTTTAAATTTTGAATTTATA
ATTGATGACGATGATGAAATTTAAATCAAACAATGAGTTTGTAAATATGTTTATATATATATAGCTTGTGAAAGAAAAATAAATTTACAAAAATCATAAA
CTCCTTAACAGAGGAAAAAGGAAAAAACACAAAAATGAAAGAAAAAAGCTGAAAGGAAAAACGGAAGGAGTGTGTTCCGAATATGATGCCATTT
TCGAAGGAGTCAACAAAGACACCATAAAACCTGCTTTCTACTGGTAATAAACCAAAATACACCCCGAAGCATTCAACATTTCAACATTTAGTATTGTG
TGTTTTTATTTTCTCCATTCCCTTTGTTTTGTGATTTTTCACCTTAACCTTAATATGGAATTTTATGTTATTTTATCATATATATATATATGTTGAAGAAAA
AATAAAGAAAGCAGAAATGGGGACACAGGGGAGTGGAGGGAGCACATACGGCCAAATGACACCGTATGAAATACATGGAATTCAAAAGAAATAAAAAAA
ATATATAAATAAGGAAGTAAAAAATAGTACAGTATATACAACGAGAGAGAGAGTAGGAAGCCAAAGATACAACCGTAAAAGTTATTTAAACAAAATAT
CGAATGAAATAATAAATAGAGAAATGCTCTATCCGTGAATCATCATCAGGAGTCAAAAACCATATAATAAAGCATTAGCGGTTACTGGGTGATATGTTT
CCTCTCTTTTATTTAATATGAT
AGAAAAGATTAGGAAGGAAAAACACAAAATTAACACAAAAACAAAAGAAGAAATGGAAGGAGTGTGTTCAAGTTTGTGCTTTTATCAAGGGGGTCAAC
AAAGAACACTTCCATAAAACCTGCTTTCTGGTGGTTATGAACCAAGTTACACCCCGAAGCAGTTAGAAAACAAAAGCAAGGAAACAAAACAACACTGAAA
CAGACCTGAAAAAGAAAAATAAATCCCGTTGAACGACAAAGTCCGGAACCTTAACACACACGTTAACGTTAGTATGAAATTTTATGTTATTTATATATA
TATATATATATGATATATATATATATACACATATATACCCGAGTTATAAATGCCAGGTAATTTCTTTGATTTGAGTCCGGCTTTGATACAAATTAACA
AATTTTACAGATAAACTAGAGCATATAGGCATTGGATGTCCTTCAGCAAGCAAAGGATGGAATAATCAATCAAAATTTCAAGAAGCGTTCGATAAAGTG
TCCCAAGGAACTTCTGGAATAAATGAGGGAGCTTTTCCAGTGGTGTCCCCCAAGGATCAGTGTAGGCCCACTTCTCTTTTATGTTTATGTAAGTGA
ATTGAAAAACGGGTTTCAGTCAATTTGTAGCAAATTTGCAGATGACACGAAGGTTTGGAAATGTAATTTCTGAGTCCGACGCACATGCCCTACAAAAAG
ACATTTGAGAAATTTAGCAGCTGGGCTGATAAATGGGAAATGAAATTTAATGTTAGTAAATGCAAAAGCTTACATTTCTGTGTGAAACCCGAAATTAAC
TACTAGTTAGGAGGTAACACTCGCAGTAAAGAATCCATGAAGACCTAGGGGTAATAGTACTAGGAAATTTCAATTTGGTAACCACTGCTTCTCTCG
CTGCTGCCATAAGGCTAATAGAAATGATGGGTTCTTAAACGTCACCTTACTTGCACGCAAGAGAAATGTTATGCCCTTGTACAGATCACTGGGTCGT
CCTCATCTTGATGATGCGGTTCAATTTGGTCCGCATACCTCATTAAAGGATATGGATTTGTTAGAGGGGTTGCAGAGGAGAGCAACAATTTATCAGTCT
CTTATGGAATCTCGAGTACAGGATAGGCTGAAAGAATGAAATTTAATGTTAGTAAATGCAAAAGCTTACATTTCTGTGTGAAACCCGAAATTAAGATTT
TGCAATGGTTAGACAGTATGATAGGAATTTTTTAAAGAAAGTGTATGTAATTTACTAGGGGACATGGAATGAAATTTATGACGGGAAAAAGTAGGCTG
TTACTAAGACATTAATTCCTCCGAAATAGGGTGGTGAATAAATGGAATAGTATACCAGAACTGCGATTCAGGCGGGGTCGTGGATAATTTTAAAGAAAT
ATTTGATAAACAATTTTTAGTAGTAGGCTTGGCAGCTTGAGATTTTCTGAGCGGAAATTTGACCAAGGTTGTTCCCTAGAGTGAATTTTTCTCT
TTTTTTAATCAATTTGATAGTATGTTAATAAATTTCCCTCATAAATAAGATGTCGCTTATTTGATTATGCCCTTTAAGAGATATTGGAATTTGAAAT
TCTTTTTGGACGGCAAAAGAGATGCTCTACAAAATTTAAAGATTTTATGACAGGGAGAGTGTGAATTTCCCTATACTATAATGGACACGGTCAGCCTTG
TTGGGTAGTAGCCTGTAGTTGACACGATATCTGTATGTAACATGCCCTGTAAACTATCTGGTAGGATCCATATGTAAGATGGGCTCGCACGAAATCGAA
TCTTGGTAAAAATACGATGATGTTCCCTAGGTTGAGCTTTGGTTCCTGTGCCTTCTTTATATATCAAAGATATATTTAGTATATTTTCAAGTACTCAA
TCAATTTATTTTGCAGGCGATACCACTTCTCGTTTACATCCGACACAGCCTTCTCAATCCAAGATAGAGCTAATTTGAAATTTGAGGAGTCAACAAAT
GTTTAAAGCAAATTACACTACCTTAAATTCGAAAAATCAACAATGAATATTTTAAAGGTAAAAAACAGAAATCCAGGAAATAAATCGTAACTTTCAAAATC
CAACCAATTAATCGGGTAAATTTATGGAAATTACTCTCAAGATAATTTAAACGAAATTAACACTCACATGATGATATTTCTCATAAAATCATTTGGTACGAT
AGATATACTTAGACATATCTCAATTTGCTATTTCTTCAAAAAGCTCAATATATGTTATATATGCTCTTCAATCGAAATTTGATTTTGTAGTCTGGTT
ATCTAACAACCCCTCCAAATTTCAATCGATTTACAATTTGCGCAAAACAAAGTAAAGAAATGATAGGCGATTTAATGATTTTACATGGGAAATTAACAA
ACTGTTAATTTGCAAAACACACCGTAAGCGGAAAAATCTGCTTTTCGGAAGCCAGCTACTTCTTTCTAATTTGTCAGAAACAATACTGACCGGGTTTCTTAT
CAAAGAAATACATTTGCGGGCGCTCAAATTTGAATGGCGACTCCAGCATGAGCGCTAACCAACTGCGACACGCGCACGAGTCCAAAGCCACAAGATATC
AACTTTGAACGTAACGTGGTAACTTATAGGCGATATAATAGCTCTTTCGTAGGGCATTAACTAACTCTTAAATTTCTAACAACAACGTTAGCGGCATATACT
TGCCCTTTGGAAGCCAGTGCACACAGCAGATGGTGGAGGCCAGGTTTGAAGCCAGTGCAGCCGCTTTTATTTTGTGATTTGGAATTTGGAATTTGGA
CAGCATTTCTTCTAATAATAAAGAGGAAGAGGTTTTTCAATTTGGACATTTATCTTTAAGCTTTCTCACACTCTGAGTGGAAATGCGGCTCTAAGTTCA
ATAATCTTTGTTATTTGAAATCCAAAATTAACAATGATTTGCACATTAAGATACCTTCAAGACACATATGATTTAATGAATATACTTCTATTTTATGAT
TTATGTAATGACTTAGAGAACGAGTTAAGCCATTTGTTTGGCAATTTGCGAATGACACTAAGGTTTGAAGATTTGAAATTTCTGAGTGTGACGCACATA
CACTACAAAAGCAATTTGAAAAAT

Loxtox s12A

TCCTCTCCGTGCCGTGAAAGACAGTCGTCATTCTGGAGTAATCAAGTGATGTAATTTGGATGTGAACTGTTTCACCGTAATAATGAATATTAGTACTGAC
TTTCAGGGTGAAAAATCGGATAGTCCACTCTGCCTGTAGA

ATGGAGGGAATCCAACGTTTCGGGCATATTCATTGTGGTACTATTAGTGCATTCGTCAGTA
M E G I Q R F G I F I V V L L V H S S V
GCAAAAATAGACTACAGAAGACCCATCTACGTCATAGGTCATATGGTTAACTCCATTGGA
A K I D Y R R P I Y V I G H M V N S I G
GAAGTAAAGGAATATCTCGACAGAGGGTCCAATGTCTGGAATCAGACATCTCGTTTCAT
E V K E Y L D R G S N V L E S D I S F H
ACCAACGGCAATGTTGAAAAATCTACCACGGGCCACCGTGTGACTGTAATAGAACCTGT
T N G N V E K I Y H G P P C D C N R T C
ACTGGAAGTGCAAAATTAACAGTATTTGGATTATGTAAGAGAAAATAACAAATCCATAC
T G T A K L S T Y L D Y V R E I T N P Y
TCTGGAGGATATAGCAGGAAATTAATATTACAGTTTTTTCGACTTGAAGTTAGATAACGTG
S G G Y S R K L I L Q F F D L K L D N V
AGTCCGACTGGGAAGTTTAAGGCTGGACAAGTAATGGCTGACCACGTTCTGGATCATCTA
S P T G K F K A G Q V M A D H V L D H L
TGGGTGAATCTGAGGTTTAAACGATAAGTTGATAAGAGTCTGCTCTACATCAACAGCATT
W V N L R F N D K L I R V L L Y I N S I
TCCGATAAAGATACAGTCGTGGGTTTCATAAGAAGATTCAAAGAGCGAGGAGTGGAGCAT
S D K D T V V G F I R R F K E R G V E H
CTTTTAAAAAATGTGGGATTCGACGGTGGATTGGACAACCTGAAAGACATCAAAGCAATG
L L K N V G F D G G L D N L K D I K A M
TGGGAATCTATAAGAGTTAAATCTAATGTGTGGCAAGGTGACGGTGTACCGAATTGTCTG
W E S I R V K S N V W Q G D G V P N C L
AGCCACCGCTACCCAGACCAGCGCTGAGAGAGGAACTTGATGCACGTGACGCTGCAGAG
S H R Y P D Q R L R E E L D A R D A A E
GGCTATATCGACAAAAGTTTATCACTGGACCATTGATGATAAAACCAGAATGAGAAAGTCT
G Y I D K V Y H W T I D D K T R M R K S
CTAGATCTAGAGGTGGATGGCATGATCACGAATGTACCTGAGAACTCGTTGAGATCTTG
L D L E V D G M I T N V P E K L V E I L
CAGGAGCAGCAATACGCCAACAAAGTTCAGATTGGCTACTGTGGACGATGATCCGTTTCAG
Q E Q Q Y A N K F R L A T V D D D P F Q
AAATTTGTTTTACATCAAGTACAGTAG
K F V L H Q V Q -

ATAGTTTCAAATACACCGTCACGAACGTGTCTTATATGGCATTGGTGACTTTTCTTTTCATTGCATGTTTAAAGTGGGAAAATAATCATTTCATGTTTT
GGAGCATTTCTAAATATGCAAAAGAATGTAAATGATTCTAGCATAGCAGCAGTCAGATTTCATCAGATCTCCAGCGGTGGAAGAACACATGTCTGGAACAG
CAGGGCTACAATTCAGAACCTACATGTTCCATGCGGTTGTTTAAACATTGCACCTAAGATTACGCTCCCAGCGCCGGTTAATTTGGGGTCTGAAGCTGCT
CCAAGTTCGTCACAACCTCAACTGAACCTATTGAGCCTGAGCATCAAGAGCAGATCTGTTCAATGTAATGGCCAATGTGGGGCACACAGTAGCAACTGT
GCCGCAATCTACAACGTAATGTGCGTTTCATTGGAAGACGTAAGGCTACTAGAAATGGGGAGCTGACGCATCCGTCAAAGTGTCTTCATTTATCAAAGATG
CATAAATAACTTTTTCTATTACAGCATGGGGTTACCAATAATTAATTAATTAATTTAATCAACTACATAAACTAAGTTAATCTGAATATCCAAGCTGT
TTTTATTACTTGCACATGACCGAAGAACA

Sequências de cDNA e aminoácidos das Loxtox Incompletas:

Loxtox s1E

GAAAGACTAATAGTATAAATAACAGAATATTCTTTACTCGATTACATTCCTTTCCACTTACCACCGCTGCCATC

ATGTTGCTGAACGTTGCCGTACTTTTTAAGTTGTTGGAGCGCCTTATCCGAGGCAGTCCAA
M L L N V A V L L S C W S A L S E A V Q
ACTGATGTTGGAGAACGTGCAGATCAACGTCGGCCTATATGGATTATGGGCCACATGGTC
T D V G E R A D Q R R P I W I M G H M V
AACGCCATCTCTCAGATAGACGAGTTTGTGAACCTTGGGGCGAATTCCATCGAAACAGAC
N A I S Q I D E F V N L G A N S I E T D
GTGGCTTTTCGATAAGCAAGCCAATCCTGAATACACGCATCATGGGGTTCCATGCGATTGT
V A F D K Q A N P E Y T H H G V P C D C
GGAAGGAACTGCCGAAAAAGGAGAAGTTCACAGACTTCGTAAAGGCTCTACGAAGTTCT
G R N C R K K E K F T D F V K A L R S S

