

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Genética

Composição do veneno de *Loxosceles laeta* peruana revelada por análise transcriptômica NGS e desenvolvimento da ferramenta computacional PepLess

Raíssa Medina Santos

Belo Horizonte

2021

RAÍSSA MEDINA SANTOS

Composição do veneno de *Loxosceles laeta* peruana revelada por análise transcriptômica NGS e desenvolvimento da ferramenta computacional PepLess

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Genética.

Orientador: Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtegui

Coorientador: Dr. Franck Molina

Belo Horizonte

2021

- 043 Santos, Raíssa Medina.
Composição do veneno de *Loxosceles laeta* peruana revelada por análise transcriptômica NGS e desenvolvimento da ferramenta computacional PepLess [manuscrito] / Raíssa Medina Santos. - 2021.
131 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Dr. Carlos Delfín Chávez Olórtgui. Coorientador: Dr. Franck Molina.
- Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.
1. Genética. 2. Biologia Computacional. 3. Peptídeos. 4. Aranhas. 5. Serpentes. I. Olórtgui, Carlos Delfín Chávez. II. Molina, Franck. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO / TESE

ATA DA DEFESA DE TESE	148/2021 entrada
Raíssa Medina Santos	1º/2018 CPF: 120.784.446-26

Às treze horas e trinta minutos do dia **10 de novembro de 2021**, reuniu-se remotamente, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Composição do veneno de *Loxosceles laeta peruana* revelada por análise transcriptômica NGS e desenvolvimento da ferramenta computacional PepLess**", requisito para obtenção do grau de Doutora em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Carlos Chavez Olortegui**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Carlos Delfin Chávez Olórtgui	UFMG	455.731.316-72	APROVADA
Franck Molina	Sys2Diag	17AV56200	APROVADA
Luiza Helena Gremski	UFPR	040.086.519-00	APROVADA
Lucas Bleicher	UFMG	813.528.593-00	APROVADA
Francisco Pereira Lobo	UFMG	012.273.736-94	APROVADA
Henrique Roman Ramos	UNINOVE	178.143.888-99	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 10 de novembro de 2021.

Carlos Delfin Chávez Olórtgui

Franck Molina

Este trabalho foi realizado em:

Laboratório de Imunoquímica de Proteínas, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB)
da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);
Sys2Diag, ALCEDIAG, Montpellier – França;

E contou com o apoio financeiro de:

Departamento de Biologia Geral – ICB - UFMG

Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB - UFMG

CAPES

CNPq

FAPEMIG

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

Ao departamento de Biologia Geral e ao Programa de Pós-Graduação em Genética – UFMG pela oportunidade que me foi oferecida.

Ao Professor Dr. Carlos Chávez Olórtégui, pela orientação, oportunidade, confiança, experiência e aprendizado.

Ao Dr. Franck Molina, pela coorientação, recepção em seu laboratório e bons momentos em meu intercâmbio.

À Dra. Clara Guerra pelos conselhos, paciência e grande disponibilidade.

Ao Dr. Ricardo Andrez e à Dra. Vanete Soccol, pela síntese das membranas.

A todos os colegas do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas e do Laboratório Sys2Diag, pelo convívio, companheirismo e amizades.

Às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo fomento.

Ao Daniel Freire Zampelin, por toda a paciência e ajudas em horários aleatórios nas minhas dificuldades em programação.

Aos Desabafers, por todo carinho e apoio emocional todos os dias.

À Carol, pelo companheirismo e amizade em todos os momentos, principalmente no nosso ano na França.

Às minhas amigas Thamyres e Tamara, pela amizade, compreensão e bons momentos vividos.

Aos meus pais, Cosme e Cleonícia, e meu irmão Lucas, pelo amor incondicional, compreensão e apoio em todos os momentos.

Ao Quentin Chapelier, por estar presente nos momentos bons e ruins sempre me encorajando e por seu amor (*A Quentin Chapelier, pour avoir été là dans les bons comme dans les mauvais moments, m'encourager toujours et pour son amour*).

E a todos que de alguma forma estiveram envolvidos e colaboraram com este trabalho.

RESUMO

Acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles* são responsáveis por emergências médicas em vários países da América do Sul. A espécie *Loxosceles laeta* está presente principalmente no Brasil e Peru, e é responsável por um número expressivo de acidentes nestes países. Para otimizar a caracterização dos componentes do veneno de *L. laeta* e revelar possíveis variações deste, fornecemos uma visão geral das toxinas presentes na glândula de veneno de *L. laeta* peruana, usando uma biblioteca de cDNA sequenciada por MiSeq (Illumina), e comparamos os dados obtidos com o transcriptoma baseado em Expressed Sequence Tags (EST) de glândulas de veneno de *L. laeta* brasileira de Fernandes-Pedrosa, 2008. A técnica de SPOT consiste na síntese de peptídeos em uma membrana de celulose e é uma ferramenta simples e de baixo custo para aplicações biotecnológicas e estudos de grande número de dados, como é o caso da análise transcriptômica de *L. laeta*. Apesar disso, esta técnica torna-se exaustiva quando uma grande quantidade de sequências com diferentes especificações é utilizada, devido ao extenso tempo gasto para produção das membranas e a análises manuais dos imunoenaios, além do gasto excessivo de materiais e reagentes. Por estes motivos, desenvolveu-se a ferramenta PepLess, um sistema inovador capaz de selecionar e analisar um grande número de sequências simultaneamente, permitindo uma redução considerável na quantidade de membranas produzidas. Com este sistema, é possível a elaboração de membranas com qualidade e especificidade e automaticamente analisar os resultados obtidos nos imunoenaios. Desta forma, todas as técnicas que anteriormente seriam realizadas de forma manual para a produção e utilização de membranas para SPOT synthesis poderão ser automáticas, rápidas e fáceis, permitindo a geração de resultados com melhor eficácia e qualidade e transformando esta técnica em uma poderosa ferramenta para análises complexas. Para comprovar a eficiência e eficácia da ferramenta, utilizou-se dois estudos de caso: A análise completa do transcriptoma de aranhas *Loxosceles laeta* de origem peruana e a produção de membrana de SPOT com os transcritos das principais serpentes do gênero *Micrurus* presentes na América do Sul.

Palavras-chave: Peptídeos; Spot synthesis; Bioinformática; *Loxosceles*; *Micrurus*.

ABSTRACT

Accidents involving spiders of the *Loxosceles* genus are responsible for medical emergencies in several countries in South America. The species *Loxosceles laeta* is mainly found in Brazil and Peru, and it is responsible for an impressive number of accidents in those countries. To further characterize the components of the *L. laeta* venom and reveal possible variations in the particular Peruvian population, we provide an overview of the toxins present in the Peruvian *L. laeta* venom gland, using a cDNA library sequenced by the MiSeq sequencer (Illumina), and compared the data obtained with the transcriptome based on Expressed Sequence Tags (EST) of venom glands of Brazilian *L. laeta* from Fernandes-Pedrosa, 2008. The SPOT consists in the synthesis of a large number of peptides on a cellulose membrane, and it is a simple and low-cost tool for biotechnological applications and studies with large numbers of data, as is the case of the transcriptomic analysis of Peruvian *L. laeta*. Nevertheless, this technique becomes exhaustive when a large amount of sequences with different specifications is used, due to the extensive time taken to produce membranes and manual analysis of immunoassays, in addition to the excessive expenditure of materials and reagents. For these reasons, the PepLess tool was developed. It is an innovative device capable of selecting and analyzing a large number of sequences simultaneously, allowing a considerable reduction in the amount of membranes produced. With this system, it is possible to elaborate membranes with quality and specificity and automatically analyze the results obtained in the immunoassays. In this way, all the techniques that would previously be performed manually for the production and use of membranes for spot synthesis, can be automatic, fast and easy, allowing the generation of results with better efficiency and quality and transforming this technique into a powerful tool for complex analysis. To prove the efficiency and effectiveness of the tool, two case studies were used: The complete transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* spiders of Peruvian origin and production of SPOT membrane with transcripts of the main *Micrurus* snakes present in South America.

Keywords: Peptides; Spot Synthesis; Bioinformatics; *Loxosceles*; *Micrurus*.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia das aranhas.....	21
Figura 2 - Distribuição das espécies de <i>Loxosceles</i> na (A) América do Norte, (B) América Central e (C) América do Sul	23
Figura 3 – Espécimes adultos de <i>Loxosceles laeta</i> coletados no Município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.....	24
Figura 4 - Loxoscelismo cutâneo.....	25
Figura 5 - Loxoscelismo sistêmico	26
Figura 6 - Classificação funcional dos transcritos das glândulas de veneno de <i>Loxosceles laeta</i>	28
Figura 7 - Classificação funcional dos transcritos das glândulas de veneno de <i>Loxosceles intermedia</i>	29
Figura 8 - Identificação dos transcritos de alta abundância presentes na glândula de veneno de <i>L. intermedia</i>	30
Figura 9 - Fluxo de trabalho do sequenciamento NGS e análise do transcriptoma de <i>Loxosceles laeta</i> peruana	35
Figura 10 - Anotação do transcriptoma da glândula de veneno de <i>L. laeta</i> peruana usando BlastP.....	37
Figura 11 - Transcritos identificados em veneno de <i>L. laeta</i> peruana usando BlastP.....	38
Figura 12 - Gráfico de intersecção entre ESTs de <i>Loxosceles laeta</i> brasileira de Fernandes-Pedrosa, 2008 e <i>Loxosceles laeta</i> peruana identificados usando MegaBlast	40
Figura 13 – Alinhamento de contings maduros representativos de Fosfolipases-D do transcriptoma de <i>L. laeta</i> peruana com sequência de <i>L. laeta</i> identificada em NCBI feita por Clustal Omega e analisada por Jalview.....	42
Figura 14 - Alinhamento de contings maduros representativos de Sicaritoxinas do transcriptoma de <i>L. laeta</i> peruana com sequência de <i>L. intermedia</i> identificada em NCBI feita por Clustal Omega e analisada por Jalview.....	43
Figura 15 - Modelagem molecular e sobreposição das LLP_U1scrtx's identificadas por análise transcriptômica usando Phyre2 e análise dos resultados por PyMOL	46
Figura 16 - Alinhamento de contings maduros representativos de Hialuronidase do transcriptoma de <i>L. laeta</i> peruana (Hyalu_LL) com sequências de <i>L. laeta</i> (Hyalu_LL) e <i>Loxosceles intermedia</i> (HYAL_LOXIN) identificadas em NCBI feita por Clustal Omega e analisada por Jalview	47

Figura 17 - Atividade hialuronidásica	48
Figura 18 - Estrutura dos anticorpos.....	53
Figura 19 - Produção de membranas	55
Figura 20 – Diagrama de caso de uso da ferramenta PepLess	62
Figura 21 - Fluxo de trabalho da ferramenta PepLess.....	64
Figura 22 - Telas iniciais da ferramenta PepLess.....	65
Figura 23 - Telas de resultados gráficos.....	66
Figura 24 - Tela para criação de alinhamentos e Tela com alinhamentos em MAFFT (software para Alinhamento múltiplo de seqüências)	67
Figura 25 - Graphical blueprint of synthesis	68
Figura 26 - Tela da análise por ImageJ.....	69
Figura 27 - Tela da análise por ImageJ e membrana gráfica espelhada	69
Figura 28 - Tela de alinhamento de spots positivos em MAFFT	70
Figura 29 - Resultado gráfico da utilização da ferramenta PepLess com um banco de dados das principais toxinas identificadas no transcriptoma de <i>L. laeta</i> peruana	80
Figura 30 - SPOTs com soros pré imunes na membrana de <i>L. laeta</i> peruana.....	81
Figura 31 - SPOT com soro comercial do INS produzido em cavalos na membrana de <i>L. laeta</i> peruana.....	82
Figura 32 - SPOT com soro comercial do CPPI produzido em cavalos na membrana de <i>L. laeta</i> peruana	82
Figura 33 - SPOT com soro anti-metalloprotease de <i>L. intermedia</i> produzido em coelhos na membrana de <i>L. laeta</i> peruana.....	83
Figura 34 – SPOT com soro hiper imune do INS produzido em cavalos na membrana de <i>L. laeta</i> peruana	84
Figura 35 - SPOT com soro hiper imune do CPPI produzido em cavalos na membrana de <i>L. laeta</i> peruana	84
Figura 36 - Alinhamento dos peptídeos reativos dos imunoenaios de SPOT com os peptídeos de metaloprotease e fosfolipase-D de rMEPLox.....	85
Figura 37 - Recorte de membrana de metaloprotease de <i>L. laeta</i> peruana (LALP-LP3) sem e com a utilização da ferramenta PepLess	86
Figura 38 - Vista lateral do crânio de (A) <i>Viperidae</i> , (B) <i>Atractaspidae</i> e (C) <i>Elapidae</i>	89
Figura 39 - Distribuição geográfica de subespécies de <i>M. lemniscatus</i> e <i>M. ibiboboca</i> no Brasil.....	90
Figura 40 - Distribuição geográfica do gênero <i>elapídeos</i> na América do Sul.....	90

Figura 41 - Padrão de coloração das serpentes <i>Micrurus</i> (A) Coloração monadal e (B) Coloração triadal.....	91
Figura 42 - Proporção de presença de toxinas de acordo com cada espécie de <i>Micrurus</i> de importante incidência no Brasil.....	93
Figura 43 - Modelo tridimensional da proteína 3FTX de <i>M. lemniscatus</i>	94
Figura 44 – Resultado gráfico da utilização da ferramenta PepLess com um banco de dados das duas principais toxinas identificadas no transcriptoma de <i>Micrurus spp</i>	100
Figura 45 - ELISA com soro produzido em coelha a partir de mistura de venenos de quatro espécies de <i>Micrurus spp.</i> presentes na América do Sul.....	101
Figura 46 - SPOTs com soros pré imunes na membrana de <i>Micrurus spp</i>	102
Figura 47 - SPOT com soro anti- <i>Micrurus</i> spp de mistura de quatro espécies de <i>Micrurus spp.</i> , produzido em coelho na membrana de <i>Micrurus spp.</i>	103
Figura 48 - SPOT com soro de <i>Micrurus surinamensis</i> produzido em coelhos na membrana de <i>Micrurus spp.</i>	104
Figura 49 - SPOT com soro de <i>Micrurus corallinus</i> produzido em cavalos na membrana de <i>Micrurus spp</i>	104
Figura 50 - SPOT com soro de <i>Micrurus ibiboboca</i> produzido em cavalos na membrana de <i>Micrurus spp.</i>	105
Figura 51 - SPOT com soro de <i>Micrurus frontalis</i> produzido em cavalos na membrana de <i>Micrurus spp.</i>	105
Figura 52 - Alinhamento entre os peptídeos reativos no imunoenensaio de SPOT utilizando o soro produzido neste Capítulo	106
Figura 53 - Alinhamento entre os peptídeos reativos nos imunoenensaio de SPOT utilizando os soros de coelho por <i>M. surinamensis</i> produzido por nosso grupo de pesquisa e soros de cavalos por <i>M. corallinus</i> , <i>M. ibiboboca</i> e <i>M. frontalis</i> produzidos por nosso grupo de pesquisa.	106
Figura 54 - ELISA com soro de <i>M. surinamensis</i> produzido em coelha, e soros de <i>M. corallinus</i> , <i>M. ibiboboca</i> e <i>M. frontalis</i> produzidos em cavalos.	107

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de acidentes por gênero de aranha causadora de acordo com a faixa etária das vítimas entre 2007 e 2021	22
Tabela 2 - Identificação dos transcritos de alta abundância presentes na glândula de veneno de <i>L. laeta</i>	28
Tabela 3 - Comparação de transcritos do transcriptoma do veneno brasileiro (Fernandes-Pedrosa, 2008) e peruano de <i>L. laeta</i>	39
Tabela 4 - ESTs brasileiras de <i>Loxosceles laeta</i> de Fernandes-pedrosa, 2008 sem semelhança com contigs peruanos de <i>Loxosceles laeta</i>	40
Tabela 5 - Knottinas identificadas no transcriptoma de <i>L. laeta</i> peruana usando Knottin Database.....	44
Tabela 6 – Requisitos funcionais do projeto	60
Tabela 7 – Requisitos não funcionais do projeto.....	61