ACAACCCCCGGTGATTCCAAATATCAGGAAAACTGATCTTAGTTGTGTTGACTTAAAA
 T T P G D S K Y Q E K L I L V V F D L K
 ACGGGTAGCCTGAAGGACAATCAAGCCTACGACGCCGGAACGAAATTTGGCGAAAAATCTT
 T G S L K D N Q A Y D A G T K L A K N L
 CTACAACATTACTGGAACAATGGCAATAATGGGGGAAGATCATAACATAGTGTATCAATA
 L Q H Y W N N G N N G G R S Y I V L S I
 CCATACCTTACACATTATAAATTGATAACAGGATTTCAAGAAACGCTCAAACCGAGGGA
 P Y L T H Y K L I T G F Q E T L K T E G
 CATGAAGAATTGTTGGAGAAAGTAGGATACGACTTCTCTAGAAATGACTACATCAGTGAT
 H E E L L E K V G Y D F S R N D Y I S D
 GTTAAGGCAGCTTATAATAGAGCCGGAGTAACAGGTCATGTGTGGCAAAGCGACGGTGT
 V K A A Y N R A G V T G H V W Q S D G V
 ACCAACTGCTGGCTACGTGGGTTTGGTCGTGTAAGGAAGCTGTGGCCAACAGAGACTCC
 T N C W L R G F G R V K E A V A N R D S
 GCAGACGGATTCATTAACAAAGTATACTATTGGACAGTGGACAAACGCGCAACAACACTAGA
 A D G F I N K V Y Y W T V D K R A T T R
 AAATCACTTAATGCTGGAGTTGACGGCATAATGACCAATTACCCGGATGTCATTGCTGAT
 K S L N A G V D G I M T N Y P D V I A D
 GTCCTCAACGAAGCCGCTTACAAGACGG
 V L N E A A Y K T

Loxtox s1F

ATCCTGAATACACATACCATGGAATTCCATGCGATTGTGGAAGAAATTTGTCTTCGATGGGAA
 P E Y T Y H G I P C D C G R N C L R W E
 TATTTCAATGAATTCCTAAAGGGTCTGCGGAAAGCCACAACCTCTGGTAATTCCAAATAT
 Y F N E F L K G L R K A T T P G N S K Y
 CATAAAAACTGATCTTAGTTGTGTTGATTTAAAAACGGGTAGCCTCTACGACGATCAA
 H K K L I L V V F D L K T G S L Y D D Q
 GCCCACGTAGCAGGCACGAAATTTGGCAGATAATCTCCTACAACATTACTGGAACAATGGC
 A H V A G T K L A D N L L Q H Y W N N G
 AATAATGGTGGTAAAGCATAATACTATCCATTCCGAACACCAAACATTATAAACTC
 N N G G K A Y I I L S I P N T K H Y K L
 ATAAAAGGATTTAAAGAAACACTTAAGAACGAAGGACATGAAAAGTTGTTGAAGAAAGTC
 I K G F K E T L K N E G H E K L L K K V
 GGATATGACTTCTCTGAAAACGATAACATAACCGATATACAGAAAACCTTACAAGAAAGCC
 G Y D F S G N D N I T D I Q K T Y K K A
 GGGGTAACAGGCCACGTGTGGCAGAGCGACGGTATCACCAACTGTTTGCTACGTGGTTTT
 G V T G H V W Q S D G I T N C L L R G F
 ACTCGTGTAAATGCAGCTGTAGCAAAAAGAGACTCAGCAGACGAATTCATTAACAAAGTA
 T R V N A A V A K R D S A D E F I N K V
 TACTATTG
 Y Y

Loxtox s1G

GTGAAGAATTCGCGTCGCTTGTGACACTCACTTGACCTGTTCTTGTGTTGGTTTTCGCAAAAAGGTTTTATTACCATTATATAACCATATAACCAGGAAAAG
 CGCTTAAGAACCCTGAATGAATACCATCCTTTGGATAAATATATGAGCCTTACTACAATTTGTGAACCGAGAAAACAATAAATAAGTGAATGAAGAAAT
 CTCTTTTTTTTTCGAAATATCATATAAAAAATGAAAGGTGAACCTTTCATTGAGGCAATATAACATAATAAACTTATTTTTCCGAAACCACACAAGAACAG
 GTCAGTGAGTGTCAACGGACAACGGGAATCTCTAGCAAAAAATAAAATCTGGAGCACCACACAGGTTTTTCGACAGAGAGTTG

GCAACCCAAAACAGATGTTGAGGAACGTGCAGATAACCGTCGTCCCATATGGATTATGGGC
 A T Q T D V E E R A D N R R P I W I M G
 CACATGGTCAACAACCTCAAACAGATAGACGAATTTGTGAACCTCGGATCGAATGCCATC
 H M V N N L K Q I D E F V N L G S N A I
 GAATCAGACGTGTCTTTTCGATAAGAAAAGCTAATCCTGAATACACATAACCACGGAACCTCCA
 E S D V S F D K K A N P E Y T Y H G T P
 TG

Loxtox s6B

GAATAAGTCACGTTTGCTTTGTTTCTGAACCTTCTTTGCCGGATATGGTATTATTCTTAATTTATGGACATGAGTGCATTATTATTTTTTTTACCTA
TAGAGCTATTTGGCGAGACATGCTCTTGACAATAAAATACCTTGATCGGAACATCGAAAAGGACTGTCGACAGGGGTACAGATGCAAAAGATGCTCAAAG
GAGGTACTTGCCGCACATCAATGGAAAAGACAGAGAAAAGACGAGTTCCAACCTGCACATGNNGGGTATCGATACTGATGCTGAAGGTGATGGAGATACTC
TGCAGCCGCTGTGGATT

ATGGGACACATGGTGAATTCTATTTACCAGATAAATGAATTTCTGGATCTCGGGTCAAAT
M G H M V N S I Y Q I N E F L D L G S N
GCCCTTGAGATCGACATAACCTACGACTCACAGGCAAAAAGCGCAATACACTTACCACAAA
A L E I D I T Y D S Q A K A Q Y T Y H K
GCTCCATGTGATTGTTTCAGGGTTTGCGGCAGGTGGGAGTACATCTCACGTTACCTGAAT
A P C D C F R V C G R W E Y I S R Y L N
GAAATPAGAGAACGACAGCACTGGTAACCCGAAGTTCCGAGAACAACCTATTCTGCTT
E I R E V T A L G N P K F R E Q L I L L
ATACTGGATATGAAAAATCGACTGGATGACAGACGCCAATCAGTCGTAGCTGCTGGTGGG
I L D M K I D W M T D A Q S V V A A G G
GATATCGCATCGAAGCTCCTGGATTATTATTGGCAAAGAAAATACATCCAGTGGAAAGGGCG
D I A S K L L D Y Y W Q R N T S S G R A
TATATCATTTTGTCCATGCCTAGCGTCAGAAAATTATTGTTTTTATTCGAGGATTTAGAGCA
Y I I L S M P S V R N Y C F I R G F R A
AAACTTCAATCTGAAGGATATTACGAAAAATACAAGGAAAAAATAGGTTACGAATTTTCT
K L Q S E G Y Y E K Y K E K I G Y E F S
GGAAATGAGGATCTTGACTCAATCCATCAAGCATTGCAACGTGCAGGTGTTAGTGAACAC
G N E D L D S I H Q A L Q R A G V S E H
GTTTGGCAAAGTGACGGTATCACCAACTGTGTACCACGGGGTACAGGTAGATTGGAGAAA
V W Q S D G I T N C V P R G T G R L E K
GCTTTAATGAACAGAGAGTCTCCAACGGGATACATTGACAAAAGTGTATTTCTGGACTATA
A L M N R E S P T G Y I D K V Y F W T I
GACCTTCTAGCACAATAGAACACATACTGAGATTGGGAGTTGACGGCATAATGACCAAT
D L P S T I E H I L R L G V D G I M T N
AACCCAGATCGTGTTAATACCGCCTTAAGAGAACCAGATTCAGACCAGCTGTATATGAT
N P D R V N T A L K R T R F R P A V Y D
GATAACCCATGGACAACCTAG

D N P W T T -
TAGTATGAAGGTGTCGATGGAATTCCTTGCCTTTTCTCTGTATGGTTCCACGTTGATGTTTACGAAAAACCGCCAGTTACTTTCTGAGAAAAAGAGCTTG
TTTTCTCGTGAGAAGAAATTTGTCATCATCGTGAGAAAAAGCGGATCTGATAGACACTAAGTTTTTTCTAGTGTAGTCAAAGTCACTAGAAATTCCTGT
AGTTTCAAGCAATTAACAACAAAGACTTCTGGGTGAGATTGCCGCTAGTTAAACTGCTGCTCCTTAGCGTTTTCGTTGCGGCTGCGCCACTTTTCGTCG
GGGACTGGGGGAGATGTGGCAAGTCTGTGTAGTCTGCTATTTATATATATAAATAAATAAATAAATTTATATCCACGACAAAGAAGCTATACATAAAAT
ATACGGAACAGTTGAACAAGCAGTGATGGAGTTGCTCTCGTTAATAAGAAATATTCGTGTAAGGGAAGATTAGCAGTAGCAAGAAATGTTAGTGTAA
GTTTCATCCTCCTTGTCTGACGTAAAGCAAATGAGGTAATAAACCACGACGAGAGAGGTCACCTTTCAATGTTGGGTGGTACAACCTGAACCTAAGAT
CTGAATTCCTCCGGTTAGTATTGGTATTTCCAGAACTCTGTCATTACAGTGTGGGAAACTTAACACAGAGTTCTATACAAAGTAGAGACCGAACT
CGTATTCGCTGCCATTGCCGAGCCTGCAGGCTGCCATATTGACGTTTTGGTGGGCATAATACATAGCTGCTCCTATTACCCATATCAACATTCGTGTACA
CGTACGCTATGCTTTTTTTCATCATGATTGCAAGAAATTACATAATTTTACCAAAGTAAATCTTGAAACTTTTGACAGAGCGAAATAAATACCATGGTAA
GCTTGGAAAACACCATAACAAATAAACCCGGAAGTTTCTATGGTGAAGATATAGAGGTGTTTTTAAACTGATCTAAAATTAGGACGATCTGCACATGACGT
TATCGTAGGAACCAATAAATTTGTAATCCTTCAACGGATATAGCAACAATATATATTTTTGTTTCGTGGGAGCTTCCCTCTACTTTATGCCGGAATATATA
CTTCTTATTACCAGAAAGATTACCCCTTCAATTGCTACACTCAATGAAAAGAAATCAATTTAAAGTTCAAATATTCGTTGATAAGATATATCTAAAAGA
AGGGAATATTTTTCCATATACATGTAATAATATATAGTATCACATAAAATGACAGAAATTGATATACGGTAGTAGGATCTTTTTCAAACCACAATAGGGA
AACATGTATGTGCAGCATGGCTTTGTGATCCTATACGCCAACATGCTTACTAGCATGGATTAGACGTTTTGAAATGCTATAAATCAATATTTCA
AAATTAGTCATTTCTTAGTAATATTTGAAAGTTATTTATAGCAGATTTGTATCGATAAGTAATGAAAACCTCATAAGTACTGTGTTGAAAATAGCC
TAATCTTCGTATAAAAACATTTGTTCTCATGATGACGTCACCAATGAAAAGAAATCAATTTAAAGTTCAAATATTCGTTGATAAGATATATCTAAAAGA
GCAACATTTCCGCCACCTATGTTTTCTCCTTGTGCGCTATGGTCCCGTTCGCAATCCGGTCTCTAGTTTTTATAGAACTCTGCGACTCTAACTTCTTGA
TGTTGCCAGAACTGTTTCTATATATTGGATAATTTTAGACCTTCTCTCATGAAATCCTTGGATGTTTTATGATATCTATTGCTTCTTGAACACCTTT
CAACTAATATGGCTTCAAAACCTTATTTGATGATCTTTAGTATTGCATGTTCTGCGACAGAAGTTGGAGTTTACCAAACCGGAAATACCAATACTAAG
CGAGAAATTCGGATATTAAGGTATAAATAGCCGACTACAAACCAAAATTCGCCATCTCTTTT

Loxtox s9B

TTTTCCGATAAATTCGCCAGCGTACTGAACGAAAGTAAATACGCCAGTCCGGTTCAGATTG
F P D N F A S V L N E S K Y A S R F R L
GCTAATTACATGGACAATCCCTGGAAGAAATTCATTCCAAGTGGATCGCGCATGATTTCAG
A N Y M D N P W K K F I P S G S R M I Q
GAAAAATCTCTCGAACGAATTAGCCAGCTAGATACTGAAGAATTCCTGACAACACGTTG
E K S L E R I S Q L D T E E F T D N T L
GCACCAAAAGAGTCAAAATTTCTCATTTCTTTCTGACTGAGCTGTTTTTCTCCTGCGCA
A P K S Q N F L I P F L T E L F F S C A
CCTTCTTTAATTAATAAACTATTTTAACTTTGTATAAATACTTTAGTTCTTCTCATAAAT
P S F N Y K T I L T L Y N T L V L P I I