LISTA DE ABREVIACOES

A333_LOXLA	Fosfolipase-D de <i>Loxosceles laeta</i>
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Soro albumina bovina
Ca ⁺⁺	Cálcio
cDNA	DNA complementar
CPPI	Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos
DMF	Dimetilformamida
DNA	cido desoxirribonucleico
EDTA	cido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i>
Fmoc	Grupo protetor fluorenilmetoxicarbonilo
HA	cido hialurônico
HYAL_LOXIN	Hialuronidase de <i>Loxosceles intermedia</i>
Hyalu_LL	Hialuronidase de <i>Loxosceles laeta</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IgG	Imunoglobulina G
INS	Instituto Nacional de Salud
kDa	Quilodaltons
Kg	Quilograma
LALP	<i>Loxosceles astacin-like proteinases</i>
LALP-LP	<i>Loxosceles astacin-like proteases peruvian</i>
LAAO	L-aminoácido oxidase
LiTx1	Toxina inseticidas de <i>L. intermedia</i>
<i>L. gaucho</i>	<i>Loxosceles gaucho</i>
<i>L. intermedia</i>	<i>Loxosceles intermedia</i>
<i>L. laeta</i>	<i>Loxosceles laeta</i>
<i>L. similis</i>	<i>Loxosceles similis</i>
mAb	Anticorpo monoclonal
M	Molar
Mg	Miligrama

µg	Micrograma
µL	Microlitro
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
<i>M. altirostris</i>	<i>Micrurus altirostris</i>
<i>M. corallinus</i>	<i>Micrurus corallinus</i>
<i>M. frontalis</i>	<i>Micrurus frontalis</i>
<i>M. ibiboboca</i>	<i>Micrurus ibiboboca</i>
<i>M. lemniscatus</i>	<i>Micrurus lemniscatus</i>
<i>M. surinamensis</i>	<i>Micrurus surinamensis</i>
mRNA	RNA mensageiro
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2
Na ⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
NGS	Sequenciamento de nova geração
NH ₂	Grupo amino
PBS	Tampão fosfato salino
PLA ₂	Fosfolipase-A ₂
PLD _{LLP}	Fosfolipase-D de <i>Loxosceles laeta</i> peruana
PBS-T	Tampão fosfato salino com Tween-20
rLiD1	Proteína dermonecrótica recombinante de <i>Loxosceles intermedia</i>
rMEPLox	Proteína multiepitópica recombinante derivada de toxinas loxoscélicas
RNA	Ácido ribonucleico
RNASeq	Sequenciamento de RNA
SINAN	Sistema de notificação acidentes com animais peçonhentos
SMase D	Esfingomielinase D
TCTP	Translationally Controlled Tumor Protein
TRU	Unidade de redução de turbidez
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
U1-SCRTX-Li1a	Sicaritoxina de <i>Loxosceles intermedia</i>
U2-SCRTX-Li1a	Sicaritoxina de <i>Loxosceles intermedia</i>
UFPR	Universidade Federal do Paraná

Vol	Volume
W/v	Concentração mássica
Yvis	Antibody Visualization platform
3FTX	Toxina de três dígitos
°C	Graus celsius

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I: TRANSCRIPTOMA DE ARANHAS PERUANAS	
<i>LOXOSCELES LAETA</i>	20
1.1. INTRODUÇÃO	21
1.1.1. AS ARANHAS	22
1.1.2. ARANHAS DO GÊNERO <i>LOXOSCELES</i>	23
1.1.3. LOXOSCELISMO, SEU DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	25
1.1.4. CARACTERIZAÇÃO DO VENENO LOXOSCÉLICO	27
1.2. OBJETIVOS	33
1.2.1. OBJETIVO GERAL	33
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
1.3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
1.3.1. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS.....	34
1.3.2. AVALIAÇÃO DE TOXINAS E COMPARAÇÃO COM DADOS DO TRANSCRIPTOMA DE <i>L. LAETA</i> BRASILEIRA.....	35
1.3.2.1. ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA <i>IN VITRO</i>	36
1.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
1.4.1. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS.....	37
1.4.2. AVALIAÇÃO DE TOXINAS E COMPARAÇÃO COM DADOS DO TRANSCRIPTOMA DE <i>L. LAETA</i> BRASILEIRA.....	39
1.4.2.1. FOSFOLIPASES-D	41
1.4.2.2. NEUROTOXINAS.....	43
1.4.2.3. HIALURONIDASES	47
1.4.2.4. ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA <i>IN VITRO</i>	48
1.4.2.5. OUTRAS TOXINAS	49

2. CAPÍTULO II: PEPLESS - DESENVOLVIMENTO DE UMA FERRAMENTA PARA MAPEAMENTO DE EPITOPOS.....	51
2.1. INTRODUÇÃO	52
2.1.1. ANTICORPOS E SUAS INTERAÇÕES COM ANTÍGENOS	52
2.1.2. EPITOPOS	53
2.1.3. MAPEAMENTO DE EPITOPOS.....	54
2.1.4. PEPTÍDEOS.....	56
2.1.5. A BIOINFORMÁTICA NO DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS	57
2.2. OBJETIVOS.....	59
2.2.1. OBJETIVO GERAL	59
2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
2.3. MATERIAIS E MÉTODOS	60
2.3.1. PEPLESS: DESENVOLVIMENTO DA FERRAMENTA	60
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
2.4.1. PEPLESS: DESENVOLVIMENTO DA FERRAMENTA	65
3. CAPÍTULO III: ESTUDO DE CASO PEPLESS I – TRANSCRITOS DE <i>LOXOSCELES LAETA</i>.....	72
3.1. INTRODUÇÃO	73
3.1.1. PREDIÇÃO DE EPITOPOS EM TOXINAS DE VENENOS E SUAS APLICAÇÕES.....	73
3.2. OBJETIVOS.....	75
3.2.1. OBJETIVO GERAL	75
3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	75
3.3. MATERIAIS E MÉTODOS	76
3.3.1. IMPLEMENTAÇÃO DE PEPLESS COM TRANSCRITOS DE <i>LOXOSCELES LAETA</i> PERUANA.....	76

3.3.2. SÍNTESE E MAPEAMENTO DE EPITOPOS PELO MÉTODO DE SPOT E ANÁLISE POR PEPLESS	76
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	79
3.4.1. IMPLEMENTAÇÃO DE PEPLESS COM TRANSCRITOS DE <i>LOXOSCELES LAETA</i> PERUANA.....	79
3.4.2. SÍNTESE E MAPEAMENTO DE EPITOPOS PELO MÉTODO DE SPOT E ANÁLISE POR PEPLESS	80
4. CAPÍTULO IV: ESTUDO DE CASO PEPLESS II – TRANSCRITOS DA SERPENTE <i>MICRURUS SPP</i>.....	87
4.1. INTRODUÇÃO	88
4.1.1. AS SERPENTES.....	88
4.1.2. SERPENTES DO GÊNERO <i>MICRURUS</i>	89
4.1.3. ACIDENTES ELAPÍDICOS, SEU DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	92
4.1.4. COMPOSIÇÃO DO VENENO DAS SERPENTES DO GÊNERO <i>MICRURUS</i>	93
4.2. OBJETIVOS.....	95
4.2.1. OBJETIVO GERAL	95
4.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	95
4.3. MATERIAIS E MÉTODOS	96
4.3.1. IMPLEMENTAÇÃO DE PEPLESS COM TRANSCRITOS DA SERPENTE <i>MICRURUS SPP</i>	96
4.3.2. PRODUÇÃO DE SORO ESPECÍFICO CONTRA O VENENO DE <i>MICRURUS SPP</i>	96
4.3.3. SÍNTESE E MAPEAMENTO DE EPITOPOS PELO MÉTODO DE SPOT E ANÁLISE POR PEPLESS	97
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	99
4.4.1. IMPLEMENTAÇÃO DE PEPLESS COM TRANSCRITOS DA SERPENTE <i>MICRURUS SPP</i>	99

4.4.2. PRODUÇÃO DE SORO ESPECÍFICO CONTRA O VENENO DE <i>MICRURUS SPP</i>	101
4.4.3. SÍNTESE E MAPEAMENTO DE EPITOPOS PELO MÉTODO DE SPOT E ANÁLISE POR PEPLSS	101
5. CONCLUSÕES	108
6. PERSPECTIVAS	109
6.1. PERSPECTIVAS GERAIS	109
6.2. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO: PROTEÍNA SPIKE DE COVID-19	109
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
8. APÊNDICES	122
8.1. APÊNDICE 1: Lista de toxinas e os peptídeos correspondentes a cada spot da membrana de <i>L. laeta</i> peruana.....	122
8.2. APÊNDICE 2: Lista de toxinas e os peptídeos correspondentes a cada spot da membrana de <i>Micrurus spp.</i>	136
9. ANEXOS	150
9.1. ARTIGOS PUBLICADOS.....	150
9.1. EM PRIMEIRA AUTORIA	150
9.1. COMO COLABORADORA.....	150

CAPÍTULO I

TRANSCRIPTOMA DE ARANHAS PERUANAS *LOXOSCELES LAETA*

1.1. INTRODUÇÃO

1.1.1. AS ARANHAS

As aranhas, presentes no filo dos artrópodes, agrupadas na classe Arachnida e na ordem Araneae, possuem grande capacidade de adaptação em diversos ambientes (OLIVEIRA; SILVA, 2009). Elas estão divididas em 129 famílias, 4.228 gêneros e 49.669 espécies (World Spider Catalog, 2021).

Elas possuem o corpo morfologicamente dividido em cefalotórax anterior e abdômen posterior, conectados pelo pedicelo, uma estrutura flexível responsável pela sustentação. O cefalotórax é dividido em quatro pares de apêndices e os olhos são localizados na região cefálica. De acordo com cada família e/ou espécie, a quantidade de olhos pode variar entre oito, seis, quatro ou dois olhos. Além disso, as fiandeiras, responsáveis pela externalização da seda produzida, são localizadas na região ventral posterior. Na região bucal é possível observar um par de quelíceras que terminam em presas que se assemelham a garras, responsáveis por projetar o veneno a partir de dutos (CARVALHO; BONALDO; BRESCOVIT, 2007; JUNIOR; POLEGATTO, 2008) (**Figura 1**).

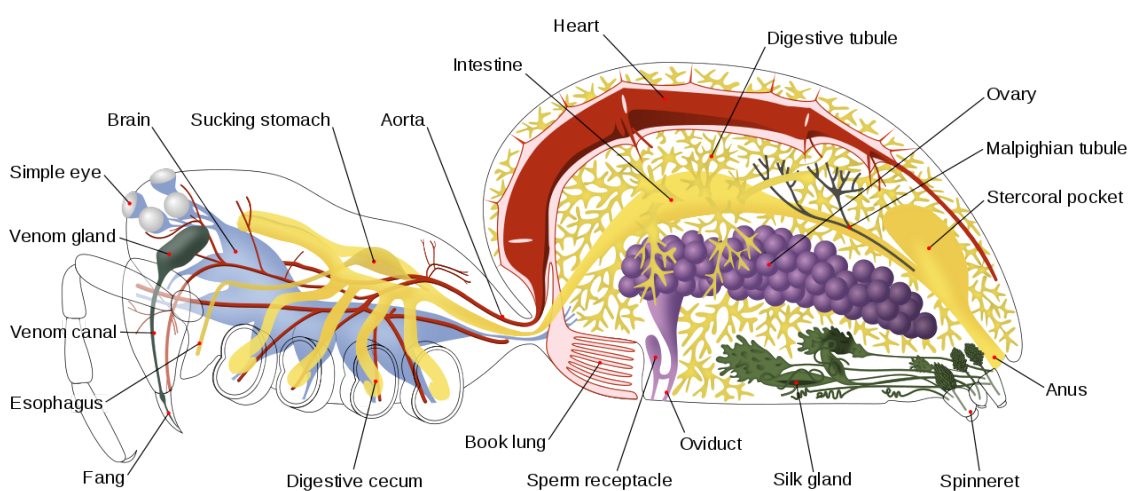


Figura 1: Morfologia das aranhas. Representação esquemática geral de Araneae e todos os seus órgãos. (Fonte: COMSTOCK, 1996)

Apesar de uma alimentação carnívora baseada em insetos, os acidentes com mordidas de aranhas são considerados emergências clínicas em vários países tropicais, já que os sinais e sintomas podem ser preocupantes e desafiadores. Normalmente, os acidentes ocorrem em áreas rurais, mas, com o crescimento urbano acelerado, as aranhas estão cada

vez mais procurando abrigo e alimento em cidades grandes, onde possuem poucos predadores naturais e há favorecimento do crescimento descontrolado e dispersão das mesmas (ABREU; BERNARDE; MOTA DA SILVA, 2015).

Na América do Sul, especialmente no Brasil, três gêneros de aranhas são responsáveis pelos casos de acidentes e envenenamentos. São eles: *Phoneutria* (armadeira), *Loxosceles* (aranha-marrom) e *Latrodectus* (viúva-negra). Dentre estes três gêneros, as aranhas *Loxosceles* são responsáveis pelo maior número de acidentes, além de apresentarem maior letalidade (ABREU; BERNARDE; MOTA DA SILVA, 2015) (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição de acidentes por gênero de aranha causadora, de acordo com a faixa etária das vítimas, entre 2007 e 2021. Número de casos entre aranhas dos gêneros *Phoneutria*, *Loxosceles* e *Latrodectus* (Fonte: SINAN/SVS/MS3).

Número de casos - Período: 2007-2021			
Faixa Etária	<i>Phoneutria</i>	<i>Loxosceles</i>	<i>Latrodectus</i>
<1 Ano	549	1.410	34
1-4	2.072	5.519	78
5-9	2.362	4.707	95
10-14	2.392	4.938	112
15-19	3322	8.667	137
20-39	16.428	42.743	582
40-59	18.725	33.101	472
60-64	4.059	4.880	68
65-69	3.218	3.436	74
70-79	3.798	3.394	79
80 e +	1.092	959	24
Total	58.027	113.769	1.755

1.1.2. ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES*

Por serem o gênero responsável pelos mais importantes acidentes na América do Sul, as aranhas do gênero *Loxosceles* foram escolhidas como foco de estudo deste Capítulo. Elas são encontradas nas Américas, África, Europa e Oceania, possuindo, até o momento, 141 espécies diferentes descritas (última atualização em março de 2021) (WORLD SPIDER CATALOG, 2021) (ISBISTER e FAN, 2011). Nas Américas, a maioria destas espécies são encontradas principalmente na América do Sul de forma endêmica (Figura 2).

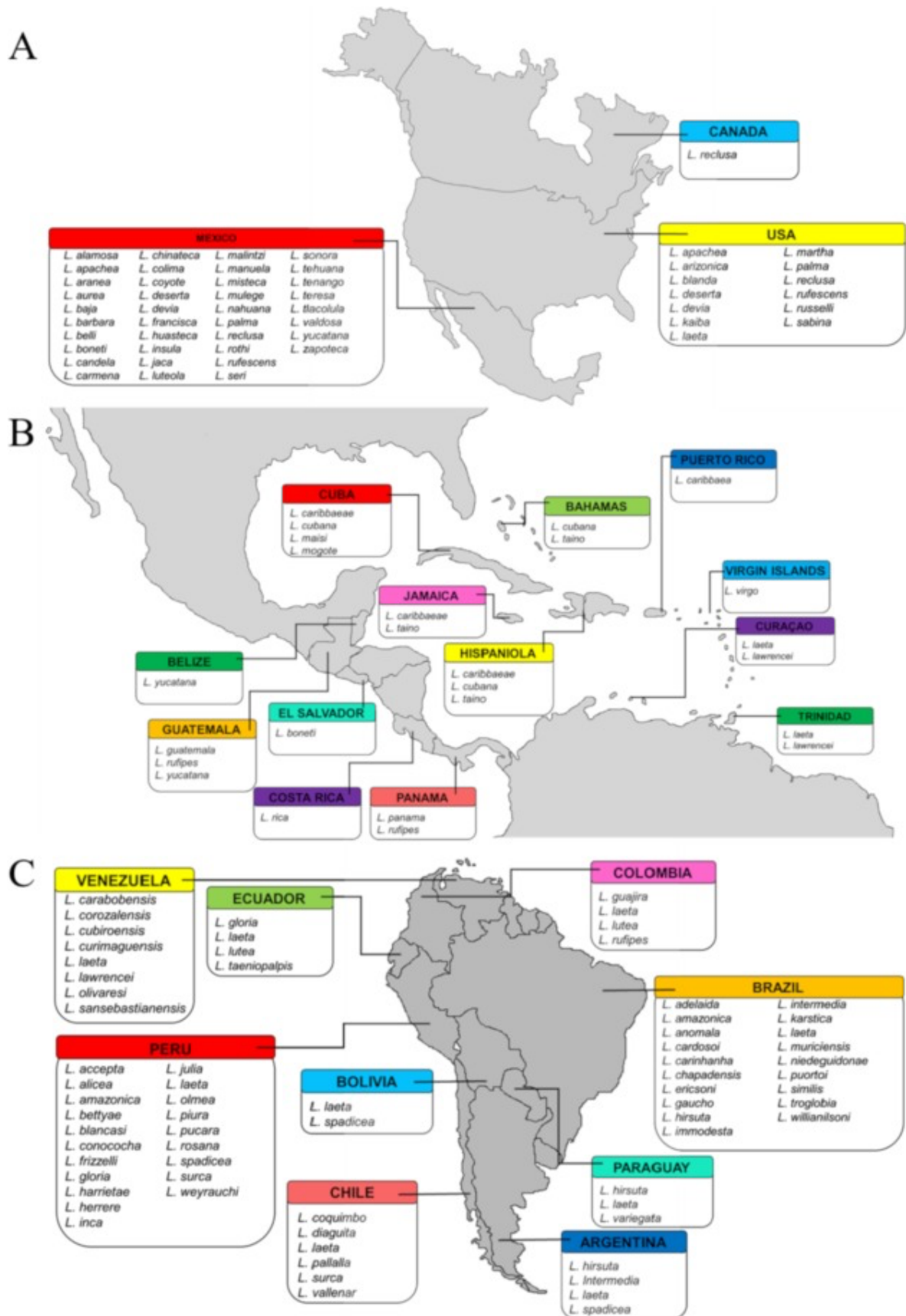


Figura 2: Distribuição das espécies de *Loxosceles* na (A) América do Norte, (B) América Central e (C) América do Sul (Fonte: PLATNICK, 2019).

Na América do Sul, o Brasil e o Peru são os países com maiores números de acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles*. No Brasil, as principais espécies responsáveis pelos envenenamentos são *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles laeta*. Já no Peru, a maioria dos casos ocorrem com *Loxosceles laeta*, e por seu alto número de relatos fatais neste país, ela também é conhecida como “aranha assassina” (Ministério da Saúde, 2011; HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004; MAGUINÃ-VARGAS *et al.*, 2004).

No Brasil, elas são conhecidas como “aranha marrom” ou “aranha violino” por sua coloração amarronzada e uma mancha escura em seu cefalotórax que lembra a forma de um violino. Normalmente medem cerca de 2 a 3 centímetros e possuem 3 pares de olhos (VETTER; VISSCHER; D, 1998; CHATZAKI *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2004; SWANSON; VETTER, 2006) (**Figura 3**).

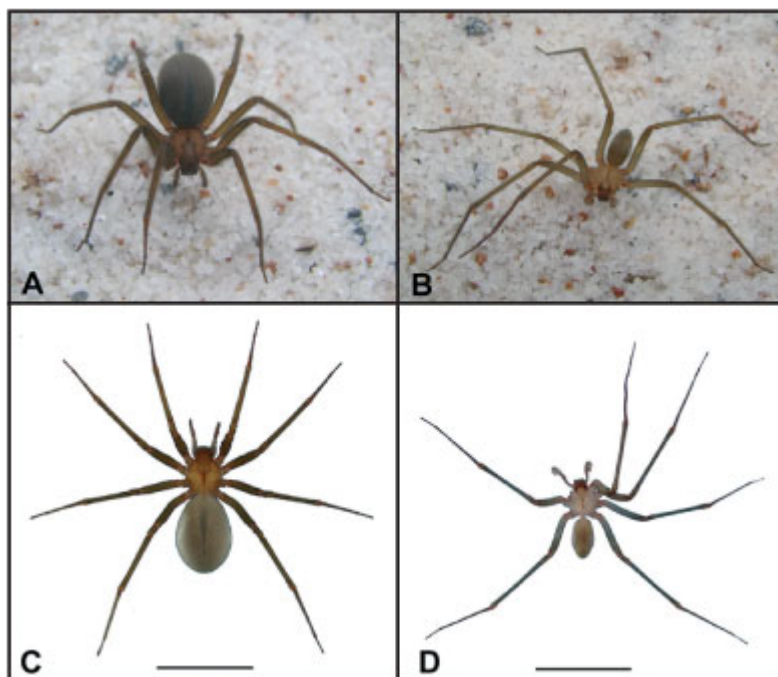


Figura 3: Espécimes adultos de *Loxosceles laeta* coletados no Município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. (A) Fêmea em vida, (B) macho em vida, (C) fêmea preservada e (D) macho preservado (Adaptado de SILVEIRA, 2009).

1.1.3. LOXOSCELISMO, SEU DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Os acidentes causados pelas aranhas do gênero *Loxosceles* são conhecidos como “Loxoscelismo”. Neste tipo de acidente, é possível que o paciente apresente duas formas distintas do Loxoscelismo: a primeira forma, menos grave e que afeta apenas a área no corpo do paciente em que ocorreu o acidente é chamada de Loxoscelismo cutâneo; e a segunda forma, mais complexa e perigosa para a vida do paciente: Loxoscelismo sistêmico (MINISTERIO DE SAUDE, 2001).

A forma cutânea se desenvolve de 2 a 8 horas após o acidente, com dor, edema e eritema no local da mordida. De 24 a 72 horas, a lesão pode se tornar mais característica, apresentando bolhas de conteúdo seroso, dor, queimação e lesões hemorrágicas mescladas a áreas mais pálidas e com necrose. Entre 7 a 12 dias a lesão pode se desenvolver para uma necrose seca que, algumas semanas depois, pode deixar uma úlcera de difícil cicatrização. Esta forma cutânea é responsável pela maioria dos casos de Loxoscelismo, correspondendo a cerca de 87% a 98% dos casos (DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004; MINISTERIO DE SAUDE, 2001; SILVEIRA, 2009) (**Figura 4**).



Figura 4: Loxoscelismo cutâneo. Evolução de um paciente com quadro de Loxoscelismo cutâneo, mostrando dias seguidos após a picada: (A) 5 dias, (B) 27 dias, (C) 41 dias e (D) 76 dias. (Fonte: WEN, 2009)

Já o Loxoscelismo sistêmico apresenta manifestações clínicas causadas por hemólise intravascular, onde observa-se, nas primeiras 24 horas, um paciente com icterícia, anemia e hemoglobinúria, além de petéquias e equimoses. Caso evolua mais

gravemente, o paciente pode desenvolver problemas renais, chegando a insuficiência renal aguda, que é a principal causa de óbito causada pelo Loxoscelismo (**Figura 5**). Apesar de grave, o Loxoscelismo hemolítico está presente em apenas 1% a 13% dos casos de Loxoscelismo (MINISTERIO DE SAUDE, 2001).



Figura 5: Loxoscelismo sistêmico. Evolução da urina de um paciente com Loxoscelismo sistêmico, em que é possível observar alteração de coloração de amarelado para vermelho escuro, de acordo com o nível de função renal comprometida. (Fonte: MAGUIÑA-VARGAS C., 2006).

A classificação dos acidentes com aranhas *Loxosceles* é feita de acordo com as alterações apresentadas pelo paciente nos exames físicos e laboratoriais adicionado à identificação, quando possível, da aranha. Os casos leves apresentam lesão não característica, sem outras alterações. Já os casos moderados possuem lesão característica sem outras alterações, e os casos graves apresentam além da lesão característica, alterações laboratoriais de hemólise intravascular (MINISTERIO DE SAUDE, 2001).

Tanto no Brasil quanto no Peru, a espécie *L. laeta* é responsável por um número acima do esperado de acidentes que possuem progressão perigosa, sendo responsável por até mesmo o dobro de casos em relação ao Loxoscelismo cutâneo no Peru (GONÇALVES-DE-ANDRADE; VILARINHO TAMBOURGI, 2003; HERNAN; ZAVALETA, 1997).

O tratamento para o Loxoscelismo possui como principais medicamentos a utilização de antissépticos, anti-histamínicos, antibióticos, anti-inflamatórios, analgésicos, dapsona, esteroides, oxigenação hiperbárica, procedimentos cirúrgicos e a administração de antivenenos, também chamados por diversos autores de “soros” (DA SILVA *et al.*, 2004; ISBISTER; FAN, 2011). Este é indicado no Brasil quando se identifica um quadro de hemólise visceral, ou quando a forma cutânea é identificada nas primeiras 72 horas (MINISTERIO DE SAUDE, 2001).

Os soros disponíveis no Brasil são: soro anti-loxoscélico (utiliza veneno de *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta*) ou anti-aracnídeo (utiliza veneno de aranhas *L. gaucho* e *Phoneutria nigriventer* e do escorpião *Tityus serrulatus*). No Brasil, estes soros são produzidos no Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) – Curitiba, e no Instituto Butantan – São Paulo. Já no Peru, produz-se apenas o soro anti-loxoscélico no Instituto Nacional de Salud (INS) – Lima. A produção do soro é feita em cavalos, a partir da inoculação de veneno bruto dos aracnídeos de interesse (aranhas e escorpiões), associado a adjuvantes. Após vários ciclos de imunizações, esses animais são sangrados e os anticorpos presentes no plasma são quantificados. Quando a quantidade de anticorpos for satisfatória, realiza-se uma última maior sangria e o soro extraído do sangue é processado e utilizado como tratamento para o envenenamento (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004).

Todo esse processo provoca redução da expectativa de vida dos animais peçonhentos devido a extração do veneno, uma vez que estes normalmente morrem durante o procedimento. Além disso, a produção dos antivenenos também causa sofrimento aos animais utilizados para imunização, os quais muitas vezes apresentam os efeitos tóxicos do envenenamento, como úlceras de difícil cicatrização e problemas renais (MINISTERIO DE SAUDE, 2001). Todos estes fatores demonstram que melhorias na técnica de produção de soros são necessárias e urgentes, levando grupos de pesquisa a buscarem maneiras mais eficientes e de menor sofrimento para a realização desta técnica.

1.1.4. CARACTERIZAÇÃO DO VENENO LOXOSCÉLICO

Com a aparência de um líquido cristalino, o veneno da aranha *Loxosceles*, produzido por seu par de glândulas no cefalotórax, é constituído por uma complexa mistura de proteínas e toxinas peptídicas. Devido a sua grande importância médica, este veneno vem sendo estudado a mais de um século e diversas características já foram elucidadas. Suas proteínas são de baixa massa molecular, variando de 1 a 40 kDa. Entre as famílias de toxinas identificadas destacam-se as fosfolipases-D, metaloproteases, hialuronidases, serinoproteases e peptídeos com atividade inseticida (CHAIM *et al.*, 2011, FEITOSA *et al.*, 1998).

Apesar dos diversos estudos toxinológicos, o veneno loxoscélico ainda gera muitas discussões e estudos, pois sua composição pode variar enormemente entre espécies.

Análises genômicas, transcriptômicas e proteômicas buscam identificar e quantificar a presença de toxinas, como é o caso de Fernandes-Pedrosa e colaboradores em 2008, que realizaram, através da técnica de Sanger, o sequenciamento para identificação de ESTs de glândulas de veneno de *L. laeta*. Neste trabalho, identificou-se 16,4% de toxinas conhecidas e 14,5% de possíveis toxinas (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008) (Figura 6, Tabela 2).

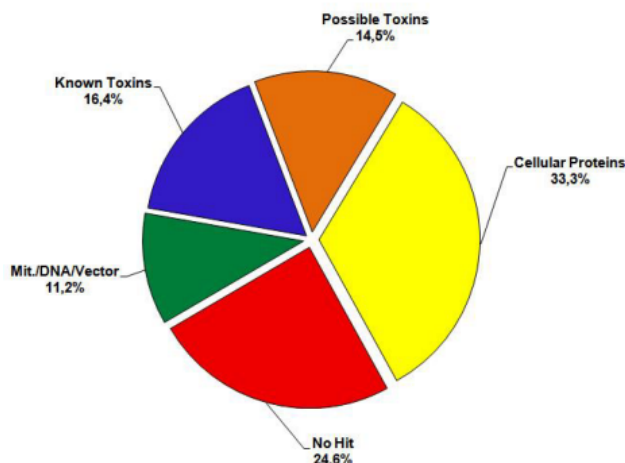


Figura 6: Classificação funcional dos transcritos das glândulas de veneno de *Loxosceles laeta*. Gráfico demonstrando a proporção relativa dos diferentes tipos de transcritos identificados: 33,3% de proteínas celulares, 24,6% de “no hit” (proteínas não identificadas ou desconhecidas), 16,4% de toxinas conhecidas, 14,5% de possíveis toxinas e 11,2% de Mit./DNA/Vetor (Fonte: FERNANDES-PEDROSA, 2008).

Tabela 2: Identificação dos transcritos de alta abundância presentes na glândula de veneno de *L. laeta*. (Fonte: FERNANDES-PEDROSA, 2008).

Groups	Number of clusters	Number of clones	Clones/clusters	% of total	Putative identification
1	542	741	1.37	24.6	No Hit*
2	91	489	5.37	16.3	Sphingomyelinase D*
3	59	248	4.20	8.2	Metalloproteinase*
4	83	105	1.27	3.5	Unknown Function*
5	9	75	8.33	2.5	Troponin
6	4	55	13.75	1.8	Actin
7	14	46	3.29	1.5	Hsp*
8	7	43	6.14	1.4	Elongation Factor
9	7	41	5.86	1.4	Salivary protein*
10	3	38	12.67	1.3	5'-nucleotidase*
11	7	36	5.14	1.2	Myosin
12	5	26	5.20	0.9	Chitinase*
13	4	23	5.75	0.8	Tubulin
14	2	23	11.50	0.8	LIM protein
15	6	22	3.67	0.7	PDI*
16	2	18	9.00	0.6	Venom allergen III*
17	6	15	2.50	0.5	Lectin*
18	12	14	1.17	0.5	Serine Protease*
19	2	13	6.50	0.4	ATP-binding
20	9	12	1.33	0.4	Ubiquitin

O transcriptoma é um conjunto completo de transcritos em forma de moléculas de RNA de parte de um genoma (RNAs mensageiros, RNAs ribossômicos, RNAs transportadores e os microRNAs) (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009), que a partir da utilização do RNA-Seq, uma metodologia Next Generation Sequencing (NGS), o revela pelo sequenciamento do DNA complementar (cDNA), gerando milhões de fragmentos de sequências curtas (reads).

Em 2010, Gremski e colaboradores realizaram uma análise transcriptômica de glândulas de veneno de *L. intermedia*. Neste trabalho, identificou-se 43,5% de toxinas e 2,9% de proteínas hipotéticas (GREMSKI *et al.*, 2010) (**Figura 7, Figura 8**).

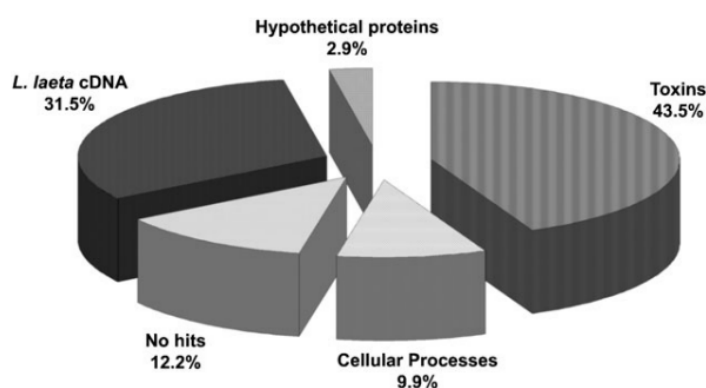


Figura 7: Classificação funcional dos transcritos das glândulas de veneno de *Loxosceles intermedia*. Gráfico demonstrando a proporção relativa dos diferentes tipos de transcritos identificados: 43,5% de toxinas, 31,5% de cDNA de *L. laeta*, 12,2% de “no hit”, 9,9% de proteínas envolvidas em processos celulares e 2,9% de proteínas hipotéticas (Fonte: GREMSKI, 2008).