ACCCATTGTCTTTTACTTTGGATCAATACGTCCAATACTAACTTACATTGTATACAGATC
 T H C L L L W I N T S N T N L H C I Q I
 ACTAAAAATCGAATATACTGA
 T K N R I Y -
 ATTTATTTGGCTAAACATAATTTAGTTGCTAGTGCGCCCTTCTTTCTCGAGTTGTTTGTGTACTTATTTTATAAACTATAAATAGCTGTCTACATTTTT
 AATATAACCCAGATGTATACCTCAAGTAAAGATCAGGACTTGATATTAAGACATAATCCACGTGATTCAAGAGACGGTTCAATATACATTTTTACCAACCAG
 GCATAATTTGATTTTAAAAAGCTTCAACATTCATCCATCAGGTTGGTTGGTTGGAGTTTTACGGC

Loxtox s10C

GGAAATTATAGCATGTGGCTTGTATTCTATGTCCATGTAGGTATGAAAAATCTTGCAACATTTTTCTTGACACCCTACTTTCAAGGAAA

ATGCGATCTCTCTTCTTTTATACTTTGTTGGATCCATCATATTGATTCAGGGTGTGAA
 M R S L F L L Y F V G S I I L I Q G V E
 CAGGACAGTAGCGAGCGTGCAGATCATCGCCGCCAATATGGAACATTGCTCACATGGTC
 Q D S S E R A D H R R P I W N I A H M V
 AACGACCGGGTCTCGTGGACGAGTATTTGGACGATGGTGCAAACAGTTTGGAAATTGAC
 N D R G L V D E Y L D D G A N S L E I D
 GTCGCCCTTCGATTGGGACGGAAAAGCCGAAAAGAAATGTATCACGGTTTTCTTGGCGACTGT
 V A F D W D G K P Q R M Y H G F P C D C
 GGCAGAAATTGCTGGCGACAGCTAGGCTTTACGGAATATGTTGACTACATGCGACAACCTC
 G R N C W R Q L G F T E Y V D Y M R Q L
 ACCACTCTGGTATCCAAAATTCCTTGAAAAATCTTGTGTTAATTATGTTGACTTTGAAA
 T T P G D P K F L E N L V L I M F D L K
 TTGAACAGTTTTCCGCCGGGAAAAGTATATTCTATTGGAGAAGACGTGGCAGTCGGTCTT
 L N S F P P G K V Y S I G E D V A V G L
 CTTGACACATACTGAAAACGAGGTGAAAAGTGGCGCAAGAGCTTATATTGTACTTTCTGTT
 L D T Y W K R G E S G A R A Y I V L S V
 CCATCAGTGGAGCGTGCCTCTTTCATTACTGGGTTCTACGACAACTTCACAGCGAAGGT
 P S V E R A S F I T G F Y D K L H S E G
 TTTGACCAG
 F D Q

Loxtox s11E

AGTATAACCACTAAAAGTCACGGCAAAGTCAAATACCGATTTCCCAAAAAATTTGCTTGAGAAAATTTGTTGCTACAAAACCTCAGTTGCGGCACAGCA
 ACTAAATTAAGACCCCTGACTTTTTTTTTATCATTCTTAACTATTTTTTTGTTCCGATTCTTAGGTTATTTTCATACGGCAATTTATTACTGGAAA
 TATTTTCCCAAAAACACCTCTTATGCCAAACACTTTTCGAAAAGTAAGCCGTGAATAATCTAACAATGTATCAATCCGCAACTGTATGACTCCGACACGTA
 TTTAACATGTATTATCCCTAAACATATTTAACATGTATTATATCCCTTAAACATATCTGAACAAGTATTATACCTTCGACATTCGTCTTACAAAATGC
 CATTAACTTTAATGTCTCTTCTGACATACTAATTTCAAAAATAAAGACATTGTTCAATGA

ACATTGAACTTCATTTCTTATATACAGTTGTTGTTAATGGGCATGTTGAAAAAAGAGCT
 T L N F I S L Y T V V V N G H V E K R A
 GACAGTCGGAAGCCAATTTGGGATATTGCTCACAAGGTAAACGATCTTGAGCTGGTGGAC
 D S R K P I W D I A H K V N D L E L V D
 GAATACTTAGGGCAGCGCGCAAACGGCCTTGAGTTAGATGTGGCTTTCCAAAAGGATGGG
 E Y L G D G A N G L E L D V A F T K D G
 ACAGCAGAGAAGATGTATCATGGAATTCGGTGTGACTGCTTCAGAAGCTGTAAGAACA
 T A E A K M Y H G I P C D C F R S C K R T
 GAGGAATTCACCAAGTACATGGACT
 E E F T K Y M D

Loxtox s11F

CCGTTTTGGATTGGAGCTGGGAGACGTACGACGCCGATATGGAATGTCGCTCATATGGTT
 V L D L E L G D V R R P I W N V A H M V
 AACGCCCTTACCAAGTCGATTATTTATTTGGACATGGGTGCAAACAGCATTGAATTTGAT
 N A L Y Q V D Y Y L D M G A N S I E F D
 GTCGCATTTGATCGAGATGGGATAGCAAAGTTCACTTACCATGGTATCCCGTGGCGACTGT
 V A F D R D G I A K F T Y H G I P C D C
 TTCAGGAGTTGCACAAAATATGAAAAATTTGTTAGGTACATCAACTACGTTCCGGCAACTC

F R S C T K Y E N F V R Y I N Y V R Q L
 ACAACACCTGGAAACCCGAAGTTCCGCGAGGACCTAGTTCTACTCTTCCTGGATTTGAAA
 T T P G N P K F R E D L V L L F L D L K
 GTGAATGGTTTGTCCGCATCCGCCAAATATACAGCTGGTGCCG
 V N G L S A S A K Y T A G A

10.2 Sequências de cDNA e aminoácidos das proteínas PLD-Ls:

PLD-Ls 1

CTTTCATGGTGGAAATCAAAGACTCTTCATTTTCCGAGAAGTTCTATTACAATAGAAATT
 L S W W N S K T L H F P R S S I T I E I
 ACAGCTGTGCCGGCGCAACATTTTTCGGGAAGAGGAATCTTTAATGACAATAAAACACTT
 T A V P A Q H F S G R G I F N D N K T L
 TGGTGCGGTTTTGTGCGCTCTGTCTTTTCGAAAAGAATAAACTAGAGAGAAGGTTCTATTTT
 W C G F V A S V F R K N K L E R R F Y F
 GTTGAGATACAGGCTACAATGAGAGAATATTTTCGTGAAATAGGCGATAGGTTTAATAGC
 V G D T G Y N E R I F R E I G D R F N S
 ATGGATCTCAGTTTGATTCCAATAGTTGCCTATTTACCTAAAC
 M D L S L I P I V A Y L P K

PLD-Ls 2

AGACAGTTGTAGAGCGGAGTGGCAAACCTTGACGTTGGTGAACCTGAACTTCAGCTCTTTGACTCTCGCTAC

ATGCTCAAGGGGGAAGAAGAACAGAAAAAATGGAAGGGGTGGCTGAAGCCTTCCTGTATT
 M L K G E E E Q K K W K G W L K P S C I
 CCGATTACCATTATCCTTGTCTCATTGTCTTGTAGTTCTTCTGCCTCTCATTGGCCAG
 P I T I I L V L I V L V V L L P L I G Q
 GATGAAGAGAAGTCTGTAGAAGTTATCACACTTGGTGATTATGATCCAGAATTTAAAAAT
 D E E K S V E V I T L G D Y D P E F K N
 TGCTCAAGTCCATGCACGATTACGTTAGTGGAAAAGTATTCCTGAAAATCTGACATTTGCA
 C S S P C T I T L V E S I P E N L T F A
 GAGGGAGAACCAACTCACTTATCAGTGTGAGAGTTGGTCTCAGTTGATTGCACTGTCT
 E G E P T H L S V F E S W S Q L I A L S
 GAAAAGATCTATTGACATAGCCACGTTTTATTTACCCTGAAAGGTCAAGATATACAGCCT
 E R S I D I A T F Y S T L K G Q D I Q P
 GGTGATCCTGATCCTTCATCTTGGCAGGGTGACAAAAATATTTAGTGATTTGATGAAGGCT
 G D P D P S S W Q G D K I F S D L M K A
 GGAAGTGAAGGGGTATCAGAATTCGAATTGTTTCAGAGTCAACCAGATGATAGACAGCCA
 G T E R G I R I R I V Q S Q P D D R Q P
 GATTTTGATAACAAAGAGTTGGAAGTGAAGGTGCTGCAAAAGTACGAAATTTGGATTTT
 D F D T K E L E V K G A A K V R N L D F
 AAGAAAAATGCTTGGTTCTGGTGTCTTCACACAAAAATGTTTCTCATTGATAAAAAGCAT
 K K M L G S G V L H T K M F L I D K K H
 TTTTACATTGGGAGTGCAAAACATGGACTGGAGGTCATTAACACAGGTAAGAAGACTAGGA
 F Y I G S A N M D W R S L T Q V K E L G
 GTAGTGATCTACAACCTGTTCTTGTGTTGGCTCAAGACCTTTTTAAGATTTTTGAAGTCTAT
 V V I Y N C S C L A Q D L F K I F E V Y
 TGGCGTTTGGGTGTTCCCTAATCCTTACATCCCTCCTGAATGGCCAAATGAACTGCAGACT
 W R L G V P N P Y I P P E W P N E L Q T
 GCCATAAACAAGGATAATCCAGTTACAGTTACCATGAACAGCTCAGTAGTTCTTGATAT
 A I N K D N P V T V T M N S S V V L A Y
 ATATCCAGCTCACCACCACAAAATTTGCCCTAAAGGACGAACTACTGATATTGACAGTATT
 I S S S P P Q I C P K G R T T D I D S I

TTGGATGTGATTTTATAAAGCAGAACTTTTTGTCTATATAGCAGTAATGGACTATTTCCCT
 L D V I Y K A E T F V Y I A V M D Y F P
 ACATCTCTGTACATGGAAAAAGAACATTACTGGCCAATTATTGATGATGCTTTAAGAAAG
 T S L Y M E K E H Y W P I I D D A L R K
 GTGACTGTTGTGAAACGTCTTCAAGTTCGGCTTCTTGCAGCTACTGGAATCATACTAGA
 V T V V K R L Q V R L L A S Y W N H T R
 GCAGCAATGATTCATATCTTAATTTCTCTGAAATGCATTGAACAGTGACCTTTTTTGACATT
 A A M I P Y L N S L N A L N S D L F D I
 GAAGTGAACGTGTTTATTGTGCGGACGTACTACTGAAAGTCAAAGTAAAAATACCATTCTCC
 E V K L T F I V P T Y T E A Q S K I P F S
 AGAGTGAATCACAATAAATATATAGGTCACAGATAATGCAGCTTATGTTGGTACTTCAAAC
 R V N H N K Y M V T D N A A Y V G T S N
 TGGGCAGAGGATTACTTACAAAATACTGGTGGTGTGGCATTGTGTTTCGCAATACTGTA
 W A E D Y F T N T G G V G I V F R N T V
 TCTAACTCCACGGATGGCAACCTAATACGGGAACAAATAGAAGATGTTTTCAAACGAGAT
 S N S T D G N L I R E Q I E D V F K R D
 TGGGCATCAGAGTATGCTCATTGCTTGGCTTCGTTTAAAGAAATTCACAGCATTATAA
 W A S E Y A H S L A S F K N F T A L -