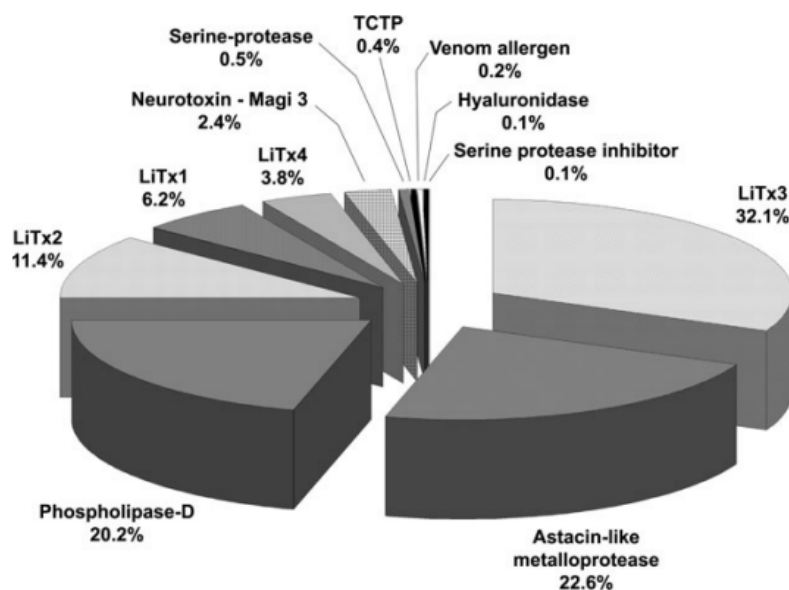


Figura 8: Identificação dos transcritos de alta abundância presentes na glândula de veneno de *L. intermedia*. Apresentação gráfica das porcentagens de transcritos identificados: 22,6% de metaloprotease, 20,2% de fosfolipase-D, 32,1% de LiTx3, 11,4% de LiTx2, 6,2% de LiTx1, 3,8% de LiTx4, 2,4% de neurotoxina Magi 3, 0,5% de serinoprotease, 0,4% de TCTP, 0,2% de alérgenos, 0,1% de hialuronidase e 0,1% de inibidor de serinoprotease (Fonte: GREMSKI, 2008).

A partir destes, e inúmeros outros trabalhos, Chaim e colaboradores em 2011 produziram um trabalho que resumia todas as toxinas e possíveis famílias de toxinas já identificadas em trabalhos relacionados as aranhas do gênero *Loxosceles*. Mais recentemente, uma toxina semelhante a um alérgeno também foi descrita no veneno de *L. intermedia* e ortólogos também foram identificados em *L. laeta* e *L. gaucho* (ESRI, 1998), bem como um inibidor de serinoprotease (SERPIN) (SCHEMCZSSEN-GRAEFF *et al.*, 2021).

Dentre estes dois principais trabalhos transcriptômicos das aranhas do gênero *Loxosceles*, foi possível identificar transcritos de proteínas pertencentes às seguintes famílias de toxinas:

- Fosfolipases-D

Conhecida por ser a principal família de toxina no veneno de *Loxosceles*, as fosfolipases-D, ou proteínas Loxtox, são as principais responsáveis pela ação dermonecrótica nos acidentes com estas aranhas. Além disso, elas também possuem

importância comprovada nos outros sintomas clínicos do Loxoscelismo: em trabalhos anteriores, foi possível observar sua ação em resposta inflamatória, de hemólise, nefrotoxicidade, agregação plaquetária, letalidade em camundongos e citotoxicidade em linhagens celulares (DA SILVA *et al.*, 2004; SWANSON; VETTER, 2006; CHAIM *et al.*, 2011; FUTRELL, 1992; RIBEIRO *et al.*, 2015).

As fosfolipases-D de *Loxosceles* já tiveram suas estruturas tridimensionais resolvidas a partir do veneno de algumas espécies, como *L. intermedia* e *L. laeta* e, por meio destes estudos, foi possível agrupar as fosfolipases-D em duas classes de acordo com seus dados estruturais e biológicos: Classe I, representada pela presença de uma ponte dissulfeto e alça hidrofóbica variável, e Classe II, representada pela presença de ponte dissulfeto que liga a alça flexível com a alça catalítica. Além disso, de acordo com a capacidade de hidrólise da esfingomielina, a Classe II pode ser subdividida em IIa e IIb, sendo a primeira mais ativa. (GIUSEPPE *et al.*, 2011; MURAKAMI *et al.*, 2005; MURAKAMI *et al.*, 2006).

- Metaloproteases

As metaloproteases são consideradas membros da família astacina, formadas por endopeptidases de zinco e encontrada em diversos seres vivos do reino animal. Desde seres humanos até os insetos possuem astacinas, e possuem diversas funções digestivas e de processamento. Entretanto, nas aranhas do gênero *Loxosceles*, as metaloproteases são consideradas proteases semelhantes às astacinas (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010). Elas são identificadas a partir da presença de dois elementos essenciais: um motivo de ligação ao zinco (*Zinc-binding Signature*) (HEXXHXXGXXHE), e o *Met-turn* (MXY), com função se estabilizar o bolsão catalítico (BODE; GOMIS-RÜTH; STÖCKLER, 1993)

No veneno destas aranhas, as metaloproteases apresentam massa molecular de aproximadamente 29kDa, papel hemorrágico e cicatricial, como ações caseinolíticas, gelatinolíticas e fibrinogenolíticas, atuando no aumento da permeabilidade tecidual e, conseqüentemente, facilitando a disseminação das outras toxinas. Nos estudos moleculares, as metaloproteases foram divididas e nomeadas de acordo com suas espécies de origem: LALP1, LALP2 e LALP3 para *L. intermedia*, LALP4 para *L. laeta* e LALP5 para *L. gaucho* (GUIMARÃES *et al.*, 2013).

Em trabalhos anteriores de nosso grupo, identificou-se no transcriptoma de *L. laeta* provenientes do Peru, metaloproteases com diferenças importantes às da mesma espécie brasileira, e por isso as denominamos LALP-LPs (MEDINA-SANTOS *et al.*, 2019).

- Hialuronidases

As hialuronidases são uma família de toxinas presentes no veneno de diversas espécies de *Loxosceles*, com massa molecular entre 33 e 63kDa. Apesar disso, apenas cerca de 0,1% dos transcritos de venenos desta aranha correspondem às hialuronidases, o que demonstra baixa concentração dessas toxinas no veneno. Entretanto, elas desempenham um papel importante, que vem sendo estudado nos últimos anos (HORTA *et al.*, 2014).

Trabalhos demonstraram que as hialuronidases são capazes de aumentar os efeitos das fosfolipases-D recombinantes em coelhos, possuindo, assim, ação na propagação do veneno (RIBEIRO *et al.*, 2015). Elas atuam de forma a lisar o ácido hialurônico, presente principalmente na matriz extracelular, difundindo e espalhando o veneno de forma gravitacional (BARBARO *et al.*, 2005; da SILVEIRA, *et al.*, 2007).

- Outras toxinas

Outras toxinas, como por exemplo as serinoproteases e os peptídeos inseticidas, apesar de presentes, ainda são pouco estudadas e elucidadas. Alguns trabalhos já identificaram a ação das serinoproteases em clivagens de ligações peptídicas, mas sem correlação exata na função do veneno. Já os peptídeos inseticidas possivelmente auxiliam as aranhas em sua alimentação, afetando a transmissão de cálcio, sódio, potássio e cloreto. Elas possuem uma massa molecular que varia de 2 a 12 kDa. (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008).

Além das famílias de toxinas descritas neste Capítulo, muitas outras foram identificadas, mas ainda não amplamente estudadas, o que dificulta a completa compreensão do veneno Loxoscélico e suas nuances. Desta forma, é importante que novos estudos imunquímicos, genéticos e bioinformáticos sejam realizados nesta área para melhor compreensão das ações do veneno desta aranha.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar as toxinas das glândulas de veneno de aranhas *L. laeta* peruanas por análise transcriptômica, caracterizando-as utilizando ferramentas *in silico* e *in vitro*.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e descrever as principais toxinas no transcriptoma de aranhas *L. laeta* peruanas;
- Comparar os transcritos identificados com os transcritos da mesma espécie brasileira publicados por Fernandes-Pedrosa em 2008;
- Comparar as atividades das hialuronidases entre venenos brasileiros e peruanos da mesma espécie *in vitro*.

1.3. MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

O transcriptoma de glândulas de veneno de *L. laeta* peruana obtido com MiSeq (Illumina) por Medina-Santos, 2019 (acesso BioSample: SAMN12002796 / SRA: SRS4898300) foi posteriormente analisado com foco nas metaloproteases identificadas. No presente trabalho, buscamos explorar a diversidade da glândula de veneno de *L. laeta* peruana a partir da avaliação de suas principais toxinas.

Utilizando a ferramenta BlastP, todos os transcritos foram anotados e analisados utilizando o banco de dados de proteínas NCBI a partir das palavras chaves “Spider” e “*Loxosceles*”. Como nenhuma diferença importante foi encontrada entre as análises utilizando as duas palavras chaves separadamente, as análises foram mescladas usando um *script* criado para essa finalidade. Transcritos com semelhanças acima de 50% às fosfolipases-D, metaloproteases, sicaritoxinas, serinoproteases, hialuronidases e *Translationally Controlled Tumor Protein* (TCTP) foram identificadas (CHAIM *et al.*, 2011; FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008; GREMSKI *et al.*, 2010) (**Figura 9**). Transcritos semelhantes a proteínas relacionadas a processos celulares também foram identificadas. Os transcritos montados foram inspecionados manualmente para classificação funcional.

O programa SignalP 3.0 foi usado para avaliar a presença de peptídeos sinal putativos nas sequências avaliadas pelo BlastP como “*no hit*”, afim de se identificar se existem sequências de proteínas que potencialmente serão externalizadas ou direcionadas (PETERSEN *et al.*, 2011).

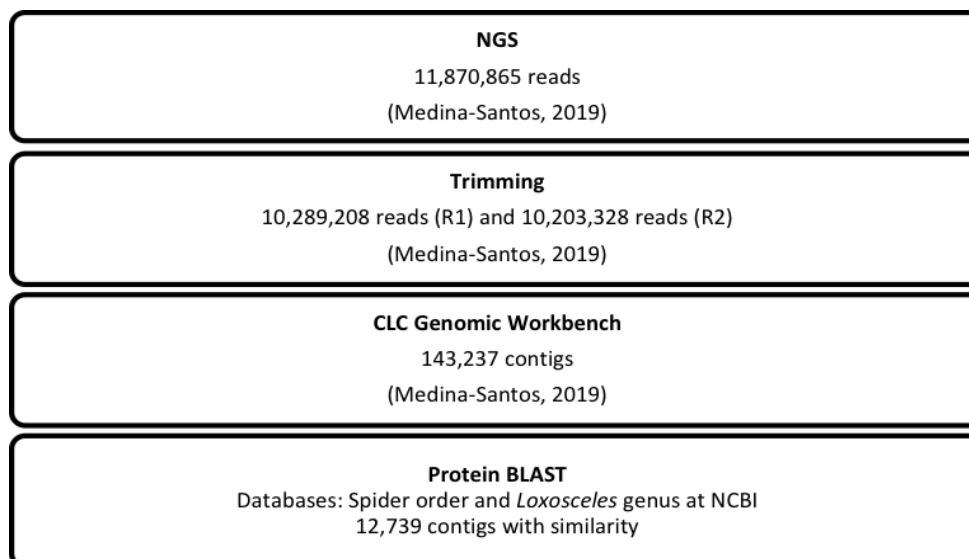


Figura 9: Fluxo de trabalho do sequenciamento NGS e análise do transcritoma de *Loxosceles laeta peruana*. (1) A partir de NGS, 11.870.865 de sequências curtas, ou reads, foram identificadas; (2) Após a trimagem das reads, 10.289.208 reads em R1 e 10.203.328 reads em R2; (3) Após a montagem, 143.237 sequências contínuas, ou contigs, foram identificados; (4) 12.739 contigs com similaridade a ordem das aranhas ou gênero *Loxosceles* foram identificados após utilização de BlastP.

1.3.2. AVALIAÇÃO DE TOXINAS E COMPARAÇÃO COM DADOS DO TRANSCRIPTOMA DE *L. LAETA* BRASILEIRA

Para avaliar a similaridade dos contigs de *L. laeta peruana* com os de *L. laeta* brasileira obtidos por Fernandes-Pedrosa, 2008 disponíveis no NCBI, utilizou-se a ferramenta MegaBlast. Ela é direcionada para sequências de alta similaridade e visa apontar as semelhanças e, em consequência, as diferenças entre esses dois bancos de dados. Uma avaliação de interseção foi fornecida e as diferenças foram selecionadas e analisadas usando o banco de dados do NCBI.

Para avaliar a similaridade e identidade dos transcritos de sicaritoxinas, fosfolipases-D e hialuronidases com sequências do banco de dados do NCBI, as sequências foram alinhadas usando a ferramenta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), utilizando as sequências que obtiveram as maiores pontuações. Os resultados foram analisados por Jalview com intensidade de coloração que avalia cisteínas conservadas, hidrofília, carga negativa e carga positiva (RECH, 2008).

O banco de dados Knottin (<https://www.dsimb.inserm.fr/KNOTTIN/>), foi utilizado para avaliar as neurotoxinas encontradas neste trabalho. Knottinas são pequenas proteínas caracterizadas por um "nó dissulfeto através de dissulfeto" especial que contém pelo menos 3 pontes dissulfeto, sendo um atrativo para a produção de medicamentos (POSTIC *et al.*, 2018).

Para avaliar as diferentes knottinas neste trabalho, o programa Protein Fold Recognition Server (Phyre2) (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id%4index>) foi usado para modelar os transcritos usando toxinas inseticidas de *L. intermedia* (LiTx1) como referência (SADE *et al.*, 2012). Após a modelagem, o resultado foi analisado e comparado por meio do PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, versão 2.0 Schrodinger, LLC - <https://pymol.org/2/>).

1.3.2.1. ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA *IN VITRO*

Para quantificar e comparar a capacidade dos venenos de *L. laeta* do Brasil e do Peru de degradar o ácido hialurônico (HA), diluições seriadas de 15 a 0,468µg de veneno foram incubadas em tampão de acetato (0,2 M de acetato de sódio-ácido acético e 0,15 M de NaCl) com 12,5µg de ácido hialurônico em placa de microtitulação de 96 poços (RECH *et al.*, 2008). Uma curva controle correspondendo a 0%, 25%, 50%, 75% e 100% do conteúdo de HA também foi feita. A placa foi incubada por 15 minutos a 37°C e, em seguida, 200µL de uma solução contendo 2,5% (w/v) de brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB) com 2% (w/v) NaOH foram adicionados a cada poço. A turbidez produzida em cada poço foi medida a 405 nm no leitor de microplacas Biorad Modelo 680, e a quantidade de HA degradada pelo veneno foi estimada a partir da curva controle. O ensaio foi realizado em duplicata. Médias dos resultados de dois experimentos independentes foram calculados e plotados. A concentração de veneno necessária para 50% da degradação de HA foi estabelecida como 1 Unidade de redução de turbidez (TRU), e os valores obtidos foram comparados para cada população de veneno de *L. laeta*.

1.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

1.4.1. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

A anotação BlastP permitiu a identificação de 13% de transcritos semelhantes a toxinas (15.865 *contigs*) e 4% semelhantes a proteínas relacionadas a processos celulares (4.779 *contigs*). “No hit” representa a maior parte da anotação, responsável por 83% dos dados (103.904 *contigs*). Essa proporção já era esperada, uma vez que o número de sequências relacionadas a proteínas de glândulas de veneno e/ou toxinas de veneno disponíveis em bancos de dados públicos ainda é muito limitado, quando comparado ao necessário para avaliar um transcriptoma completo. Menos de 10% das sequências “no hit” contêm peptídeo sinal putativo, determinado pelo programa SignalP 3.0 (dados não mostrados). Quando essas sequências “no hit” foram reavaliadas manualmente no BlastP, nenhuma semelhança significativa foi encontrada (dados não mostrados) (**Figura 10**).

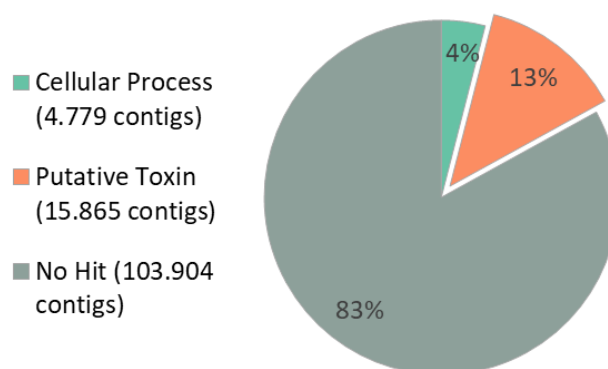


Figura 10: Anotação do transcriptoma da glândula de veneno de *L. laeta* peruana usando BlastP. Representação gráfica mostrando a porcentagem de cada grupo de transcritos identificados usando BlastP: No hit (83%), toxinas (13%) e proteínas de processo celular (4%).

A anotação BlastP de transcritos relacionados à toxina permitiu a identificação do seguinte: Fosfolipases-D (69,28% - 8,826 *contigs*), metaloproteases (20,72% - 2,640 *contigs*), sicaritoxinas (6,03% - 768 *contigs*), serinoproteases (2,28% - 291 *contigs*), hialuronidases (1,80% - 143 *contigs*) e TCTP (0,56% - 71 ESTs) (**Figura 11**).

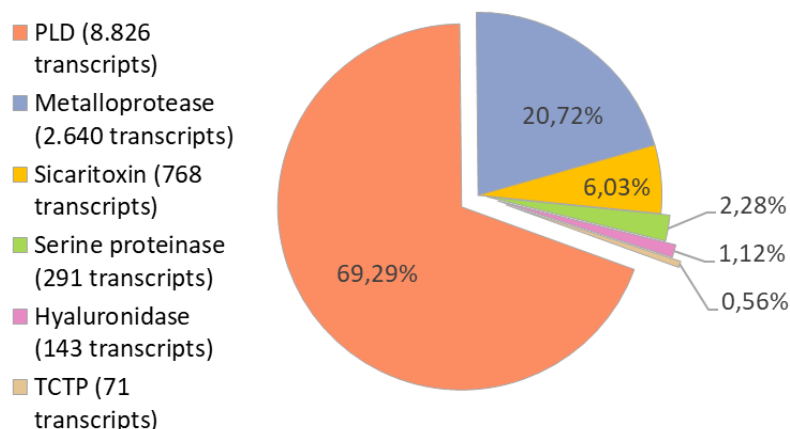


Figura 11: Transcritos identificados em veneno de *L. laeta peruana* usando BlastP. Representação gráfica mostrando a porcentagem de cada grupo de transcritos semelhantes de toxinas identificadas usando BlastP: fosfolipases-D (69,28%), metaloproteases (20,72%), sicaritoxinas (6,03%), serinoproteases (2,28%), hialuronidasas (1,80%) e TCTP (0,56%).

Apesar do alto número de transcritos identificados, apenas alguns representam sequências completas. Esta é uma limitação da técnica Illumina NGS, que utiliza moléculas fragmentadas para realizar o sequenciamento. No caso da transcriptômica da glândula de veneno, a montagem é prejudicada pela falta de genomas de referência adequados (ZOBEL-THROPP *et al.*, 2014), e por isso, a montagem *de novo* é usada na maioria dos casos. Além disso, os algoritmos utilizados para realizar este tipo de montagem ainda apresentam falhas (HOLDING *et al.*, 2018). O uso de vários indivíduos para fornecer as amostras de mRNA da glândula de veneno também pode representar um desafio adicional, uma vez que polimorfismos podem confundir a montagem, assim como a presença de famílias de toxinas com múltiplas isoformas. Portanto, os resultados aqui apresentados são relevantes para aumentar o conhecimento sobre o veneno da aranha marrom, mas devem ser analisados com cautela, sob essas limitações.

Toxinas recentemente descritas para o veneno de *L. intermedia* (toxina semelhante ao alérgeno e inibidor da serinoprotease (SERPIN) (JUSTA *et al.*, 2020; SCHEMCZSSEN-GRAEFF *et al.*, 2021) não foram encontradas neste estudo. Nesta pesquisa, um BlastP específico com essas duas toxinas nos transcritos de *L. laeta peruana* foi feito, e nenhuma sequência semelhante foi identificada. Essa identificação ausente pode trazer poucas discussões na comparação de espécies e diferenças no envenenamento.

1.4.2. AVALIAÇÃO DE TOXINAS E COMPARAÇÃO COM DADOS DO TRANSCRIPTOMA DE *L. LAETA* BRASILEIRA

As diferenças entre as sequências recuperadas no transcriptoma baseado em marcadores de sequências genéticas, ou ESTs, das glândulas de veneno de *L. laeta* brasileira, realizado por Fernandes-Pedrosa, 2008, e os contigs de *L. laeta* peruana foram organizadas em uma tabela comparativa (**Tabela 3**). As principais toxinas presentes nos venenos de *Loxosceles*, fosfolipases-D e metaloproteases, são os grupos mais expressos nos dois dados, sendo a proporção de fosfolipases-D maior nos espécimes peruanos. Outras diferenças entre os dois transcriptomas são a quantidade de neurotoxinas como sicaritoxinas, que foram quase negligenciadas na análise de *L. laeta* brasileira, e a ausência de TCTP também nesta população. Como essa toxina foi descrita mais recentemente (SADE *et al.*, 2012; BOIA-FERREIRA *et al.*, 2019), ela deve ter passado despercebida na anotação inicial deste primeiro transcriptoma.

Tabela 3: Comparação de transcritos do transcriptoma do veneno brasileiro (Fernandes-Pedrosa, 2008) e peruano de *L. laeta*. Gráfica representação de comparação de cada grupo de transcritos semelhantes as toxinas.

	Percentages	
	Brazilian <i>L. laeta</i> (Fernandes-Pedrosa, 2008)	Peruvian <i>L. laeta</i>
Phospholipase D	52,63%	69,28%
Astacin-like Metalloprotease	26,80%	20,72%
Sicaritoxin	0,53%	6,03%
Serine-protease	1,61%	2,28%
Hyaluronidase	0,43%	1,12%
TCTP	0%	0,56%
Others	18%	0%
Total	100%	100%

O MegaBlast, uma ferramenta para sequências de alta similaridade, foi utilizado para identificar as semelhanças entre os dois grupos de sequências e, em consequência, as diferenças entre os dois bancos de dados. Um gráfico de interseção para a avaliação da similaridade entre *L. laeta* brasileira com os contigs de *L. laeta* Peruana foi obtido e 93,8% dos *contigs* da espécime brasileira foram encontrados entre os contigs da espécime peruana, considerando sequências acima de 90% de identidade (**Figura 12**). Isso indica uma alta similaridade entre as duas nacionalidades de *L. laeta*, o que é esperado, visto

que ambas são de fato classificadas como a mesma espécie, mas quando comparamos a proporção de cada transcrição de toxina, podemos entender melhor a importância das diferenças entre elas (**Tabela 3**) Os demais, 6,2% dos contigs, num total de 83 sequências, foram avaliados e descritos na (**Tabela 4**). Todas as 83 sequências foram reanalisadas em BLAST com contigs de *L. laeta* peruana para confirmar sua ausência. A maioria desses contigs diferentes representam sequências sem semelhança com sequências já conhecidas e depositadas nos bancos de dados.

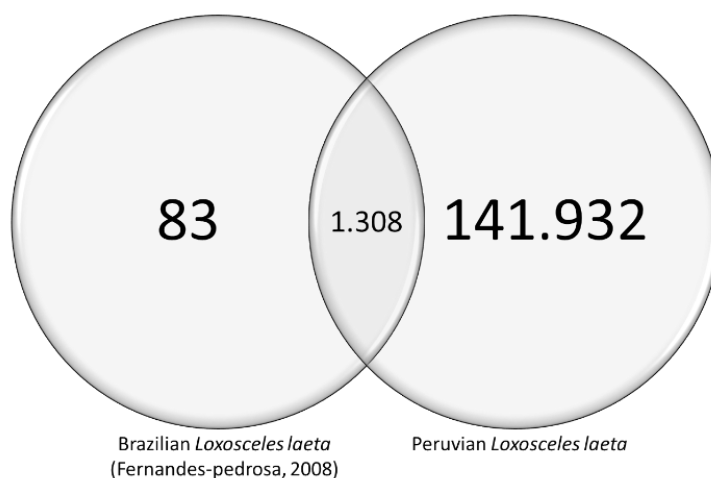


Figura 12: Gráfico de intersecção entre ESTs de *Loxosceles laeta* brasileira de Fernandes-Pedrosa, 2008 e *Loxosceles laeta* peruana, identificados usando MegaBlast. Representação gráfica mostrando a quantidade de ESTs de cada grupo e a similaridade entre eles: 83 ESTs apenas em *L. laeta* brasileira, 141.932 ESTs apenas em *L. laeta* peruana e 1.308 ESTs identificadas em ambas.

Tabela 4: ESTs brasileiras de *Loxosceles laeta* de Fernandes-pedrosa, 2008 sem semelhança com contigs peruanos de *Loxosceles laeta*.

	Nº of ESTs
mRNA sequence without any similarity	66
similar to pertussis toxin subunit 1 precursor	1
similar to cuticular protein	1
similar to putative regulator of salt tolerance	2
similar to CG1397-PA	1
similar to formin	1
similar to MAM domain containing 1	1
similar to techylectin-5 ^a	1
similar to hypothetical protein PY00628	1

similar to arrestin	1
similar to TBP-associated factor 15 isoform 1 isoform 2	1
similar to chitinase	1
similar to Arrestin, lateral eye	1
similar to CG13893-PA	1
similar to tocopherol-associated protein	1
similar to sodium solute transporter	1
similar to Salivary gland secretion 3 CG11720-PA	1
Total	83

1.4.2.1. FOSFOLIPASES-D

A fosfolipase-D é a toxina mais relevante nos venenos de *Loxosceles*, sendo a principal responsável pelo aparecimento de dermonecrose (OLVERA *et al.*, 2006) e outros efeitos deletérios (DA SILVEIRA *et al.*, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2013). Em nossa análise, as fosfolipases-D representam o grupo de toxinas mais abundantemente expresso, respondendo por quase 70% dos transcritos relacionados à toxina. Esse percentual supera a proporção de 52,63% encontrada para essa toxina no transcriptoma de *L. laeta* brasileira. Contigs representativos de fosfolipases-D, referidos como PLD_LL1P 1-5, foram selecionados usando os parâmetros BlastP. Os alinhamentos foram realizados usando Clustal Omega e analisados por Jalview com a sequência de *L. laeta* brasileira identificada no banco de dados do NCBI que obteve a maior correspondência com as sequências analisadas (**Figura 13**). Neste cluster mais abundante, a toxina dermonecrótica LISicTox-alphaIII3iii, parcial [*Loxosceles laeta*] (A333_LOXLA), obteve semelhança com 1.901 transcritos identificados como fosfolipases-D.

Apesar de todas as sequências estarem devidamente alinhadas, existem diferenças significativas entre elas. Observa-se um alinhamento com alta identidade entre os transcritos, mas a presença de dois “gaps”, um com apenas os aminoácidos *L. laeta* provenientes do Peru e outro com apenas aminoácidos de *L. laeta* do Brasil, pode apresentar uma diferença interessante quando comparada com as sequências do banco de dados.

A análise dos dados gerados a partir das fosfolipases-D demonstra alta identidade no alinhamento e apenas poucas diferenças de similaridade. Essas diferenças podem estar correlacionadas com problemas na construção da biblioteca ou com diferenças na função desta toxina. Além disso, elas podem estar relacionadas com a atividade *in vitro*

apresentadas por Guimarães e colaboradores (2013), em que se confirmou que ambos os venenos, brasileiro e peruano, podem hidrolisar a esfingomielina, mas com atividade estatisticamente maior no veneno peruano (GUIMARÃES *et al.*, 2013).

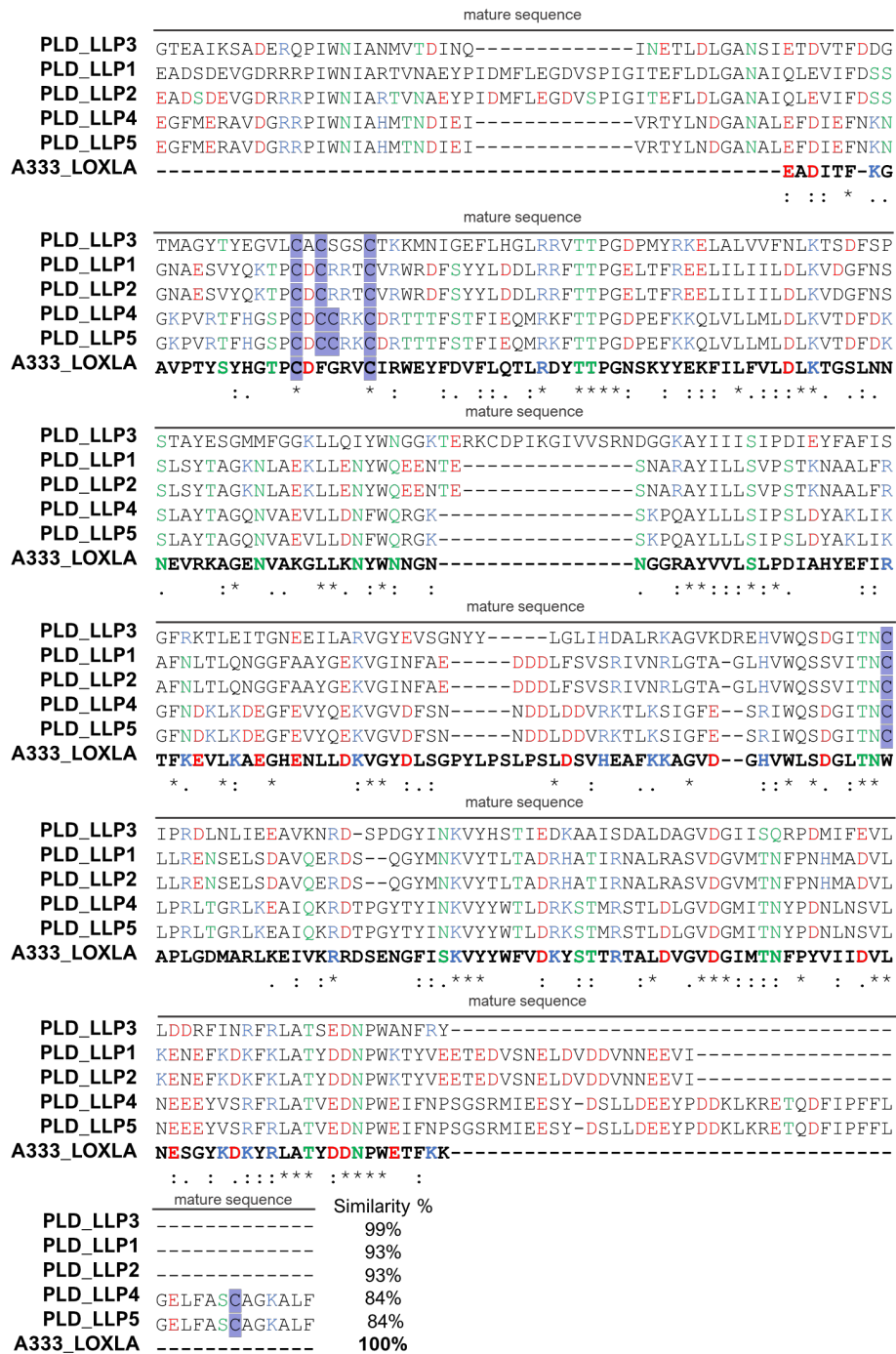


Figura 13: Alinhamento de contigs maduros representativos de Fosfolipases-D do transcriptoma de *L. laeta* peruana com sequência de *L. laeta* identificada em NCBI feita por Clustal Omega e analisada por Jalview. Alinhamento feito por Clustal Omega e analisado por Jalview. Intensidade de coloração por análise de cisteínas conservadas

Além de serem consideradas sicaritoxinas, as toxinas de aranha com atividade inseticida também são definidas por serem peptídeos ricos em cisteína que muitas vezes assumem a conformação de nó de cisteína inibidor (ICK). Estas toxinas são classificadas como knottinas. A análise do banco de dados Knottin identificou quatro sicaritoxinas com características a serem declaradas como knottinas (**Tabela 5**). Essas knottinas foram comparadas com as três knottinas de *L. intermedia* disponíveis no banco de dados do NCBI, e essa comparação identificou semelhanças em poucas propriedades, mas uma pontuação Knoter1d mais baixa em todas as quatro sequências. Esta pontuação verifica se a sequência analisada é uma knottina baseando-se em forte similaridade, ancestral familiar (taxonomia), função familiar, presença de cisteínas e loops inter-cisteína. Quando o escore for maior que 20, a sequência é considerada uma knottina (POSTIC *et al.*, 2018).