CCTGTGATATGGTCACTTGCATGCATTGTGAAAGTGATAACTATCTGGTTAACCTGTGGATTGAAGTGGGAATCGAACCAACGCTCATCTATGACCTGTG
 GATTGAAAGGAACTTTATAATATGAATCTTTTTGTGACAGAGTGCAGGTGCAATAATGCGGACCTGCACATCTTCGCACAATAATGGACTTCAATACCATAT
 TCAGTAACTGTTTCAAGCCCTTGTGTAACACAATTTTTATTATTGATGGACAAAATATAACTTGCCTGTCTGTTTTACGAGAGAAGCAAGTTTACTGCA
 TTTTGTCTGCAGAAAATCTTTATGAAGTAAATGGGATTGTAGTACATATGCCCCCTTCCCCCTCCTAAATTTCTGTATTTGAGAGTGCATTATTGTTTTT
 CCTTTGACAAAGTGCATTTATAAGCTGGAAGTTTTTATATAGCACTACATATAACATTAACCTTAAACAATATCCATATTAATTTCTAGCTGTAGTGCGC
 TTATATATATATGTAAGGTGTTTTTAAATTTAAACAGTTTGTGTATGCTGTGTTAATGTATGTTTCCCATATTTGTGTGAGGAAGGCTTATCTAGAG
 CTTTTTTTTAACTTGTGTAATTTTCAAATATATCCATCGTGAACCTGTGCTGCCGTCATTGTGAAACATTGTTTATTGTCATGTGAGAGTCTTAACAAAG
 TAGGTTACCGGTGTAATGGAATTTCTCTGTTTAAATAGGAAAATCTGTAGTGGTGTGTTTCCAGACTTAGTTTTATTGTTTTGGGTTGGGTAGTATTGAA
 AAAAAATATATATATGTTTTCAATTTTCATATTTTATACATCATTAACACACGAGAAAATCATAAGTATGTTTTAAAGTAAATATATATGATTAATTC
 ATCCAAATGCCAATATTGTGTGATTAATGGTTTTAATCATTTTAAGTGTAGTAGTGGTTTTATTATGAATTTAATGAAAAGTTATTTCAGCTAATATTTA
 AAAAAATGGAAGTGTAGCTTTGCTGTAATTTTAGAGAATGGTGTAGAATAATTTATTTTTTAAAGTAGCTATGTATAAAAATTAACAGTTCATTTAGAATA
 CTTGCAATGTTTTAAAGTAGTGAATAATGCTGCATGTATTGAATGAACATGCAGAGTATGAGATGTTAACTCATAAGCTATATAAAGTATCAATGTACAAA
 GTATGTTAATGGAATGAAACAGGATGAGTTACATGAAAATGTGTCATGTAACCTGGTTGTAACAAAATCTCGGTGAGTAGTAGAAGGAAAAAATATTAAC
 AATTCGTGAAATATTTTTTTTTCTTCCATATAAAGTAGTTTCACTTTTTGTGAAAATAAAGTGCATATCCATTTTCATATTTGTGTATATAGAGCAT
 TTTATTTGTTGAGATATTTTATTTTGTTCCTTCTAGTACATTTAGATAGTAAATATTTGTTGAAAGTGGCTTAAACTCTATTTCATTTTTTATTA
 TTTAGTTGATTCATTTCAATACATTTATGCACTGTGCTTCTTTGAGTGTATTGCTAAGTATAAATGTAATTCCTAGTGCCTGATGTTGGATGATAT
 AATTTACTATGCATAATATCTTTTTCAGACCAAAACAGCTTTTTACTACTCAAAGTACATTCGCTTATTAATGTTAAAGCTGTCATGGTCTAAGTCAC
 GAAACAGATTTTTGGGTTACTATGTGCTGCATCAATTTGGTCAACATTTGGTGCAGTGGCACACATATTTTTGGGCTTCTTCTGACTTACTGATAAGTGT
 CTTGAGATTATGATGTGACGCATATCAAAAATGTTGGCAAAATAATGCAGTATATTAATCCATAAATTTAATTTTGAATACATGTCCTTATATTCATAG
 GGTGAAATGCAGATAATCTTTTTCAGACCAAAACAGCTTTTTACTACTCAAAGTACATTCGCTTATTAATGTTAAAGCTGTCATGGTCTAAGTCAC
 TTTTCACTGGTATGATGAATTAATGCTTTTTTATGCTTGTGGCTTTTAAAGTATCAGATGGAATATGTTAATTAATATTTTAAAGTAAATGAGAAATTTAC
 TATTTTATCTTGTGAAGTTATAAACAGCAAGTGAAGTTTTAGTGTATTCAATAATTTAATAAGGATATCAGAAGTGTCTAGCACAACTATTTAAATTTAT
 TGCTGTTTTTAAATTTAATGCATAAAGTATACAGTAAATTTAATGAATGAATTTGTGATTTTCTTTAATTAATTAATTTTCACTTTTAAAGTAAATTTTCA
 AACTGCATTAGTATTTATGCTGTTATACATGTTGAGCACAGTATGCATGATGTTGTTGTAGCAGTGTGTTTTGTGTTTTAGCATGTTAGAAAATAGTAG
 AACACTTTGTGTTGATGACAGTAGTACTAGTGTAAAAGCATATTTTAGTGTGATTCATGCTCTAATGAGATGCATTTGTTTCTCATTTTATTGTTGG
 ATATAGTTGGATAAATATAAATCCAGCTGTTTACTGTTAATCAGTTAGCAAGTTTTTTATTTCAAGGAATGCATAACATCATTGTTGATACTCATGAACA
 GAAAGTTGCCTGTGATCTCATTTTAGAATGCTCAAAGCATTTTTACTTCTGTAGTGTATTTTACTTTTGTGTAAGTATTTGTGATGAATTAATGATGT
 CTTAAATTAAT
 ATGGTGATATAATGTAAGTGTCTGATATTTTACAATTTGTGTGTGGAGAAGTAAATTAATTTTGTATTTTTTCTTCAATTTTGAAGCAAAAGTTGTGAT
 AATCTTTTTAATTTGAATTTTAAAGCAAAAATCACCTCTATATAAATTTATAAATGTTGTGACAAAGTGAATCAGTTATGCTGTTTCTGTGCCCTTAA
 ATGTCATTTTAGCCTTCATATCTTTTCACATCTTTTCAATGTGAATCATGTTTTTATGAAATACTTATATATAAATATTCATAATTTGAATTAATCTTTGT
 CTAGCACTGTATAAGTACTATATATGGAATGTGTAATATAATCTTTTTACATGAAGCTTAAATTTTGTCTACCATTTCAAAGTCCAGTGTGTTAAT
 TAAATTAATTTTGTGATGTTTCTCCTATGCAATTTTTAAAAATGATTTCTGTTTCTTCAATTTGGCATCAATAATTTTTATCACATAGTTATCATTTCT
 GTTGTGATCTCTTTGAATCTCTTCAGGAAGTATTTCCCAATGAAGTACTGGTTTTATTTTTAGAAATATGTTAGCAGAAAACCTATCCTGTGGTGAATTA
 TTATATAACTATAATATCTTCCACACTCCATTGATTTTCAATGAAATGTCATATGTTTGTCAACTCCATTTTTATCTTATAAAAAATAACTATGTTTGGCA
 CTCTACGATGACTCTTGTAAATAAATACTCCTTCA

PLD-Ls 3

CCTACATGGCAATCTCCTACAATAACAAAATATCTTGAAGTTTGGTTTTGAGCAAAGATAAA
 P T W Q S P T I T N I L K F G L S K D K
 AGTAATGTTTCATCTAAGCTGGAATGGATCTTGTGTTGCCAATTGTCAAGCCTGACTTT
 S N V S S K L E L D L V L P I V K P D F
 GTTAAAAATGCCAAGCCTCCAGATGATGGAGTTCGCATTACTTGGATTGGGCACCTCTACA
 V K N A K P P D D G V R I T W I G H S T
 GTACTTCTACAGATGCATGGTTTGAATATTTTTAACAGATCCAATATTTAGTGATAGAGCA
 V L L Q M H G L N I L T D P I F S D R A
 TCACCTAGTCAAATGGTTGGTCCAAAAGCGGTATAGAGATCCACCATGCTCAATTCATGAC
 S P S Q M V G P K R Y R D P P C S I H D
 TTGCCTCATATTGATGCTGTTGTTATTAGCCATTCACATTTATGATCATTGGATTTTAAAC
 L P H I D A V V I S H S H Y D H L D F N
 ACTGTGCAGTTGCTAAATGCCA
 T V Q L L N A

10.3 Artigo publicado referente a este trabalho

Toxicon 120 (2016) 97–106



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxiconDescription of Loxtox protein family and identification of a new group of Phospholipases D from *Loxosceles similis* venom gland

Arthur Estanislau Dantas^a, A.O. Carmo^a, Carolina Campolina Rebello Horta^{a,c}, Hortênsia Gomes Leal^a, Bárbara Bruna Ribeiro Oliveira-Mendes^a, Ana Paula Vimieiro Martins^a, Carlos Chávez-Olórtegui^b, Evanguedes Kalapothakis^{a,*}

^a Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

^c Mestrado Profissional em Biotecnologia e Gestão da Inovação, Centro Universitário de Sete Lagoas, Sete Lagoas, 35701-242, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 July 2016
Received in revised form
28 July 2016
Accepted 1 August 2016
Available online 2 August 2016

Keywords:

Venom
Loxosceles
Loxosceles similis
NGS
RNA-seq
Phospholipase D
Loxtox

ABSTRACT

Envenoming resulting from *Loxosceles* spider bites (loxoscelism) is a recognized public health problem in Brazil. However, the pathophysiology of loxoscelism caused by *L. similis* bites, which is widespread in Brazil, remains poorly understood. In the present work, the RNA sequencing (RNA-Seq – Next Generation sequencing - NGS) of the *L. similis* venom gland was performed to identify and analyze the sequences of the key component phospholipase D. The sequences were aligned based on their classical domains, and a phylogenetic tree was constructed. In the bioinformatics analysis, 23 complete sequences of phospholipase D proteins were found and classified as Loxtox proteins, as they contained the characteristic domains of phospholipase D: the active site, the Mg²⁺-binding domain, and the catalytic loop. Three phospholipase D sequences with non-canonical domains were also found in this work. They were analyzed separately and named PLDs from *L. similis* (PLD-Ls). This study is the first to characterize phospholipase D sequences from *Loxosceles* spiders by RNA-Seq. These results contribute new knowledge about the composition of *L. similis* venom, revealing novel tools that could be used for pharmacological, immunological, and biotechnological applications.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Loxosceles spp. (Araneae, Sicariidae), known as brown spiders, are cosmopolitan spiders, found in the temperate and tropical regions of America, Oceania, Asia, Africa, and Europe (Platnick, 2016). Envenoming resulting from the bite of brown spiders is recognized as a public health problem in Brazil, mainly in the south and southeast regions of the country. In Brazil, brown spiders are responsible for the majority of all spider bites notified by the

Ministry of Health, with *Loxosceles intermedia* being the species of major medical importance (Ministério da saúde, 2016). However, three different *Loxosceles* species, *L. intermedia*, *Loxosceles gaucho*, and *Loxosceles laeta*, are prevalent in most of the southern states of Brazil (Magalhães et al., 2013). Furthermore, *L. similis* spiders have been detected inside residences in the city of Belo Horizonte (state of Minas Gerais), demonstrating this species' ability to adapt to the urban environment (Machado et al., 2005). *L. similis* is also considered a public health problem in the state of Minas Gerais.

The bites of *Loxosceles* spiders produce several symptoms that are called loxoscelism. Dermonecrosis and inflammation at the site of the bite are considered the most important and common clinical manifestations, and have been documented in detail (Veiga et al., 2001; Zanetti et al., 2002; da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004; Horta et al., 2013; Pereira et al., 2014). Some cases present complications, such as systemic hemolysis and coagulopathy, leading to acute renal failure and eventually death (da Silva et al., 2004; Guimarães et al., 2013).

Abbreviations: NGS, Next-generation sequencing; PLD, Phospholipase D; RNA-Seq, RNA sequencing; Smase D, Sphingomyelinase D.

* Corresponding author. Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP 31270-901, Brazil.

E-mail addresses: arthurestanislau@gmail.com (A.E. Dantas), anderson.o.carmo@gmail.com (A.O. Carmo), carolinacampolina@yahoo.com.br (C.C.R. Horta), hgomesleal@gmail.com (H.G. Leal), barbarab.mendes@gmail.com (B.B.R. Oliveira-Mendes), anavimartins@gmail.com (A.P.V. Martins), olortegi@icb.ufmg.br (C. Chávez-Olórtegui), ekalapo@icb.ufmg.br (E. Kalapothakis).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.002>

0041-0101/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The severity of loxoscelism prompted scientific groups around the world to study *Loxosceles* venoms. *Loxosceles* spider venoms contain several proteins, such as astacin-like metalloproteases, hyaluronidases, and low molecular mass insecticidal peptides, characterized as ICK peptides (da Silva et al., 2004; de Castro et al., 2004; Barbaro et al., 2005; da Silveira et al., 2007b; Gremski et al., 2010; Matsubara et al., 2013; Trevisan-Silva et al., 2013).

A set of proteins of approximately 30–35 kDa has been identified as the major components responsible for the lethal effects of loxoscelism. Due to the skin lesions caused by these components, they were named dermonecrotic toxins (Barbaro et al., 1992; Futrell, 1992). Thus, the biochemical characterization of the dermonecrotic toxins in *Loxosceles* venom was investigated. Kurpiewski et al. (1981) were the first to describe these proteins as sphingomyelinases D, with several authors using the term SMase D as a synonym for dermonecrotic toxins from brown spider venoms.

Subsequently, Merchant et al. (1998, 1997) showed that SMase D proteins also hydrolyze other types of lipids besides sphingomyelin, such as lysophosphatidylcholine (LPC). Other studies have also shown that SMase D has an even broader range of molecular targets, such as lysophospholipids LPI (18:1-1-oleoyl lysophosphatidylinositol), LPS (18:1-1-oleoyl-lysophosphatidylserine), LPG (18:1-1-oleoyl-lysophosphatidylglycerol), LBPA (18:1-1-oleoyl-lysobisphosphatidic acid), lyso-platelet-activating factor (C16:0), and cyclic phosphatidic acid (Van Meeteren et al., 2004; Lee and Lynch, 2005; Chaim et al., 2011). Therefore, it was suggested that SMases D would be better designated as Phospholipase D (PLDs).

Over the last 25 years, PLD toxins have been identified in several spider venoms from *Loxosceles* genus, including *L. laeta* (Fernandes Pedrosa et al., 2002), *L. gaucho* (Barbaro et al., 1992; Cunha et al., 2003), *L. intermedia* (Barbaro et al., 1996; Tambourgi et al., 1998), and *L. similis* (Silvestre et al., 2005; Gomes et al., 2011; Chatzaki et al., 2012). PLD toxins have also been identified from other spider genera, such as *Sicarius* (Binford and Wellsa, 2003). However, some PLDs expressed in the venom glands may not present any detectable action, such as necrotic activity. Therefore, Kalapothakis et al. (2007) proposed a broader name for the set of homologous genes from *Loxosceles* as Loxtox. Studies on Sicariidae spider venoms and their SMase D proteins also suggested the use of the gene family name *SicTox* as a suitable name (Binford et al., 2009).