Tabela 5: Knottinas identificadas no transcriptoma de *L. laeta* peruana usando Knottin Database. Comparação de massa molecular, ponto isoelétrico, número de átomos, número de cisteínas, Knoter1d score e loop score de Knottinas de *L. laeta* (LLP_U1sctx's) and *L. intermedia* (U1-SCRTX-Li1a, U2-SCRTX-Li1a and LiTx3).

Sequências	Massa molecular	Ponto isoelétrico	Nº átomos	Nº cisteínas	Knoter1d score	Loop score
LLP_U1sctx1	8295.59	9.16	1139	10	30	8
LLP_U1sctx2	8844.19	8.74	1205	10	33	8
LLP_U1sctx3	8638.97	8.59	1182	10	32	8
LLP_U1sctx4	6746.78	8.60	913	10	29	8
U1-SCRTX-Li1a	7431.63	8.76	1009	10	35	8
U2-SCRTX-Li1a	7920.11	8.11	1066	10	37	8
LiTx3	5648.49	8.76	744	10	29	8

O programa Phyre2 foi usado para modelagem da estrutura 3D das quatro LLP_U1sctx usando U1-SCRTX-Li1a de *L. intermedia* como modelo, e os resultados foram analisados em PyMOL. As pontes dissulfeto foram marcadas em amarelo na **Figura 15A**, onde se observa que as proteoformas são muito semelhantes entre si. Além disso, uma sobreposição das estruturas de LLP_U1sctx com U1-SCRTX-Li1a, U2-

SCRTX-Li1a e LiTx3 na **Figura 15B**, permitiu a identificação de semelhanças, mas também diferenças importantes entre eles.

Com a sobreposição dos modelos estruturais das cinco sicaritoxinas com as três LiTx1, observa-se um grande nível de similaridade, que também podem ser correlacionadas com as presenças do gap no alinhamento.

Apesar da grande similaridade encontrada entre as sicaritoxinas de *L. laeta* e as descritas de *L. intermedia*, nenhuma molécula dessa classe foi descrita no trabalho de Fernandes-Pedrosa e colaboradores (2008). Mas, com uma reanálise dos dados das sequências brasileiras de *L. laeta* geradas por este mesmo trabalho, na base de dados do NCBI, foi possível identificar e correlacionar uma sequência de sicaritoxina com similaridade *in silico* à uma knottina (dados não mostrados). No trabalho de Fernandes-Pedrosa e colaboradores (2008), esta mesma toxina foi identificada como neurotoxina, mas nenhuma análise extra foi fornecida. A identificação desses dados pode reforçar a importância de novas anotações de bases de dados mais antigas com novas tecnologias e conhecimentos mais avançados (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008).

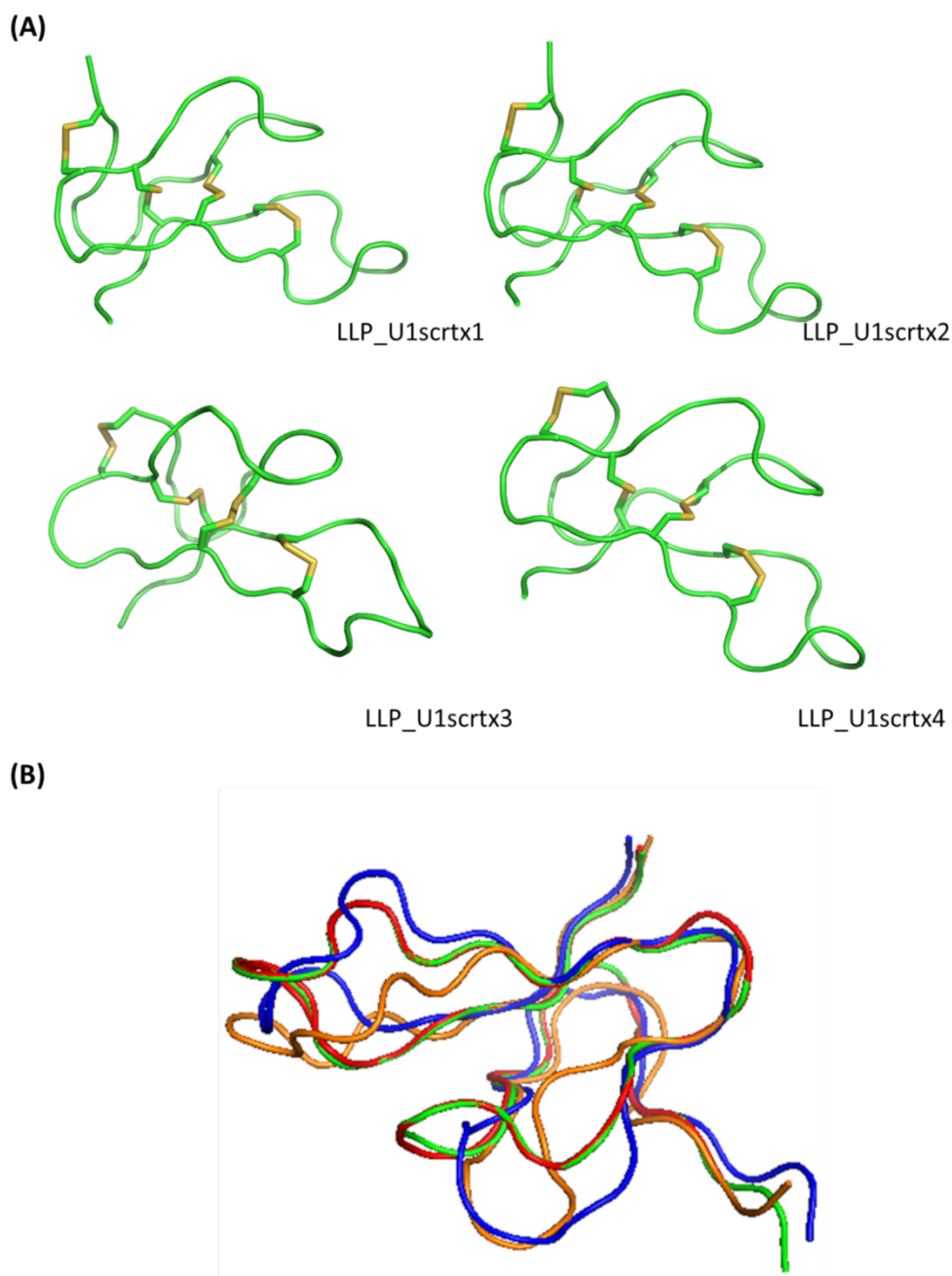


Figura 15: Modelagem molecular e sobreposição das LLP_U1sctx's identificadas por análise transcriptômica usando Phyre2 e análise dos resultados por PyMOL. (A) Modelagem de quatro prováveis LLP_U1sctx's. Em amarelo – pontes dissulfeto. (B) Sobreposição de modelos estruturais de LLP_U1sctx's com U1-SCRTX-Li1a, U2-SCRTX-Li1a e LiTx3. Em Vermelho – quatro prováveis LLP_U1sctx's; em azul - U1-SCRTX-Li1a; em verde – U2-SCRTX-Li1a e em laranja - LiTx3.

1.4.2.3. HIALURONIDASES

Outra importante toxina nos efeitos tóxicos dos venenos de *Loxosceles* são as hialuronidases, já que sua neutralização pode prevenir a disseminação de uma lesão dermonecrotica (CHAIM et al., 2011). Contigs representativos de hialuronidases foram selecionados usando os parâmetros BlastP (Hyalu_LL e Hyalu_LL) e os alinhamentos foram realizados utilizando Clustal Omega e analisados por Jalview com as sequências de *L. intermedia* e *L. laeta* do banco de dados NCBI que obtiveram a maior correspondência com as sequências analisadas: Hialuronidase [*Loxosceles intermedia*] (HYAL_LOXIN) e a Hialuronidase [*Loxosceles laeta*] (Hyalu_LL / LLAE0048C), combinaram com 143 transcritos de hialuronidases de *L. laeta* peruana (Figura 16).

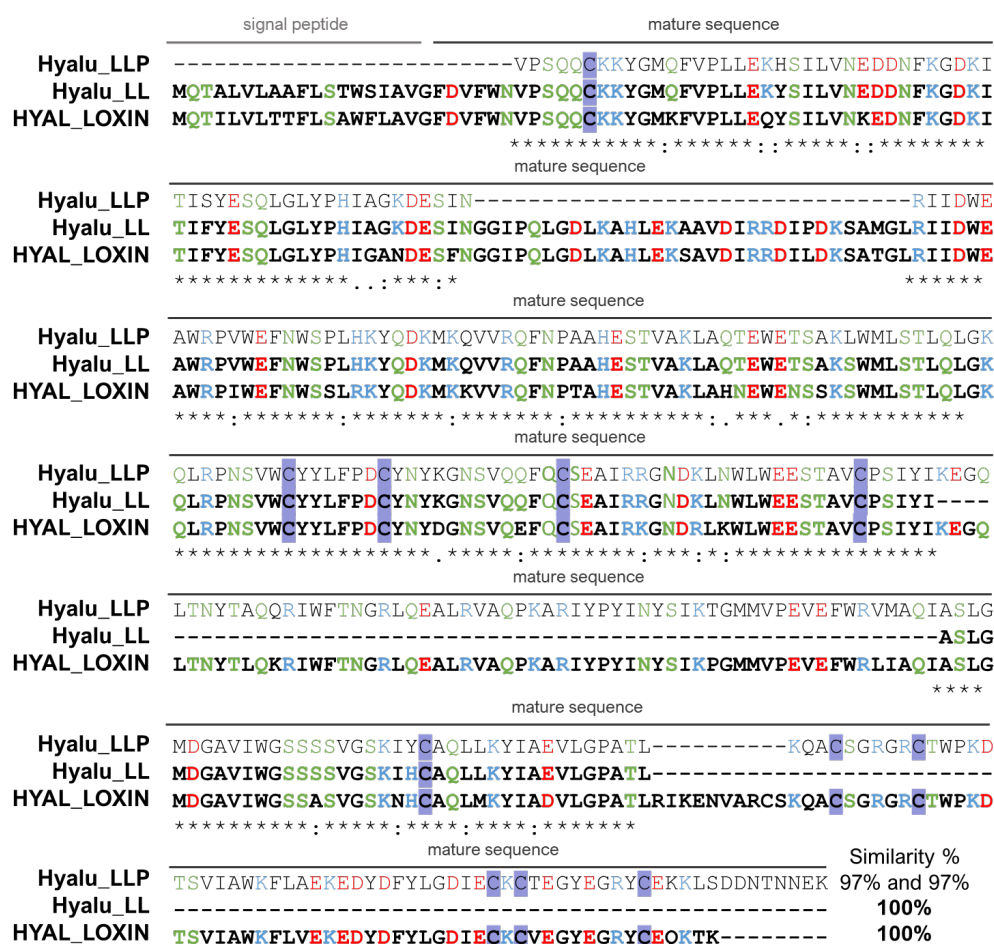


Figura 16: Alinhamento de contigs maduros representativos de Hialuronidase do transcriptoma de *L. laeta* peruana (Hyalu_LL) com sequências de *L. laeta* (Hyalu_LL) e *Loxosceles intermedia* (HYAL_LOXIN) identificadas em NCBI feita por Clustal Omega e analisada por Jalview. Intensidade de coloração por análise de

cisteínas conservadas (realce azul turquesa), hidrofiliçidade (verde), carga negativa (vermelho) e carga positiva (azul). Porcentagens de semelhanças das sequências de Hyalu_LL em comparação com Hyalu_LL e HYAL_LOXN são apresentadas no final do alinhamento.

1.4.2.4. ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA *IN VITRO*

Muitos estudos já comprovaram diferenças importantes entre o envenenamento e as toxinas de *L. laeta* brasileira e peruana. Guimarães e colaboradores (2013) observaram que o veneno peruano é mais letal para camundongos quando comparado ao brasileiro e a atividade da fosfolipase-D do veneno peruano é maior que o brasileiro. Medina-Santos e colaboradores (2019) observaram diferenças importantes entre a atividade das metaloproteases de ambos os venenos (MEDINA-SANTOS *et al.*, 2019; GUIMARÃES *et al.*, 2013).

Seguindo esses achados, avaliou-se as diferenças da atividade da hialuronidase nesses dois venenos. A atividade hialuronidásica foi calculada pela quantidade de veneno necessária para degradar 50% do ácido hialurônico presente na solução (TRU).

Aproximadamente 4,58 µg do veneno de *L. laeta* brasileira são necessários para degradar 50% do ácido hialurônico disponível, enquanto com o veneno de *L. laeta* peruana são necessários aproximadamente 11,8 µg de veneno (**Figura 17**).

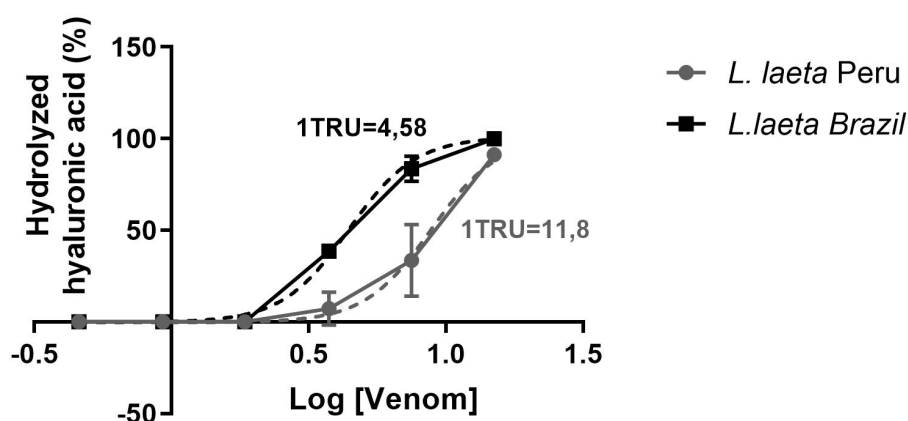


Figura 17: Atividade hialuronidásica. Atividade representada em porcentagem de ácido hialurônico hidrolisado. Em preto, a curva de atividade do veneno de *L. laeta* brasileira e em cinza a atividade do veneno de *L. laeta* peruana. O teste foi realizado em duplicatas.

TRU, ou unidade de redução de turbidez, significa a quantidade de veneno em μg necessário para degradar 50% do ácido hialurônico disponível.

Uma alta identidade no alinhamento das hialuronidases é apresentada, com dois pontos de *gaps* interessantes. Uma vez que nenhuma comparação da atividade da hialuronidase *in vitro* de *L. laeta* brasileira e peruana foi feita até agora, o ensaio da atividade da hialuronidase *in vitro* foi necessário para tentar entender melhor essas modificações do veneno. A partir do resultado deste ensaio, observamos uma diferença entre a atividade desta toxina nos venenos de *L. laeta* brasileira e peruana. Essa diferença pode ser observada no 1TRU (unidade redutora de turbidez), onde o veneno peruano necessita quase três vezes mais veneno para atingir o mesmo 1TRU do veneno brasileiro. Essa diferença na atividade do veneno, apesar de uma maior proporção de transcritos relacionados à hialuronidase na amostra peruana, destaca a necessidade e importância de estudos proteômicos a respeito desses venenos, que apesar de ainda não realizados, seriam fundamentais para ajudar na compreensão da variabilidade deste veneno.

1.4.2.5. OUTRAS TOXINAS

Todas as serinoproteases identificadas e transcritos de TCTP deste trabalho revelaram sequências fragmentadas e, por esse motivo, os alinhamentos não foram apresentados. Estas proteínas atuam na transmissão neuromuscular e contribuem para a resposta alérgica e inflamatória do loxoscelismo. Por essas razões, é importante estudá-los em trabalhos futuros, utilizando diferentes métodos de montagem, uma vez que podem estar interligados ao fato de que o veneno peruano pode ser potencialmente mais tóxico (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008).

Após a análise e avaliação dos transcritos identificados, diversas metodologias podem ser utilizadas para dar continuidade aos estudos com estes dados, dependendo de qual o objetivo final do projeto. Neste caso, a identificação de diferenças entre os transcritos brasileiros e peruanos de uma mesma espécie pode colaborar para um maior entendimento do quadro de envenenamento, direcionar melhor as abordagens farmacêuticas disponíveis e até mesmo servir de base para desenvolvimento de novos tratamentos, como o desenho e produção de proteínas multiepitópicas recombinantes que substituam a utilização de veneno na produção de antivenenos. Outra abordagem

interessante nesse contexto seria identificar os epitopos de toxinas loxoscélicas e avaliar a importância destes na resposta imune de doenças, bem como todo ou qualquer problema relacionado a presença de um antígeno. Mas como estudar a importância de todos os possíveis epitopos presentes em todas sequências identificadas em um transcriptoma, de forma eficiente?

CAPÍTULO II

PEPLESS - DESENVOLVIMENTO DE UMA FERRAMENTA PARA MAPEAMENTO DE EPITOPOS

2.1. INTRODUÇÃO

2.1.1. ANTICORPOS E SUAS INTERAÇÕES COM ANTÍGENOS

Os anticorpos são glicoproteínas capazes de neutralizar e opsonizar patógenos em uma resposta imune a partir da ligação em antígenos e recrutamento de sistema efetores para eliminá-los. Eles são produzidos por linfócitos B, e por seu mecanismo de maturação, se tornam moléculas de grande afinidade para determinados antígenos (ABBAS *et al.*, 2008). Eles têm sua forma representada por um Y, sendo compostos por dois tipos de cadeias polipeptídicas: duas cadeias pesadas de 50 kDa e duas cadeias leves de 25 kDa (ABBAS *et al.*, 2008). Além disso, essas cadeias apresentam uma região variável e uma constante. Nas cadeias pesadas, é possível identificar porções carboxílicas constantes, as regiões Fc, que são responsáveis pelas ações biológicas dos anticorpos. Em adição, nas cadeias leves e pesadas, identifica-se os fragmentos identificados como regiões Fab, sendo responsável por ser o local onde o antígeno se liga ao anticorpo. Estas características tornam os anticorpos foco de muitos estudos biotecnológicos na busca de tratamento de doenças e produção de fármacos (ABBAS *et al.*, 2008) (**Figura 18**).

Algumas técnicas foram desenvolvidas com os passar dos anos para melhor utilização dos anticorpos nos estudos científicos, como por exemplo a produção de anticorpos monoclonais (mAb), onde o clone produtor é capaz de secretar um tipo de imunoglobulina que reconhece apenas um tipo de alvo, podendo ser direcionado para qualquer tipo de antígeno (KÖHLER & MILSTEIN, 1975). Com o tempo, a associação de mAbs com técnicas de DNA recombinante permitiu o desenvolvimento de anticorpos recombinantes, sendo produzidos por vetores plasmidiais ou virais.

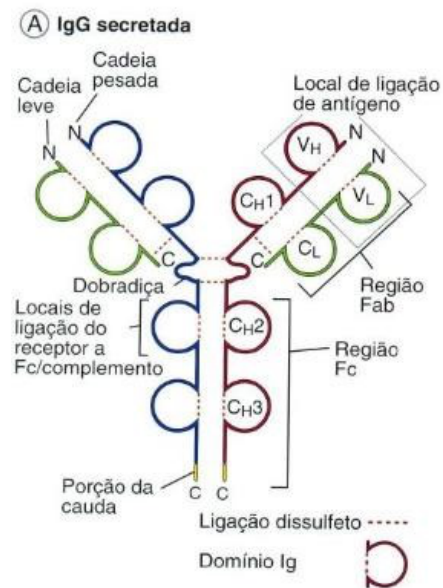


Figura 18: Estrutura dos anticorpos. Estrutura básica de um anticorpo apresentando principalmente as cadeias leves, cadeias pesadas, local de ligação do antígeno, região Fab e região Fc. (Fonte: Adaptado de ABBAS *et al.*, 2008)

A interação antígeno-anticorpo é definida pela ligação de um antígeno no sítio de combinação do anticorpo, local constituído por regiões hipervariáveis de cadeias leves e pesadas. A região onde ocorre esta interação no anticorpo é denominada paratopo, e a região alvo do antígeno, epitopo. Estas ligações podem ser medidas através da afinidade e avides em que foram realizadas, sendo a afinidade considerada a força da reação e a avides é uma medida da força total da ligação do antígeno. Por serem feitas por via de ligações não-covalentes, as interações antígeno-anticorpo são comumente de natureza reversível (ABBAS *et al.*, 2008).

2.1.2. EPITOPOS

Antígenos são consideradas todas e quaisquer entidades que possam ser reconhecidas por algum componente do sistema imune. (ARNON & VAN REGENMORTEL, 1992). No antígeno, os epitopos são consideradas regiões existentes quando analisadas juntamente ao anticorpo ligado nos mesmos. Eles podem ser classificados de acordo com suas estruturas, se contínuas ou descontínuas: Epitopos lineares ou conformacionais.

Os epitopos contínuos, ou lineares, são classificados quando sua sequência de resíduos é identificada de forma linear em uma proteína. Por outro lado, os epitopos descontínuos, ou conformacionais, são formados de pequenas sequências de aminoácidos geograficamente distantes na estrutura primária da proteína, mas que se aproximam na estrutura tridimensional do antígeno (ARNON & VAN REGENMORTEL, 1992).

Diversas metodologias podem ser utilizadas para identificar e avaliar a importância de diferentes epitopos dentro de uma resposta imune ao antígeno. Este tipo de estudo pode permitir um tratamento direcionado a um alvo de interesse, a partir da sua síntese e utilização em técnicas específicas como é o caso de imunizações visando respostas específicas.

2.1.3. MAPEAMENTO DE EPITOPOS

As principais metodologias para identificação e mapeamento de epitopos são: cristalografia de raios-X, método de SPOT synthesis (que nesse trabalho será referida apenas como “SPOT”) e predições computacionais. Apesar da técnica de cristalografia ser a mais eficaz, ela é muito laboriosa, de alto custo e requer longo tempo de experimentação, o que traz dificuldades a sua utilização. Já as predições computacionais, apesar de serem de baixo custo e basicamente requererem apenas um dispositivo computacional, não são muito confiáveis e diversos erros são possíveis em sua utilização. Desta forma, a utilização de imunoenaios de SPOT se tornou a melhor opção em relação a qualidade de resultados e facilidade de utilização (FRANK, 2002).

A técnica imunológica de SPOT permite a criação e avaliação de SPOTs circulares reativos em uma membrana, podendo ser sintetizada de forma manual ou automatizada. Esta metodologia permite uma ampla diversidade de aplicações biotecnológicas, como por exemplo o estudo de analitos imunologicamente relevantes, análise por transformação química ou enzimática de arranjos de peptídeos imobilizados, avaliação de atividade de clivagem e imunização de animais (FRANK, 2002).

Quando a técnica de SPOT é utilizada para o mapeamento de sítios de interação, como na relação antígeno-anticorpo, muitos peptídeos com alta identidade precisam ser sintetizados, uma vez que possuem diferenças pequenas mas importantes e que necessitam ser analisadas (FRANK, 1992; LAUNE *et al.*, 2002).

A síntese das membranas é iniciada a partir da porção C-terminal do último aminoácido de cada sequência e, através da adição de piperidina 20 % em dimetilformamida, o grupo protector fluorenilmetoxicarbonilo, ou FMOC, é retirado do acoplamento com a função amina do aminoácido, disponibilizando-a para realizar se ligar com o próximo aminoácido a ser adicionado (**Figura 19**) (FELICORI *et al.*, 2006). Para evitar outras reações indesejadas entre aminoácidos, as funções NH₂ livres são acetiladas utilizando anidrido acético 10 %. Por fim, por meio da utilização de ácido trifluoracético, os grupos protetores dos aminoácidos são retirados (HILPERT *et al.*, 2007).

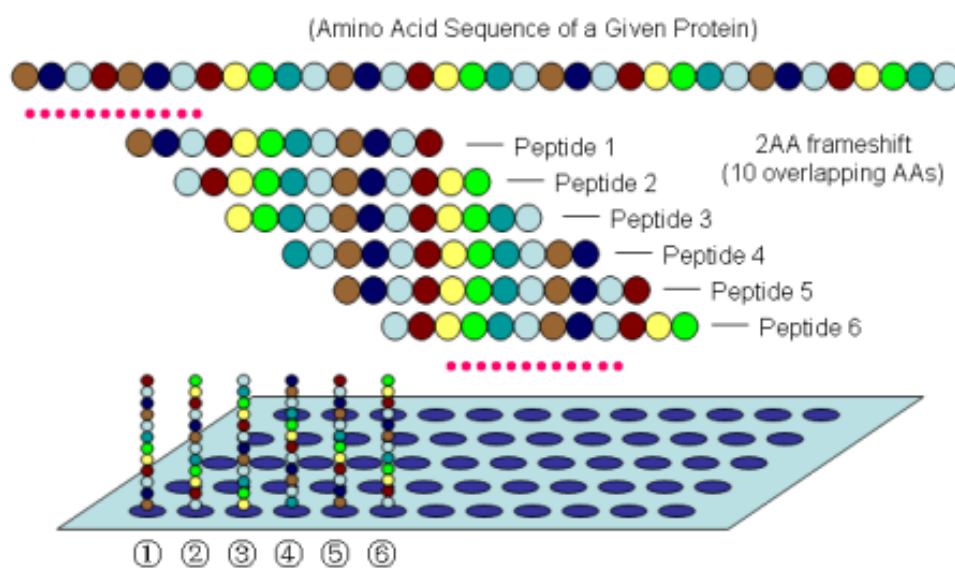


Figura 19: Produção de membranas. Fluxograma de produção de mapeamento de epítopos em que as sequências de aminoácidos são sintetizadas pela sobreposição de sequências peptídicas (Fonte: Peptron, Inc. Designing peptides handbook, 2nd edition, 2005).

Após a síntese, a membrana pode ser armazenada envelopada em celulose e refrigerada a -20 °C para ser empregada nos mais diversos tipos de imunoenaios. Na maioria das vezes, a revelação é feita a partir da adição 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) e (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2 (MTT), que ao reagir com fosfatase alcalina, gera um resultado colorimétrico. É importante ressaltar que após a utilização da membrana, a mesma deve ser regenerada para ser reutilizada em outros ensaios. A regeneração é feita através de sucessivas lavagens de 10 minutos, a partir de dimetilformamida (DMF); reagente A (uréia 8M, 1 % de SDS e 0,1 % de 2-

mercaptoetanol) e reagente B (etanol, água e ácido acético nas proporções 50:40:10 vol/vol/vol) (HILPERT *et al.*, 2007).

A metodologia de SPOT pode ser amplamente integrada em diversos tipos de estudos. Por exemplo, na imunologia, as membranas podem ser utilizadas para otimizar a produção de peptídeos antimicrobianos, na genética, para a análise de interações entre proteínas, em conjunto com outras técnicas como microarrays e proteomas. Além disso, diferentes projetos que empregam a técnica de SPOT estão intimamente ligados com técnicas bioinformáticas, usadas para realizar análises complementares, como é o caso da realização da predição de epitopos lineares utilizando redes neurais artificiais computadorizadas. Neste caso, a técnica de aprendizado de máquina é utilizada para avaliar peptídeos de tamanhos variados a fim de identificar epitopos.

2.1.4. PEPTÍDEOS

Peptídeos são definidos a partir da união entre dois ou mais aminoácidos através de ligações peptídicas. Eles possuem amplas atuações biotecnológicas, como no estudo, produção e desenvolvimento de antibióticos, hormônios, fatores de liberação hormonais, neuropeptídeos, neurotransmissores ou toxinas (GUTTE *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2004).

Após a descoberta de diversos peptídeos naturais com funções biológicas variadas e de grande importância, o interesse por análises mais aprofundadas destes componentes cresceu rapidamente. Paralelamente, também se intensificou a busca pelo desenvolvimento e síntese destas moléculas a fim de facilitar seu estudo, pois sua extração pode ser laboriosa, demorada ou até mesmo inviável. Com este objetivo, metodologias para a síntese, estudo e manipulação de peptídeos foram criadas e aprimoradas (GLADA *et al.*, 1998).

Os principais métodos para a síntese de peptídeos são: a síntese química, em que se utiliza um reagente químico para ativação do ácido carboxílico; a síntese enzimática, em que a ligação peptídica é mediada por uma enzima; e a síntese via tecnologia do DNA recombinante, em que o gene codificante do peptídeo de interesse é clonado e expresso em microrganismos modificados (MACHADO *et al.*, 2004).

A purificação de peptídeos sintéticos é comumente realizada a partir de técnicas de cromatografia, sendo a cromatografia líquida de fase reversa considerada padrão ouro. Nesta técnica, a adsorção dos peptídeos ocorre em uma matriz estacionária hidrofóbica e

a partição dos solutos acontece entre a matriz e a fase móvel. Já para sua caracterização, onde é possível avaliar sua estrutura, a cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese capilar podem ser aplicadas (MILLER *et al.*, 1996).

Na busca por técnicas mais refinadas para estudar as interações de peptídeos, em 1990, uma técnica denominada SPOT Synthesis foi apresentada pela primeira vez por Franck R. e colaboradores no 21º Simpósio Europeu de Peptídeos em Barcelona, Espanha, como um método rápido e fácil de sintetizar grande número de peptídeos (MERRIFIELD, 1969; REINEKE *et al.*, 1999). Em 2002 essa técnica foi aprimorada com a síntese de peptídeos sobre folhas de membrana de celulose. Uma amostra de líquido é dispensada em uma membrana, que o absorve formando um ponto circular e solventes de baixa volatilidade são adicionados. Estas membranas podem então ser utilizadas para diversos tipos de análises dos peptídeos.

2.1.5 A BIOINFORMÁTICA NO DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS

A bioinformática pode ser definida como a aplicação da tecnologia da informação para a manipulação de dados biológicos, e o desenvolvimento de ferramentas e tecnologias para facilitar e ampliar estes estudos está em constante transformação (GIBAS *et al.*, 2001).

Na criação de ferramentas bioinformáticas, diversas linguagens de programação são utilizadas para a geração de softwares, ferramentas e *scripts*. Uma das linguagens mais aplicadas na bioinformática é conhecida como *Python*: uma linguagem de alto nível, multiplataforma, com grande número de bibliotecas de código aberto e que pode ser acoplada a diversos módulos, que são uma espécie de coleção de funções, como *numpy* e *matplotlib* (ESRI, 1998).

Biopython, uma associação desenvolvedora de ferramentas em *python* para biologia computacional, inclui os módulos e *scripts* mais utilizados na bioinformática, sendo capaz de auxiliar em projetos de diversas naturezas biológicas, além de estar também conectado a outros dispositivos bioinformáticos, como por exemplo BLAST e ferramentas de alinhamento de sequências (CHANG *et al.*, 2009).

Uma etapa importante da criação e desenvolvimento de ferramentas bioinformatizadas é denominada “estudo de caso”, onde são realizados testes para

verificação da funcionalidade de todas as ferramentas acopladas, normalmente utilizando temas relevantes de importância biológica. Esta fase é realizada após o término da criação do sistema, visando demonstrar a importância e inovação apresentada pelo projeto da ferramenta. Um exemplo é o caso da plataforma Yvis (Antibody Visualization platform), uma ferramenta que realiza a visualização de alinhamentos de alta densidade de anticorpos com um banco de dados integrado. Para o estudo de caso dessa plataforma foram utilizados anticorpos anti-HIV, demonstrando a versatilidade da plataforma Yvis e fácil visualização de dados de alta densidade (CARVALHO *et al.*, 2019).

Com a crescente geração de dados biológicos, gama de aplicabilidades da técnica de SPOT e dificuldades da utilização dessa metodologia para uma grande quantidade de sequências diferentes, surge a necessidade do desenvolvimento de técnicas computacionais a fim de otimizar e viabilizar a comprovação de resultados *in silico* utilizando metodologias *in vitro*.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma ferramenta capaz de analisar e visualizar em larga escala o mapeamento de epitopos e suas interações em técnicas de SPOT, a partir da seleção de epitopos não-redundantes.