Although the Loxtox family has already been described for *L. intermedia* venom and the venom of other species, it has not been fully characterized for the venom of *L. similis* spiders. Since there are only general and preliminary studies on *L. similis* venom composition, its molecular characterization is required. As *L. similis* spiders have become synanthropic, leading to the clear possibility of an increase in the number of envenomation cases in urban areas, it is important to determine their venom fingerprint.

The current study aimed to perform the RNA sequencing (RNA-Seq) of the venom glands from the *L. similis* spider, searching for Loxtox proteins and their isoforms. This is the first study to use the Next Generation sequencing (NGS) technique to describe a broad spectrum of PLDs from *Loxosceles* venom.

2. Materials and methods

2.1. Spider collection and RNA extraction

Loxosceles similis spiders were collected in a cave used for tourism, “Gruta da Lapinha” (43° 57' W, 19° 33' S), located in Parque

Estadual do Sumidouro, Lagoa Santa (Minas Gerais, Brazil), under a license from the “Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais” (IEF/MG, license number 047.2012). The specimens were identified using the method described by Gertsch (1967).

The venom glands of 35 *Loxosceles* spiders were removed, as described by Da Silveira et al. (2002). Total RNA was extracted from the pool of venom glands using TRI Reagent (Sigma-Aldrich, MO, USA) following the manufacturer's instructions. The total RNA was purified, quantified using the Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies, MD, USA), and stored at –80 °C until cDNA library construction.

2.2. cDNA library and sequencing

The RNA-Seq library was constructed using the TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 according to the manufacturer's instructions (Illumina, CA, USA). The library was sequenced in an Illumina MiSeq sequencer in two runs, using the paired-end strategy in both runs. The first run was performed using MiSeq Reagent Kit v3 300 cycles (2 × 150), and the second run was performed using MiSeq Reagent Kit v3 600 cycles (2 × 300), according to the manufacturer's protocol (Illumina, CA, USA).

Illumina paired-end reads of both libraries were trimmed using CLC Genomics Workbench 8.5.1 software (<https://www.qiagenbioinformatics.com>). Reads of less than 40 pb and bases with a Phred quality value lower than Q28 were excluded from the subsequent analysis. Then, both libraries were combined to generate a more complex analysis. These trimmed sequences were assembled *de novo* in contigs (consensus DNA sequence obtained from several overlapping DNA fragments) using the Trinity assembler (Grabherr et al., 2011). The CLC Genomics Workbench 8.5.1 software was also used for *de novo* assembly and expression analysis of the Loxtox using the RNA-Seq Analysis tool. Sequences were deposited in the GenBank online database.

2.3. Analysis of the contigs

To select the contigs that presented high similarity with PLD enzymes, the BLASTx program from the standalone package (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK52640/>) was used. The database used was downloaded from the NCBI website, with the following search terms: (((Phospholipase D[Title]) OR Sphingomyelinase D[Title]) OR Dermonecrotic protein) NOT inhibitor). After that, the BLASTx results were analyzed. Contigs with alignments <100 pb, low identity (<45%), and high e-value (>1⁻¹⁰) were cut off and were excluded from further analysis. With the residual contigs, we used the Blast2GO annotation software to obtain a more precise match in the GenBank nr-database. After these strategies, 31 sequences that matched with PLDs remained, being 23 complete sequences.

Subsequently, the 23 complete contigs were taken to the ExpASY (SIB Bioinformatics Resource Portal) (Gasteiger et al., 2005) to be translated in the correct open reading frame. Finally, the translated sequences were analyzed using SignalP 4.1 (Petersen et al., 2011) and Prop 1.0 (Duckert et al., 2004) programs to locate all signal peptides and propeptides, respectively. This workflow is shown in Fig. 1.

2.4. Similarity evaluation of the sequences

The translated contigs were aligned in MEGA 6 software using the Clustal W algorithm (Thompson et al., 1994). A phylogenetic tree based on the alignment was constructed using the neighbor-

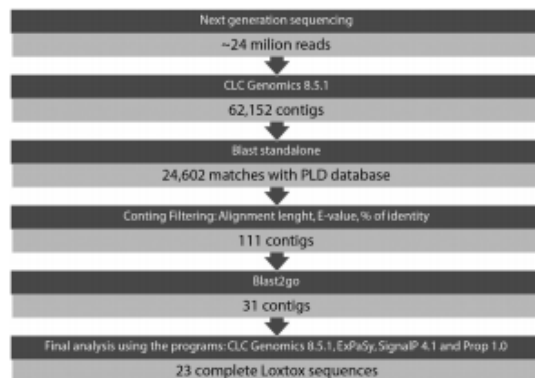


Fig. 1. Next Generation sequencing (NGS) and bioinformatic analysis workflow. The venom gland transcriptome of *Loxosceles similis* revealed by NGS generated approximately 24×10^6 reads. Reads were assembled in 62,152 contigs and, after the Blast standalone analysis, 24,602 contigs matched PLDs from the PLD database. After filtering by Alignment length (minimum of 100 aa), percentage of identity (minimum 45%) and e-value (smaller than 10^{-10}), 111 contigs remained. Later, the Blast2go analysis reduced the number to 31 complete or incomplete sequences matching PLDs in the nr-database. Finally, sequences were grouped and 23 PLD complete sequences were obtained and analyzed.

joint algorithm (Zuckerandl and Pauling, 1965; Tamura et al., 2011). To support tree construction and obtain a more accurate result, other PLD sequences that presented high similarity with *L. similis* PLD sequences were downloaded from the GenBank database. These sequences included: the described Loxtox for *Loxosceles* spiders and PLDs from other genera: [Loxtox i1 (EF535250.1); Loxtox i2 (EF535251.1); Loxtox i3 (EF535252.1); Loxtox i4 (EF535253.1); Loxtox i5 (EF535254.1); Loxtox i6 (EF535255.1); Loxtox i7 (EF535256.1); and Phospholipase D isoform 1 (GU121905.1)]. The UniProt database was used to download sequences of: [Phospholipase D LgSicTox-alphaA1 (Q4VDB5); Phospholipase D Sphingomyelin phosphodiesterase D LrSicTox-alphaB1 (KK119725.1); Phospholipase D LiSicTox-betaID1 (Q1W694); Phospholipase D SdSicTox-betaIF1 (CQJB55); Phospholipase D LiSicTox-alphaA1a (POCE80); and Phospholipase D LiR-ecDT7 (PDDM60)]. To facilitate the interpretation and visualization of the phylogenetic tree, PLD sequences downloaded from the nr-database, along with their described pharmacological activity, are shown beside the Loxtox s tree. Finally, we used CLC Genomics Workbench 8.5.1 software (<https://www.qiagenbioinformatics.com>) to quantify the expression pattern of the complete Loxtox sequences obtained in this work.

3. Results and discussion

The Loxtox protein family is the most studied and well-characterized group of toxins derived from *Loxosceles* venoms (Kurpiewski et al., 1981; Futrell, 1992; Tambourgi et al., 1998; Kalapothakis et al., 2007; Dias-Lopes et al., 2010; Gomes et al., 2011; Gremski et al., 2014; Coronado et al., 2015). The set of homologous genes that code for PLD is well expressed in the venoms from *Loxosceles* spiders and their sister genus *Sicarius* (Kalapothakis et al., 2007; Fernandes-Pedrosa et al., 2008; Binford et al., 2009; Gremski et al., 2010).

Many reports have shown that native and recombinant PLDs

obtained from *Loxosceles* venoms provoke a massive inflammatory response, dermonecrosis, complement-dependent or independent hemolysis, and platelet aggregation (Barbaro et al., 1996; Tambourgi et al., 1998; Chaves-Moreira et al., 2009; Tavares et al., 2011; Chatzaki et al., 2012; Pereira et al., 2012, 2014). As these symptoms are among the most relevant for loxoscelism, PLDs are considered the key toxins from *Loxosceles* venom. The possible biochemical and biological activities of the several Loxtox proteins are shown in Fig. 3.

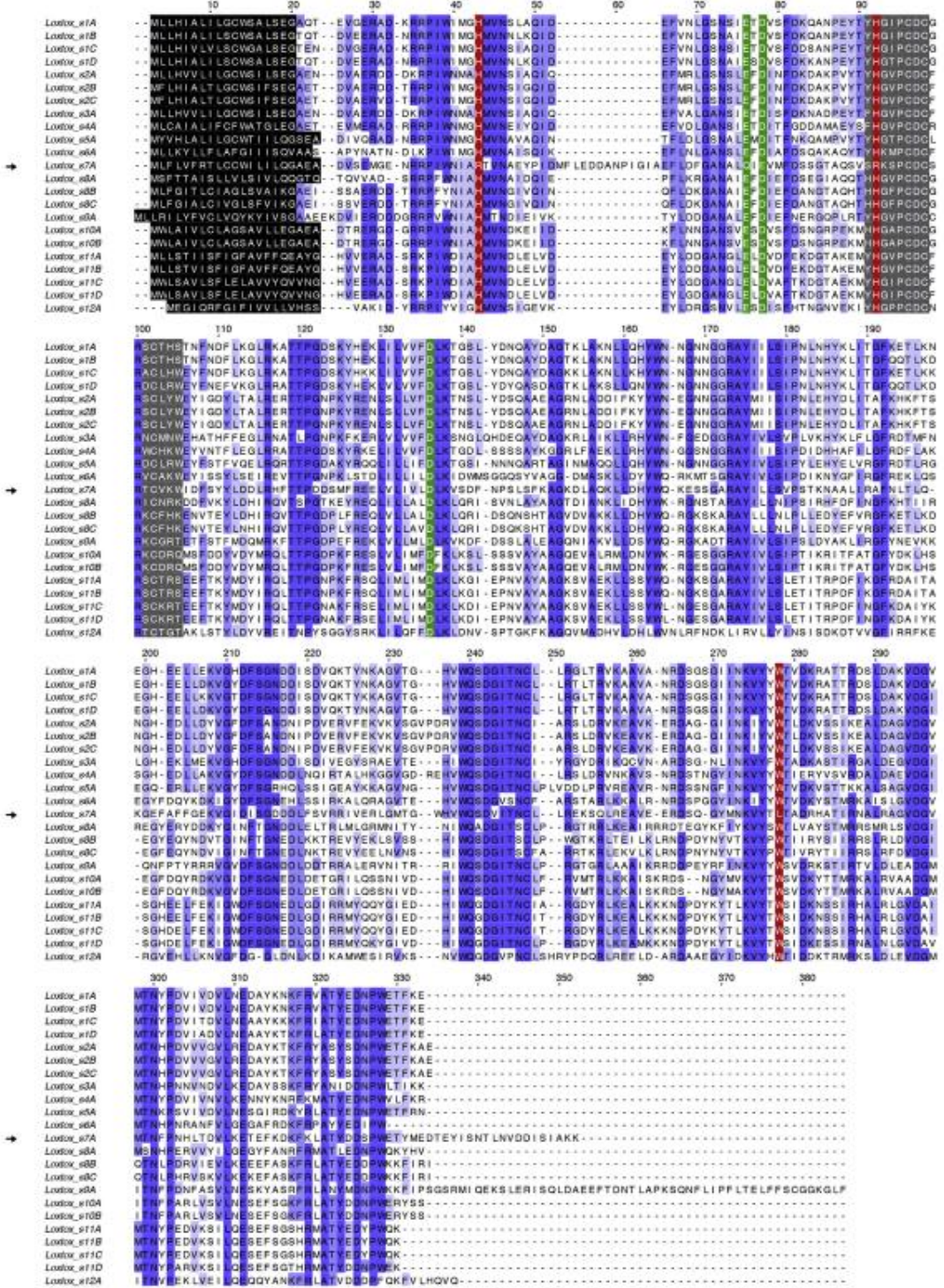
The venoms of different *Loxosceles* species have similar biochemical and pharmacological profiles, including sphingomyelinase/PLD activity. Our group has been studying the crude venom from *L. similis* for the last 10 years (Barbaro et al., 2005; Silvestre et al., 2005; Binford et al., 2009; Chatzaki et al., 2012; Dantas et al., 2014). Here, we identified the main PLD toxins from *L. similis* venom as an important step to understand the venom composition and its potential effects on humans.

Our bioinformatics analysis generated a total of 31 proteins with strong similarity to PLDs. Among these sequences, 23 were complete (see Fig. 1 for details). The 23 complete sequences showed classic features of Loxtox family proteins, and were named Loxtox s (letter "s" from *similis*). According to their amino acid sequence similarities, the 23 Loxtox toxins were separated into 12 subgroups. To classify sequences from the same Loxtox s subgroup, we included a letter after the group number (e.g., group 1: Loxtox s1A, Loxtox s1B, Loxtox s1C. Group 2: Loxtox s2A, Loxtox s2B, etc.).

The 23 complete Loxtox sequences are putative *Loxosceles* PLDs because they present the well-described active site in their primary structure, along with the Mg^{2+} -binding domain, and matched other PLDs in the nr-database. When analyzed in the nr-database, these sequences matched PLDs from other species, such as *L. intermedia*, *L. laeta*, and *L. gaucho*. Apart from these 31 sequences, three other putative PLD sequences were identified. These three PLDs differ from traditional Loxtox because they lack the Mg^{2+} -binding domain and contain a catalytic site that differ to the one previously described for Loxtox proteins. Also, these PLDs presented low similarity when aligned with Loxtox PLDs.

Fig. 2 shows the alignment of the 23 complete Loxtox s sequences. The amino acids (aa) were numbered relative to the largest sequenced protein, which was Loxtox s9A (372 aa length). Complete Loxtox s toxins are approximately 320 residues in length, including the signal peptide. Loxtox s proteins presented a significant level of identity (from 54% to 99%), in particular in the catalytic site (marked in red) and the Mg^{2+} -binding domain (marked in green) (Fig. 2).

One interesting PLD group showed in the alignment was the Loxtox s7 group (Fig. 2, black arrow). Loxtox s7A was the only Loxtox protein identified in this work with a mutation in their catalytic site (Fig. 2, marked in red). Loxtox s7A contained two arginine residues that replaced histidine residues H43R and H92R in the catalytic site (Fig. 2). We also identified two other mutations in the Mg^{2+} -binding domain (Fig. 2, marked in green), one glutamine replaced a glutamic acid (E76Q) and one glutamic acid replaced aspartic acid (D78E). Because Loxtox s7A presents mutations in residues that are important for PLD activity (Vuitika et al., 2013), this protein may have impaired function, at least for mammals. Therefore, Loxtox s7A could potentially be used in immunization for serum production. In fact, a number of studies have already started isolating and characterizing inactive peptides that are efficient epitopes to generate neutralizing antibodies (Chávez-Olórtegui et al., 1997; Moreira-Ferreira et al., 1998; Martin-Eauclair et al., 2006; Mendes et al., 2013).



After the PLD contig sequences from the *L. similis* venom gland were aligned, a phylogenetic tree was constructed using the 23 complete Loxtox s sequences (Fig. 3). The sequences of several PLDs obtained from the GenBank nr-database were also analyzed. The bootstrap statistical test was used to assess the reliability of the branches. For this analysis, the reliable bootstrap value was 70. When the bootstrap value was below 70, the evolutionary divergence time on the branch could not be estimated; however, the grouping according to similarities was not affected. Therefore, sequences belonging to the same group may exhibit similar activity.

The third column of Fig. 3 shows the previously described biochemical and biological activities assigned to PLDs, the sequences of which were downloaded from the nr-GenBank database. These PLDs were the most similar ones to the Loxtox groups described in the present work. The analysis showed two groups, Loxtox s12 and Loxtox s8, which aligned with toxins from different spider genera (Fig. 3). Loxtox s12 presented 56% of amino acid identity with Sphingomyelin Phosphodiesterase D LrSicTox-alphaB1 from the spider *Stegodyphus mimosarum*, the sequence of which was directly submitted by Berschgaard group in 2013 (KFM76547). The Loxtox s8 group presented an average of 65% amino acid identity with the Phospholipase D SdSicTox-beta1B1bvi from *Sicarius damarensis*, of which a partial sequence was published by Binford et al. (2009).

Using the CLC Genomics Workbench 8.5.1 software to analyze the expression level of the Loxtox proteins described in this work (Fig. 4; Table 1), we concluded that the Loxtox sequences corresponded to 15% of the expression pattern of the *L. similis* venom gland (Fig. 4A). Of this percentage, Loxtox groups s1 and s11 were responsible for 72.4% of Loxtox expression. Loxtox s3 group represented 8.6% transcripts, and Loxtox s9 represented 8.3% transcripts, while Loxtox s2 and Loxtox s10 combined represented 8.8% transcripts. All of the other groups combined corresponded to 1.9% of Loxtox s expression (Fig. 4B). Loxtox s1 and s11 are the most expressed Loxtox s proteins, with high similarity (above 89%) to previously described PLDs (Fig. 3).

Table 1 shows the percentage expression for each Loxtox s protein. Loxtox s1A and s1C presented the highest expression values, 24.798% and 12.681%, respectively. Several other Loxtox toxins presented expression percentages between 5% and 10%, such as s1B, s1D, s3A, s9A, s11A, and s11D, and might also be important for envenomation by *L. similis*. The detected incomplete PLDs sequences (marked with an asterisk on Table 1) represented a total of 3.645% of Loxtox expression.

Table 2 presents the data obtained from PLD-Ls1, PLD-Ls2, and PLD-Ls3 (Phospholipase D from *Loxosceles similis*) after the Blastx analysis. From these three proteins, only PLD-Ls2 presented complete sequencing. Two of these PLDs matched with PLD enzymes from spider genera other than *Loxosceles*. In addition, these PLDs did not have typical PLD domains, as characterized for the 23 complete Loxtox s sequences. For instance, the catalytic sites for PLD-Ls2 (Fig. 5, red color) were H¹⁹⁰, K¹⁹², S²⁰⁵, N²⁰⁷, and E²¹⁸.

Although all PLD-Ls sequences obtained through RNA-Seq from the *L. similis* venom gland matched with PLDs, we could not confirm whether they contributed to venom noxious activity or whether they were exclusively related to cell metabolism (Table 2). For instance, PLD-Ls 3 and PLD-Ls 2 matched with PLD sequences deduced from a genome study carried out on the spider *Stegodyphus mimosarum* (Table 2), an African social velvet spider that is found in the eastern regions of southern and eastern Africa and in Madagascar. Colony propagation is known to occur by colony-budding and by the short-distance dispersal of females (Johannesen et al., 2009). To date, PLD function or cell localization has yet to be conducted on *S. mimosarum*.

PLD-Ls 2 was aligned with Phospholipase D3 from the spider *S. mimosarum* (Table 2, Fig. 5). Comparison of the two deduced mature amino acid sequences showed 93% similarity and 84% identity. The deduced amino acid sequence for PLD-Ls2 contig (549 aa) showed a predicted molecular mass of 54.30 KDa. PLD-Ls 2 is 93 residues longer than the members of Loxtox s6 group, which is the largest *L. similis* Loxtox group, with 372 amino acids in length and a predicted molecular mass of 42.21 KDa.

The partial sequence described for PLD-Ls1 showed 56% identity (from residues 135 to 228; data not shown) with a PLD described for the bacteria *Simkania negevensis* z, suggesting that an organism similar to *S. negevensis* could be present in the venom gland of *L. similis*. Alternatively, a gene transfer may have occurred or contamination may have occurred when removing the venom gland. However, contamination was unlikely because the venom glands were carefully removed from the cephalothorax of *L. similis*, with RNA being extracted immediately. Cordes and Binford (2006) described strong evidence for the lateral gene transfer of PLD between spiders and bacteria. However, we suggest the first hypothesis is most likely, specifically for PLD-Ls1. First, the bacteria *S. negevensis* belongs to the *Chlamydiae* class, an obligate intracellular pathogen (Everett et al., 1999). *Chlamydia* is associated with respiratory infections, such as pneumonia, bronchiolitis, and chronic obstructive pulmonary disease in children and adults (Kose et al., 2015). In addition, *S. negevensis* infects and efficiently replicates in insect cells (Sixt et al., 2012). Second, a relationship between bacteria and arachnida has already been described for the bacterium *Wolbachia* and the scorpion *Tityus serrulatus* (Suesdek-Rocha et al., 2007). Finally, we found at least 64 different proteins (others than PLDs) in the *L. similis* transcriptome, which match with deposited sequences from *S. negevensis* z.

4. Conclusions

In summary, we presented the first study using NGS for transcriptome analysis of the venom gland of *L. similis* spiders. As a result, identified 12 groups of PLDs that contain 23 complete and 8 incomplete protein sequences. The 23 complete proteins presented the conserved domains of the PLDs characterized for *Loxosceles* spider venom, and were classified as members of the Loxtox gene family. Because important characteristics from the Loxtox family

Fig. 2. *Loxosceles similis* PLD/Loxtox alignment. Sequences of PLDs from *L. similis* venom were aligned using Clustal W algorithm. The amino acids marked in different shades of blue present different degrees of conservation among these sequences, the dark blue are most conserved sites. Amino acids marked in red constitute Histidine and Tryptophan residues involved in catalysis for these enzymes. The region marked in gray is the catalytic loop for Loxtox proteins, and amino acids marked in green are related to the Mg²⁺-binding domain. Region marked in black represents the signal peptide for each sequence. Sequences indicated with an arrow present a mutation in their catalytic and Mg²⁺-binding site. Notes: accession number for the complete Loxtox proteins: Loxtox_s1A KU891936; Loxtox_s1B KU891937; Loxtox_s1C KU891938; Loxtox_s1D KU891939; Loxtox_s2A KU891943; Loxtox_s2B KU891944; Loxtox_s2C KU891945; Loxtox_s3A KU891946; Loxtox_s4A KU891947; Loxtox_s5A KU891948; Loxtox_s6A KU891949; Loxtox_s7A KU891951; Loxtox_s8A KU891952; Loxtox_s8B KU891953; Loxtox_s8C KU891954; Loxtox_s9A KU891955; Loxtox_s10A KU891957; Loxtox_s10B KU891958; Loxtox_s11A KU891960; Loxtox_s11B KU891961; Loxtox_s11C KU891962; Loxtox_s11D KU891963; Loxtox_s12A KU891966. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

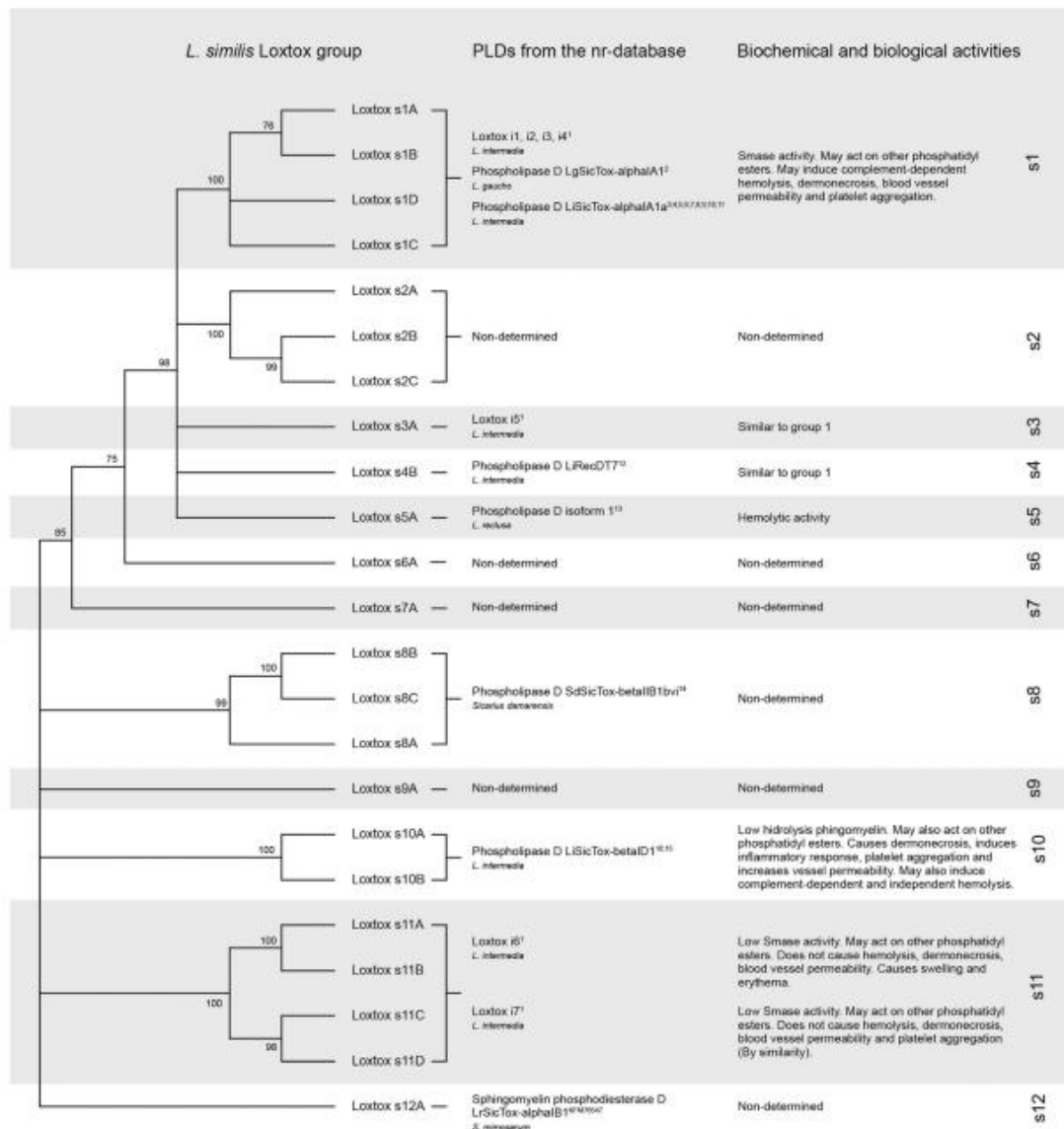


Fig. 3. Phylogenetic neighbor-join tree with the sequenced PLD/Loxtox from *Loxosceles similis* venom. The proteins downloaded from the GenBank nr-database with high similarity to the Loxtox s proteins are listed with their original names beside the tree. Loxtox s sequences are separated in 12 groups (s1 to s12). On the left, it is shown the phylogenetic tree with the PLDs from *L. similis* venom. The bootstrap values that exceeded the cutoff threshold of 70 are shown above the tree branches. The middle column shows the best nr-database matching proteins for each group of Loxtox s. On the right side, the main biochemical and biological activities described for the PLD database sequences are listed. Notes: References: ¹{Kalapothakis et al., 2007}; ²{Silvestre et al., 2005}; ³{Tambourgi et al., 2004}; ⁴{da Silveira et al., 2006}; ⁵{Chaim et al., 2006}; ⁶{Tambourgi et al., 1998}; ⁷{Kusma et al., 2008}; ⁸{de Oliveira Christoff et al., 2008}; ⁹{Chaves-Moreira et al., 2009}; ¹⁰{Chaves-Moreira et al., 2011}; ¹¹{Ullah et al., 2011}; ¹²{Vutika et al., 2013}; ¹³{Catalán et al., 2011}; ¹⁴{Binford et al., 2009}; ¹⁵{da Silveira et al., 2007a}.

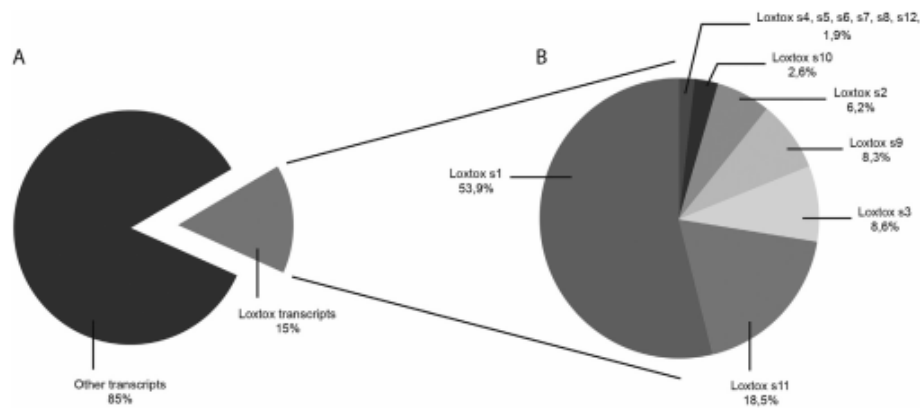


Fig. 4. Loxtox transcripts from *Loxosceles similis* venom gland. A) The percentage of Loxtox proteins expression when compared to the whole *L. similis* venom gland transcriptome. B) The relative proportion of each Loxtox group.

Table 1
Expression pattern for the Loxtox s proteins.

Loxtox protein	Individual expression, %	Group expression, %
Loxtox s1A	24,7987	53,867
Loxtox s1B	6,1997	
Loxtox s1C	12,6813	
Loxtox s1D	6,5496	
Loxtox s1E ^a	3,6159	
Loxtox s1F ^a	0,0187	
Loxtox s1G ^a	0,0035	
Loxtox s2A	0,0345	6238
Loxtox s2B	4,6528	
Loxtox s2C	1,5509	
Loxtox s3A	8,6158	8616
Loxtox s4A	1,0051	1005
Loxtox s5A	0,0093	0,009
Loxtox s6A	0,0009	0,024
Loxtox s6B ^a	0,0235	
Loxtox s7A	0,1221	0,122
Loxtox s8A	0,0226	0,729
Loxtox s8B	0,2931	
Loxtox s8C	0,4136	
Loxtox s9A	8,3304	8331
Loxtox s9B ^a	0,0008	
Loxtox s10A	1,9096	2548
Loxtox s10B	0,6365	
Loxtox s10C ^a	0,0022	
Loxtox s11A	7,4210	18,506
Loxtox s11B	1,3411	
Loxtox s11C	0,1788	
Loxtox s11D	9,5612	
Loxtox s11E ^a	0,0036	
Loxtox s11F ^a	0,0004	
Loxtox s12A	0,0025	0,002

Notes: Accession number for the incomplete proteins: Loxtox_s1E KU891940; Loxtox_s1F KU891941; Loxtox_s1G KU891942; Loxtox_s6B KU891950; Loxtox_s10C KU891959; Loxtox_s11E KU891964; Loxtox_s11F KU891965.

^a Incomplete sequences detected in this work.

were absent, whereas domains that allowed inferring phospholipase activity were present, three sequences were classified as phospholipase D from *L. similis* (PLD-Ls). It is unclear whether the PLD-Ls are directly involved in the envenoming process. For instance, PLD-Ls may be involved in general physiological processes

such as exocytosis, cell migration, and membrane trafficking. Thus, the present work provided novel information about the Loxtox gene family from *L. similis* spider venom, opening new paths for the discussion and investigation of venom composition and its biological actions.

Table 2
Bioinformatic data obtained for the PLD-Ls (Phospholipases D from *Loxosceles similis*) proteins.

Sequence Blast hit	Sequencing length (aa)	% of identity with blast hit	Species
PLD-Ls 1 N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D [<i>S. negevensis</i> Z] ^a NCBI Reference Sequence: emb CCB88845.1	94 aa	56	<i>S. negevensis</i> Z (Bacterium)
PLD-Ls 2 Phospholipase D3, partial (GenBank: KK115759.1)	478 aa	84	<i>S. mimosarum</i> (Spider)
PLD-Ls 3 N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D, partial (GenBank: KK120217.1)	127 aa	77	<i>S. mimosarum</i> (Spider)

Notes: Abbreviations: *S. negevensis* Z (*Simkania negevensis* Z); *S. mimosarum* (*Stegodyphus mimosarum*).

Accession number for the PLD-Ls proteins: PLD-Ls_1 KU891933; PLD-Ls_2 KU891934; PLD-Ls_3 KU891935.

^a References: (Collingro et al., 2011).

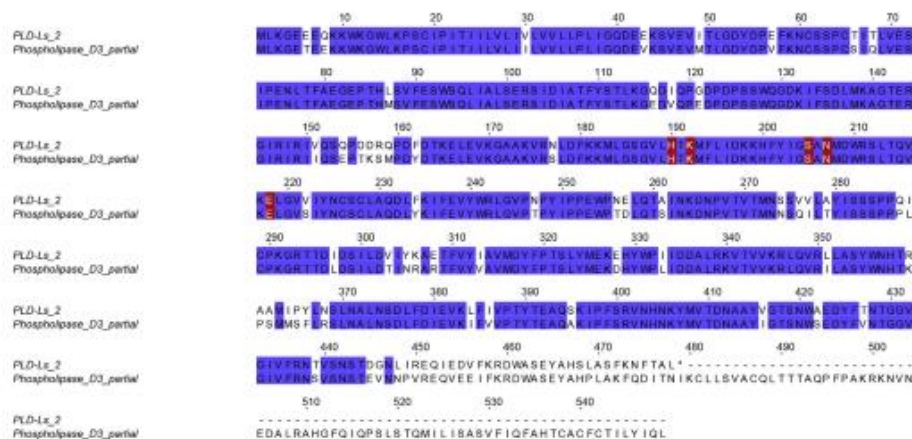


Fig. 5. Alignment between PLD-Ls 2 and the partial sequence of Phospholipase D3 from *Stegodyphus mimosarum* (GenBank database KFM65948.1). Amino acids marked in blue are common to both proteins. The putative amino acid residues involved in the catalysis for both enzymes are marked in red. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Conflict of interest

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Grant Numbers: Edital Toxinologia 63/2010; and PNPD AUXPE 2262/2011).

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.002>.

References

- Barbato, K.C., Cardoso, J.L., Eickstedt, V.R., Mota, L., 1992. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucha* spider venom. *Toxicon* 30, 331–338.
- Barbato, K.C., Ferreira, M.L., Cardoso, D.J., Eickstedt, V.R., Mota, L., 1996. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. *Braz. J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. medicas biologicas/Soc. Bras.*

Biofisica. [et al.] 29, 1491–1497.

- Barbato, K.C., Knysak, I., Martins, R., Hogan, C., Winkel, K., 2005. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* 45, 489–499. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.12.009>.
- Binford, G.J., Bodner, M.R., Cordes, M.H.J., Baldwin, K.L., Rynerson, M.R., Burns, S.N., Zobel-Thropp, P.A., 2009. Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicutid spider venoms. *Mol. Biol. Evol.* 26, 547–566. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msn274>.
- Binford, G.J., Wells, M.A., 2003. The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogynae spiders. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 135, 25–33. [http://dx.doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00045-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00045-9).
- Catalán, A., Cortes, W., Sagua, H., González, J., Araya, J.E., 2011. Two new phospholipase D isoforms of *Loxosceles laeta*: cloning, heterologous expression, functional characterization, and potential biotechnological application. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 25, 393–403. <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.20399>.
- Chaim, O.M., Da Silveira, R.B., Trevisan-Silva, D., Ferrer, V.P., Sade, Y.B., Bóia-Ferreira, M., Gremski, L.H., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Takahashi, H.K., Toledo, M.S., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2011. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1811, 84–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.11.005>.
- Chaim, O.M., Sade, Y.B., da Silveira, R.B., Toma, L., Kalapothakis, E., Chávez-Olórtegui, C., Mangili, O.C., Gremski, W., von Dietrich, C.P., Nader, H.B., Sanches Veiga, S., 2006. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211, 64–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2005.05.015>.
- Chatzaki, M., Horta, C.C., Almeida, M.O., Pereira, N.B., Mendes, T.M., Dias-Lopes, C., Guimarães, G., Moro, L., Chávez-Olórtegui, C., Horta, M.C.R., Kalapothakis, E., 2012. Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom. *Toxicon* 60, 21–30. <http://dx.doi.org/>

- 10.1016/j.toxicon.2012.03.007.
- Chaves-Moreira, D., Chaim, O.M., Sade, Y.B., Paludo, K.S., Gremski, L.H., Donatti, L., de Moura, J., Mangili, O.C., Gremski, W., da Silveira, R.B., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2009. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. *J. Cell. Biochem.* 107, 655–666. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.22148>.
- Chaves-Moreira, D., Souza, F.N., Fogaça, R.T.H., Mangili, O.C., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2011. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. *J. Cell. Biochem.* 112, 2529–2540. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.23177>.
- Chávez-Olortegui, C., Kalapothakis, E., Ferreira, A.M., Ferreira, A.P., Diniz, C.R., 1997. Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 35, 213–221.
- Collingro, A., Tischler, P., Weinmaier, T., Penz, T., Heinz, E., Brunham, R.C., Read, T.D., Bavoil, P.M., Sachse, K., Kahane, S., Friedman, M.G., Rattai, T., Myers, G.S.A., Horn, M., 2011. Unity in variety—the pan-genome of the Chlamydiae. *Mol. Biol. Evol.* 28, 3253–3270. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr161>.
- Cordes, M.H.J., Binford, G.J., 2006. Lateral gene transfer of a dermonecrotic toxin between spiders and bacteria. *Bioinformatics* 22, 264–268. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti811>.
- Coronado, M.A., Ullah, A., Silva, L.S., Vuitika, L., Chaim, O.M., Veiga, S.S., Chahine, J., Murakami, M.T., Arni, R.K., 2015. Structural insights into substrate binding of brown spider venom class II phospholipases D. *Curr. Protein Pept. Sci.* 1, 768–774.
- Cunha, R.B., Barbaro, K.C., Muramatsu, D., Portaro, F.C.V., Fontes, W., de Sousa, M.V., 2003. Purification and characterization of loxocrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucho* brown spider venom. *J. Protein Chem.* 22, 135–146.
- da Silva, P.H., da Silveira, R.B., Appel, M.H., Mangili, O.C., Gremski, W., Veiga, S.S., 2004. Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon* 44, 693–709. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.07.012>.
- Da Silveira, R.B., Dos Santos Filho, J.F., Mangili, O.C., Veiga, S.S., Gremski, W., Nader, H.B., Von Dietrich, C.P., 2002. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. *Toxicon* 40, 815–822. [http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00078-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00078-8).
- da Silveira, R.B., Pigozzo, R.B., Chaim, O.M., Appel, M.H., Dreyfuss, J.L., Toma, L., Mangili, O.C., Gremski, W., Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2006. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. *Biochimie* 88, 1241–1253. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2006.02.008>.
- da Silveira, R.B., Pigozzo, R.B., Chaim, O.M., Appel, M.H., Silva, D.T., Dreyfuss, J.L., Toma, L., Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., Gremski, W., 2007a. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. *Biochimie* 89, 289–300. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2006.12.002>.
- da Silveira, R.B., Wille, A.C.M., Chaim, O.M., Appel, M.H., Silva, D.T., Franco, C.R.C., Toma, L., Mangili, O.C., Gremski, W., Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2007b. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochem. J.* 406, 355–363. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20070363>.
- Dantas, A.E., Horta, C.C.R., Martins, T.M.M., Carmo, D., de A., O., Mendes, B.B.R.D.O., Goes, A.M., Kalapothakis, E., Gomes, D.A., 2014. Whole venom of *Loxosceles similis* activates caspases-3, -6, -7, and -9 in human primary skin fibroblasts. *Toxicon* 84, 56–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.04.002>.
- de Castro, C.S., Silvestre, F.G., Araújo, S.C., Gabriel, D.M.V., Mangili, O.C., Cruz, I., Chávez-Olortegui, C., Kalapothakis, E., 2004. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon* 44, 273–280. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.028>.
- de Oliveira Christoff, A., de Oliveira, A., Chaim, O.M., Lugarini, D., Bastos Pereira, A.L., Paludo, K.S., Queiroz Telles, J.E., Bracht, A., Veiga, S.S., Acco, A., 2008. Effects of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. *Toxicon* 52, 695–704. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.08.001>.
- Dias-Lopes, C., Felicori, L., Guimaraes, G., Gomes, E.R.M., Roman-Campos, D., Duarte, H., Damasceno, D., Martins, M., Kalapothakis, E., Almeida, A.P., Granier, C., Cruz, J.S., Guatimosim, S., Chavez-Olortegui, C., 2010. Cardiotoxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom and the recombinant venom toxin rLD1. *Toxicon* 56, 1426–1435. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.08.008>.
- Duckert, P., Brunak, S., Blom, N., 2004. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Eng. Des. Sel.* 17, 107–112. <http://dx.doi.org/10.1093/protein/gzh013>.
- Everett, K.D., Bush, R.M., Andersen, A.A., 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaeaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaeaceae, including a new genus and five new species, and standards. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (Pt 2), 415–440. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-49-2-415>.
- Fernandes Pedrosa, M. de F., Junqueira de Azevedo, I. de L.M., Gonçalves-de-Andrade, R.M., van den Berg, C.W., Ramos, C.R.R., Ho, P.I., Tambourgi, D.V., 2002. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 638–645.
- Fernandes-Pedrosa, M.D.F., Junqueira-de-Azevedo, I.D.L.M., Gonçalves-de-Andrade, R.M., Kobashi, L.S., Almeida, D.D., Ho, P.I., Tambourgi, D.V., 2008. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. *BMC Genomics* 9, 279. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-279>.
- Futrell, J.M., 1992. Loxoscelism. *Am. J. Med. Sci.* 304, 261–267.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A., 2005. Protein identification and analysis tools on the Expasy server. *Proteom. Protoc. Handb.* 571–607. <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>.
- Gertsch, W.J., 1967. The spider genus *Loxosceles* in south America (Araneae, Scytodidae). *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 136, 117–174.
- Gomes, M.T.R., Guimaraes, G., Frézar, F., Kalapothakis, E., Minozzo, J.C., Chaim, O.M., Veiga, S.S., Oliveira, S.C., Chávez-Olortegui, C., 2011. Determination of sphingomyelinase-D activity of *Loxosceles* venoms in sphingomyelin/cholesterol liposomes containing horseradish peroxidase. *Toxicon* 57, 574–579. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.01.001>.
- Gremski, L.H., da Silveira, R.B., Chaim, O.M., Probst, C.M., Ferrer, V.P., Nowatzki, J., Weinschutz, H.C., Madeira, H.M., Gremski, W., Nader, H.B., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2010. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Mol. Biosyst.* 6, 2403–2416. <http://dx.doi.org/10.1039/c004118a>.
- Gremski, L.H., Trevisan-Silva, D., Ferrer, V.P., Matsubara, F.H., Meissner, G.O., Wille, A.C.M., Vuitika, L., Dias-Lopes, C., Ullah, A., De Moraes, F.R., Chávez-Olortegui, C., Barbaro, K.C., Murakami, M.T., Arni, R.K., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2014. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: from the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. *Toxicon* 83, 91–120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.023>.
- Guimaraes, G., Dias-Lopes, C., Duarte, C.G., Felicori, L., Machado de Avila, R.A., Figueiredo, L.F.M., de Moura, J., Faleiro, B.T., Barro, J., Flores, K., Silva, W., Tintaya, B., Yarleque, A., Bonilla, C., Kalapothakis, E., Salas, C.E., Chávez-Olortegui, C., 2013. Biochemical and immunological characteristics of Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom: neutralization of its toxic effects by anti-loxoscelic antivenoms. *Toxicon* 70, 90–97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.04.018>.
- Hogan, C.J., Barbaro, K.C., Winkel, K., 2004. Loxoscelism: old obstacles, new directions. *Ann. Emerg. Med.* 44, 608–624. <http://dx.doi.org/10.1016/j.annemergmed.2004.08.028>.
- Horta, C.C.R., Oliveira-Mendes, B.B.R., do Carmo, A.O., Siqueira, F.F., Barroca, T.M., dos Santos Nassif Lacerda, S.M., de Almeida Campos, P.H., de França, L.R., Ferreira, R.L., Kalapothakis, E., 2013. Lysophosphatidic acid mediates the release of cytokines and chemokines by human fibroblasts treated with *Loxosceles* spider venom. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1682–1685. <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2013.40>.
- Johannsen, J., Wickler, W., Seibt, U., Moritz, R.F.A., 2009. Population history in social spiders repeated: colony structure and lineage evolution in *Stegodyphus mimosarum* (Eresidae). *Mol. Ecol.* 18, 2812–2818. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04238.x>.
- Kalapothakis, E., Chatzaki, M., Gonçalves-Dornelas, H., de Castro, C.S., Silvestre, F.G., Laborne, F.V., de Moura, J.F., Veiga, S.S., Chávez-Olortegui, C., Granier, C., Barbaro, K.C., 2007. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. *Toxicon* 50, 938–946. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.07.001>.
- Kose, M., Ekinci, D., Gokahmetoglu, S., Elmas, T., Öztürk, M.K., 2015. Simkania negevensis: is it a real respiratory pathogen? *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 62, 161–166. <http://dx.doi.org/10.1556/0306.2015.2.6>.
- Kurpiewski, G., Forrester, L.J., Barrett, J.T., Campbell, B.J., 1981. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. *Biochim. Biophys. Acta* 678, 467–476.
- Kusma, J., Chaim, O.M., Wille, A.C.M., Ferrer, V.P., Sade, Y.B., Donatti, L., Gremski, W., Mangili, O.C., Veiga, S.S., 2008. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. *Biochimie* 90, 1722–1736. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2008.07.011>.
- Lee, S., Lynch, K.R., 2005. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem. J.* 391, 317–323. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20050043>.
- Machado, E.O., Alvares, E.S.S., de Maria, M., Kalapothakis, E., 2005. Sobre a presença de três espécies de *Loxosceles* Heineken & Lowe (Araneae: Sicariidae) no município de Belo Horizonte. *Minas Gerais, Bras. Lundiana* 6, 113–115.
- Magalhães, G.S., Caporino, M.C., Della-Casa, M.S., Kimura, L.F., Prezotto-Neto, J.P., Fukuda, D.A., Portes-Junior, J.A., Neves-Ferreira, A.G.C., Santoro, M.L., Barbaro, K.C., 2013. Cloning, expression and characterization of a phospholipase D from *Loxosceles gaucho* venom gland. *Biochimie* 95, 1773–1783. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.002>.
- Grabherr, Manfred G., Haas, Brian J., Yassour, Moran, Levin, Joshua Z., Thompson, Dawn A., Amit, Ido, Adiconis, Xian, Fan, Lin, Raychowdhury, Raktima, Zeng, Qiangdong, Chen, Zehua, Mauceci, Evan, Hacohen, Nir, Gnirke, Andreas, Rhind, Nicholas, di Palma, Federica, Bruce, W., Friedman, N., Ar, R., 2011. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nat. Biotechnol.* 29, 644–652. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1883>.
- Martin-Eauclaire, M.-F., Alami, M., Giamarchi, A., Missimilli, V., Rosso, J.-P., Bougis, P.E., 2006. A natural antotoxin, Amm VIII, induces neutralizing antibodies against the potent scorpion alpha-toxins. *Vaccine* 24, 1990–1996. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.11.016>.
- Matsubara, F.H., Gremski, L.H., Meissner, G.O., Constantino Lopes, E.S., Gremski, W.,

- Senff-Ribeiro, A., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2013. A novel ICK peptide from the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland: cloning, heterologous expression and immunological cross-reactivity approaches. *Toxicon* 71, 147–158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.014>.
- Mendes, T.M., Oliveira, D., Figueiredo, L.F.M., Machado-de-Avila, R.A., Duarte, C.G., Dias-Lopes, C., Guimarães, G., Felicori, L., Minozzo, J.C., Chávez-Olortegui, C., 2013. Generation and characterization of a recombinant chimeric protein (rCpLI) consisting of B-cell epitopes of a dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom. *Vaccine* 31, 2749–2755. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.03.048>.
- Merchant, M.L., Hinton, J.F., Geren, C.R., 1998. Sphingomyelinase D activity of brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom as studied by 31P-NMR: effects on the time-course of sphingomyelin hydrolysis. *Toxicon* 36, 537–545. doi:S0041-0101(97)00078-0.
- Merchant, M.L., Hinton, J.F., Geren, C.R., 1997. Effect of hyperbaric oxygen on sphingomyelinase D activity of brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom as studied by 31P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 335–338.
- Ministério da saúde, 2016. Sistema nacional de notificação de agravos. Ministério da Saúde, Brasília, Dist. Fed.
- Moreira-Ferreira, A.M., Kalapothakis, E., Diniz, C.R., Chávez-Olortegui, C., 1998. In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization of mice with a non-toxic protein. *Toxicon* 36, 333–339.
- Pereira, N.B., Campos, P.P., De Jesus Oviedo Socarrás, T., Pimenta, T.S., Parreiras, P.M., Silva, S.S., Kalapothakis, E., Andrade, S.P., Moro, L., 2012. Sponge implant in Swiss mice as a model for studying loxoscelism. *Toxicon* 59, 672–679. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.005>.
- Pereira, N.B., Campos, P.P., Parreiras, P.M., Chiarini-Garcia, H., Socarrás, T.O., Kalapothakis, E., Andrade, S.P., Moro, L., 2014. Apoptosis, mast cell degranulation and collagen breakdown in the pathogenesis of loxoscelism in subcutaneously implanted sponges. *Toxicon* 84, 7–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.03.003>.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8, 785–786. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1701>.
- Platnick, N., 2016. The world spider catalog. <http://Res.version.17>.
- Silvestre, F.G., de Castro, C.S., de Moura, J.F., Giusta, M.S., De Maria, M., Alvares, E.S.S., Lobato, F.C.F., Assis, R.A., Gonçalves, L.A., Gubert, I.C., Chávez-Olortegui, C., Kalapothakis, E., 2005. Characterization of the venom from the Brazilian brown spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). *Toxicon* 46, 927–936. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.09.002>.
- Sixt, B.S., Hiess, B., König, L., Horn, M., 2012. Lack of effective anti-apoptotic activities restricts growth of Parachlamydiaceae in insect cells. *PLoS One* 7. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029565>.
- Suesdeb-Rocha, L., Bertani, R., da Silva Jr., P.I., Selvon, D., 2007. The first record for *Wolbachia* in a scorpion: the parthenogenetic yellow scorpion *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). *Rev. Ibérica Aracnol.* 14, 183–184.
- Tambourgi, D.V., de F. Fernandes Pedrosa, M., van den Berg, C.W., Gonçalves-de-Andrade, R.M., Ferracini, M., Paixão-Cavalcante, D., Morgan, B.P., Rushmere, N.K., 2004. Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. *Mol. Immunol.* 41, 831–840. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2004.03.027>.
- Tambourgi, D.V., Magnoli, F.C., van den Berg, C.W., Morgan, B.P., de Araujo, P.S., Alves, E.W., Da Silva, W.D., 1998. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 366–373. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1998.9474>.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>.
- Tavares, F.L., Peichoto, M.E., Rangel, D. de M., Barbaro, K.C., Cirillo, M.C., Santoro, M.L., Sano-Martins, I.S., 2011. *Loxosceles gaucha* spider venom and its sphingomyelinase fraction trigger the main functions of human and rabbit platelets. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 1567–1574. <http://dx.doi.org/10.1177/0960327110393761>.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Trevisan-Silva, D., Bednaski, A.V., Gremski, L.H., Chaim, O.M., Veiga, S.S., Senff-Ribeiro, A., 2013. Differential metalloprotease content and activity of three *Loxosceles* spider venoms revealed using two-dimensional electrophoresis approaches. *Toxicon* 76, 11–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.08.065>.
- Ullah, A., de Giuseppe, P.O., Murakami, M.T., Trevisan-Silva, D., Wille, A.C.M., Chaves-Moreira, D., Gremski, L.H., da Silveira, R.B., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O.M., Veiga, S.S., Arni, R.K., 2011. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 67, 234–236. <http://dx.doi.org/10.1107/S1744309110050931>.
- Van Meeteren, L.A., Frederiks, F., Giepmans, B.N.G., Fernandes Pedrosa, M.F., Billington, S.J., Jost, B.H., Tambourgi, D.V., Moolenaar, W.H., 2004. Spider and bacterial sphingomyelinase D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* 279, 10833–10836. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C300563200>.
- Veiga, S.S., Zanetti, V.C., Franco, C.R., Trindade, E.S., Porcionatto, M.A., Mangili, O.C., Gremski, W., Dietrich, C.P., Nader, H.B., 2001. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. *Thromb. Res.* 102, 229–237.
- Vuitika, L., Gremski, L.H., Belisário-Ferrari, M.R., Chaves-Moreira, D., Ferrer, V.P., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2013. Brown spider phospholipase-D containing a conservative mutation (D233E) in the catalytic site: identification and functional characterization. *J. Cell. Biochem.* 114, 2479–2492. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.24594>.
- Zanetti, V.C., da Silveira, R.B., Dreyfuss, J.L., Haoach, J., Mangili, O.C., Veiga, S.S., Gremski, W., 2002. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 13, 135–148.
- Zuckerkanndl, E., Pauling, L., 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* 8, 357–366.