2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Propor metodologia para gerar e selecionar peptídeos não-redundantes a partir de sequências brutas;
- Automatizar a análise de resultados a partir de conexão com a ferramenta comumente utilizada para este fim;
- Implementar a metodologia em uma plataforma que permita ao usuário realizar todas as análises de forma unificada.

2.3. MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1. PEPLSS: DESENVOLVIMENTO DA FERRAMENTA

O desenvolvimento da ferramenta PepLess foi realizado na linguagem de programação Python. Ela foi escolhida por se tratar de uma linguagem de utilização universal para ciência de dados biológicos, além de possuir diversas bibliotecas que auxiliam na automação de *scripts*.

O nome da ferramenta, PepLess, buscou a junção das palavras “peptide” (em português, peptídeo) e “less” (em português, menos), trazendo a idéia de diminuição do número de peptídeos que precisariam ser sintetizados, sendo esta a principal função da ferramenta.

Afim de apresentar os requisitos funcionais que descrevem o que a ferramenta deve ser capaz de realizar, levantou-se todas as necessidades desejadas a partir da análise das atividades comumente realizadas sem a utilização da ferramenta PepLess (**Tabela 6**).

Tabela 6: Requisitos funcionais do projeto. Demonstração de todos os requisitos funcionais do projeto, divididos por identificação e prioridade.

IDENTIFICAÇÃO	REQUISITO FUNCIONAL	PRIORIDADE
RF001	Ferramenta com apresentação gráfica intuitiva	Importante
RF002	Ações executadas através de botões	Desejado
RF003	Tela inicial apresente acesso as principais funcionalidades e a um tutorial	Desejado
RF004	Tela de envio de arquivo com sequências em formato FASTA deve receber arquivo e utilizar os arquivos de tamanho e cobertura previamente disponibilizados na pasta do sistema	Importante
RF005	Arquivo é fragmentado de acordo com tamanho e cobertura	Essencial
RF006	Ferramenta gera arquivos com as fragmentações dos tamanhos e coberturas solicitadas e gráficos com os valores das fragmentações	Essencial
RF007	Tela de alinhamentos apresentando duas formas de alinhar: Apenas entre os peptídeos criados e entre os peptídeos com as sequências iniciais	Importante
RF008	Alinhamentos realizados a partir da conexão com ferramenta MAFFT, que possui expertise em alinhar grande quantidade de dados	Essencial
RF009	Tela de criação de membrana que apresente: Quantidade de membranas necessárias a partir	Essencial

	da quantidade de peptídeos criados, membrana gráfica apresentando a quantidade de SPOTs necessários e arquivo para ser utilizado em sistema de síntese de membranas	
RF010	Tela de análise de imunoenaios: Local para envio de arquivo de imagem de membranas com resultados a serem analisados	Importante
RF011	Conexão com a ferramenta ImageJ por botão a partir do envio do arquivo de imagem de imunoenaios	Essencial
RF012	Criação de membrana computadorizada a partir dos resultados numéricos gerados em análise de pixels pela ferramenta ImageJ	Importante
RF013	Tela de análise de resultados: Escolha da porcentagem de resultados a serem considerados como positivos, gerar alinhamentos em ferramenta MAFFT e gerar membrana artificial apenas com os resultados considerados positivos	Importante

Além disso, é importante identificar e descrever os requisitos não funcionais para a ferramenta, que são os requisitos atribuídos a qualidade e as necessidades que a ferramenta possa ter (**Tabela 7**).

Tabela 7: Requisitos não funcionais do projeto. Demonstração de todos os requisitos não funcionais do projeto, divididos por identificação e prioridade.

IDENTIFICAÇÃO	REQUISITO NÃO FUNCIONAL	PRIORIDADE
RNF001	Ferramenta deve apresentar resposta de resultados com um tempo máximo de atraso de 5 segundos	Importante
RNF002	Ferramenta deve ser compatível com Windows, Mac e Ubuntu	Desejado
RNF003	Padrão de cores automático para gráficos e membranas	Desejado
RNF004	Ordem de apresentação dos peptídeos segue a ordem das sequências originais	Desejado

Para melhor visualização e compreensão das funções dos requisitos, os diagramas de caso de uso são utilizados para apresentar as funcionalidades da ferramenta pelo ponto de vista do usuário final. Em um diagrama de caso de uso, o usuário é representado por um boneco, as funcionalidades por balões e as relações entre usuários e funcionalidades, são representadas por linhas contínuas, quando relacionadas ao usuário ou não contínuas, quando relacionadas a ações internas da ferramenta (**Figura 20**).

Diagrama de caso de uso

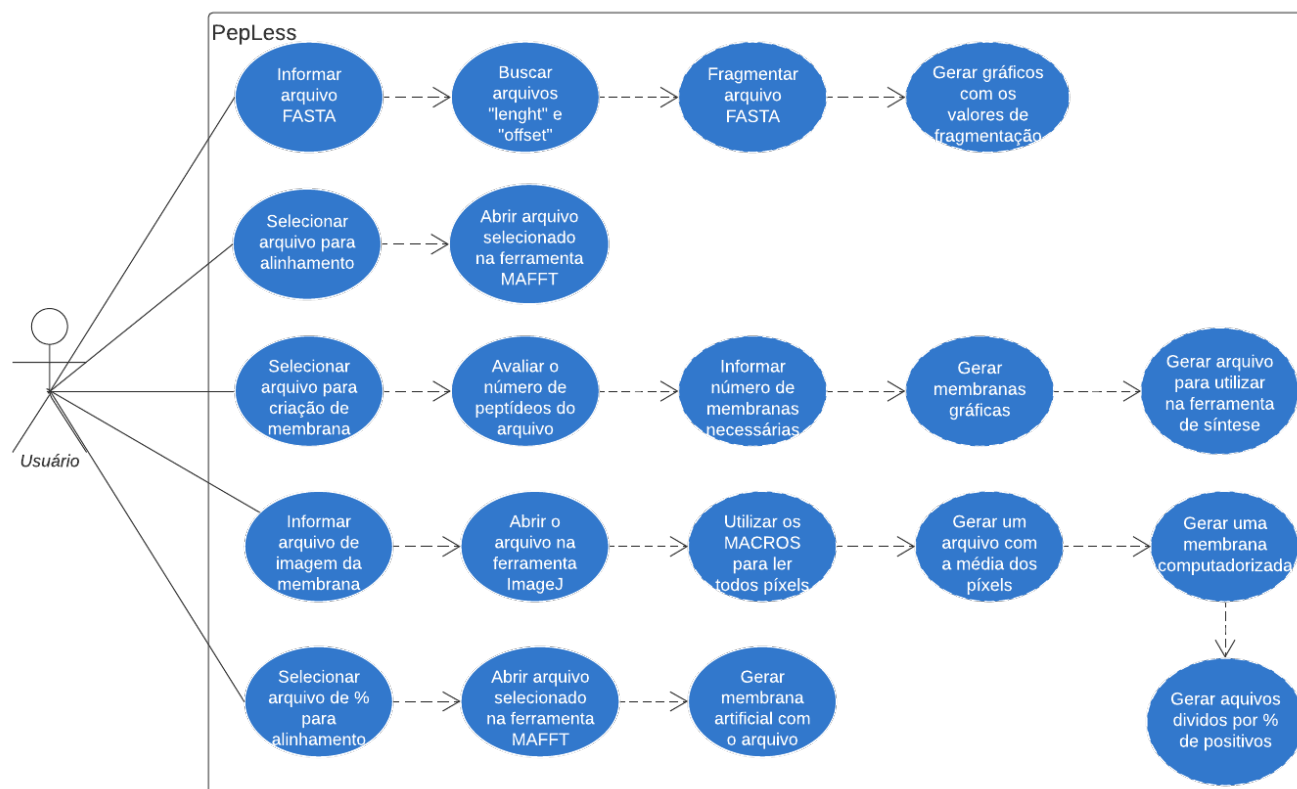


Figura 20: Diagrama de caso de uso da ferramenta PepLess. Representação de todas as ações do sistema, sendo o usuário representado por um boneco, as funcionalidades representadas por balões e as relações entre eles representadas por setas contínuas, no caso de relações de usuário com funcionalidades, e não contínuas, no caso de relações dentro do sistema.

As principais funcionalidades da ferramenta foram definidas para a criação de um fluxo de trabalho (**Figura 21**):

- Receber sequências em larga escala e fragmentá-las em peptídeos de acordo com a necessidade do usuário;
- Selecionar peptídeos não-redundantes, isto é, peptídeos não idênticos, dentre os criados a partir da fragmentação;
- Demarcar cada peptídeo criado, apresentando sua(s) sequência(s) de origem;
- Gerar apresentações visuais dos resultados em gráficos e alinhamentos, para facilitar a compreensão do usuário;
- Gerar um arquivo final para utilização em sistemas de síntese de membranas pela técnica de SPOT;

- f) Realizar a análise dos imunoenaios feitos com as membranas produzidas de forma automatizada e gerar resultados visuais.

Para o desenvolvimento da etapa (a), foi necessário um *script* que possibilitasse a utilização de um arquivo com as sequências e outros dois com os tamanhos de peptídeos e coberturas de fragmentação escolhidos pelo usuário. A partir destes três arquivos, o *script* gera novos arquivos com as fragmentações identificadas. Após a fragmentação, um segundo *script*, responsável pela etapa (b), avalia a pré-existência de cada novo peptídeo criado em relação aos anteriores. Se o novo peptídeo for único, ele é adicionado ao arquivo final de peptídeos, caso contrário, o mesmo é rejeitado. Para realizar a demarcação de peptídeos apresentado na etapa (c) uma marcação com o nome da sequência de origem é realizada em cada peptídeo adicionado ao arquivo final. Caso o peptídeo seja rejeitado, esta marcação vai ser então acoplada ao peptídeo inicial, acumulando marcações quantas vezes forem necessárias.

Objetivando a criação de resultados visuais para o usuário da etapa (d), *scripts* com implementação da biblioteca Matplotlib foram utilizados para criar resultados gráficos dos dados gerados nas fragmentações. Em contrapartida, para a apresentação dos dados em forma de alinhamentos, a conexão do *script* com programas de alinhamento e análise de código aberto foram realizadas de acordo com o manual de cada sistema.

Ao final de todas as análises, o *script* responsável pela etapa (e) realizará a criação de arquivos com todas as fragmentações feitas pelo usuário compatíveis com os principais sistemas de síntese de peptídeos em membrana de celulose pela técnica de SPOT.

Após a síntese e utilização dessas membranas em imunoenaios, é possível realizar a análise dos resultados de forma automatizada. Para isto, um *script* que conecta um sistema de análises de pixels com um macro, que é um programa que automatiza uma série de comandos, permite que o PepLess analise todo os SPOTs e gere resultados visuais, como tabelas, membranas virtuais e alinhamentos específicos de SPOTs que o usuário considerar positivos.

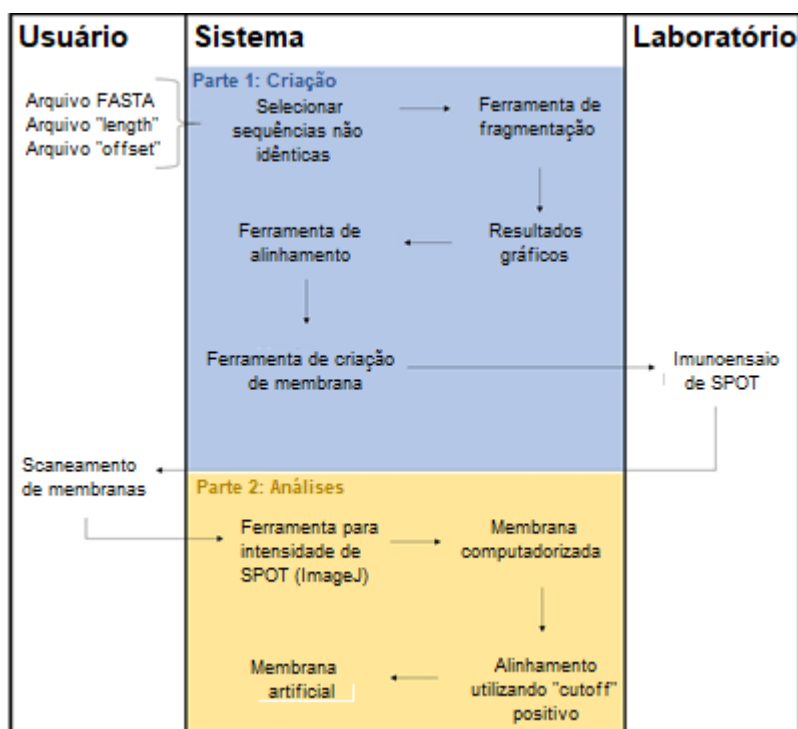


Figura 21: Fluxo de trabalho da ferramenta PepLess. O usuário deve informar à ferramenta: o arquivo FASTA e arquivos de length e offset. A partir destes dados, a ferramenta seleciona sequências não idênticas, as fragmenta, gera resultados gráficos, alinhamentos e membranas. Após a síntese da membrana e utilização em imunoensaios, o usuário deve informar o arquivo da membrana escaneada à ferramenta, que irá avaliar a intensidade de cada SPOT, produzir uma membrana computadorizada com os resultados, gerar alinhamentos com os valores positivos selecionados e produzir uma segunda membrana computadorizada apenas com os resultados positivos.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.4.1. PEPLESS: DESENVOLVIMENTO DA FERRAMENTA

O *script* de PepLess necessita receber três dados principais do usuário: (i) Um arquivo no formato FASTA com todas as sequências escolhidas; (ii) um arquivo de texto com o tamanho dos peptídeos, denominado comprimento, ou “length”; e (iii) um segundo arquivo de texto com a quantidade de aminoácidos sobrepostos, denominado deslocamento, ou “offset”.

O primeiro passo após a inserção desses três dados é a seleção e geração de um novo arquivo apenas com as sequências não idênticas e, a seguir, o *script* realiza todas as fragmentações neste novo arquivo, de acordo com as especificações de comprimentos e deslocamentos (**Figura 22**). A partir daí, o sistema informa ao usuário a quantidade de peptídeos gerados com e sem os fragmentos redundantes. Ao final, a opção de geração de gráficos será disponibilizada: O primeiro gráfico apresenta todos os comprimentos e deslocamentos escolhidos, com e sem peptídeos redundantes; e o segundo, com a porcentagem de redução entre com e sem peptídeos redundantes (**Figura 23**).

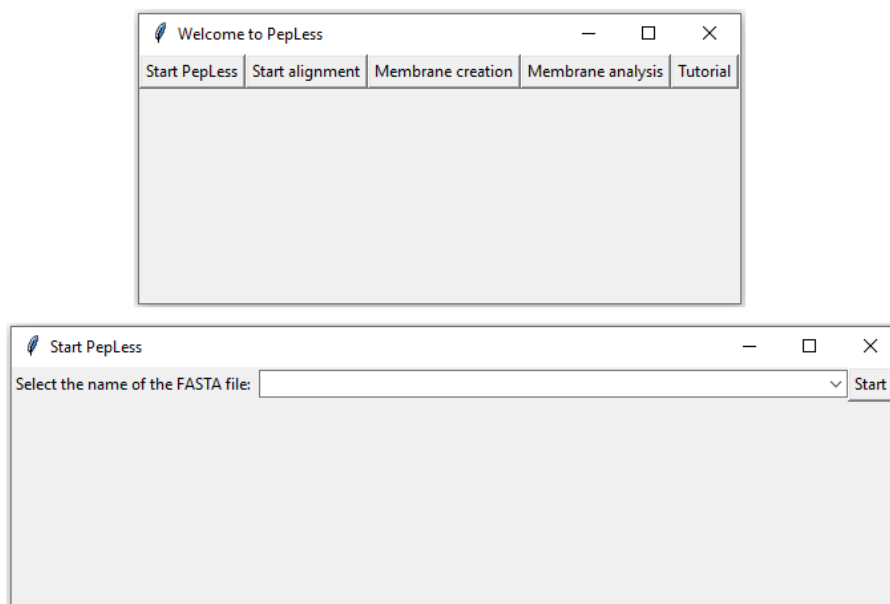


Figura 22: Telas iniciais da ferramenta PepLess. Apresentação da tela inicial da ferramenta e da tela de solicitação de arquivo em formato FASTA para início das análises.

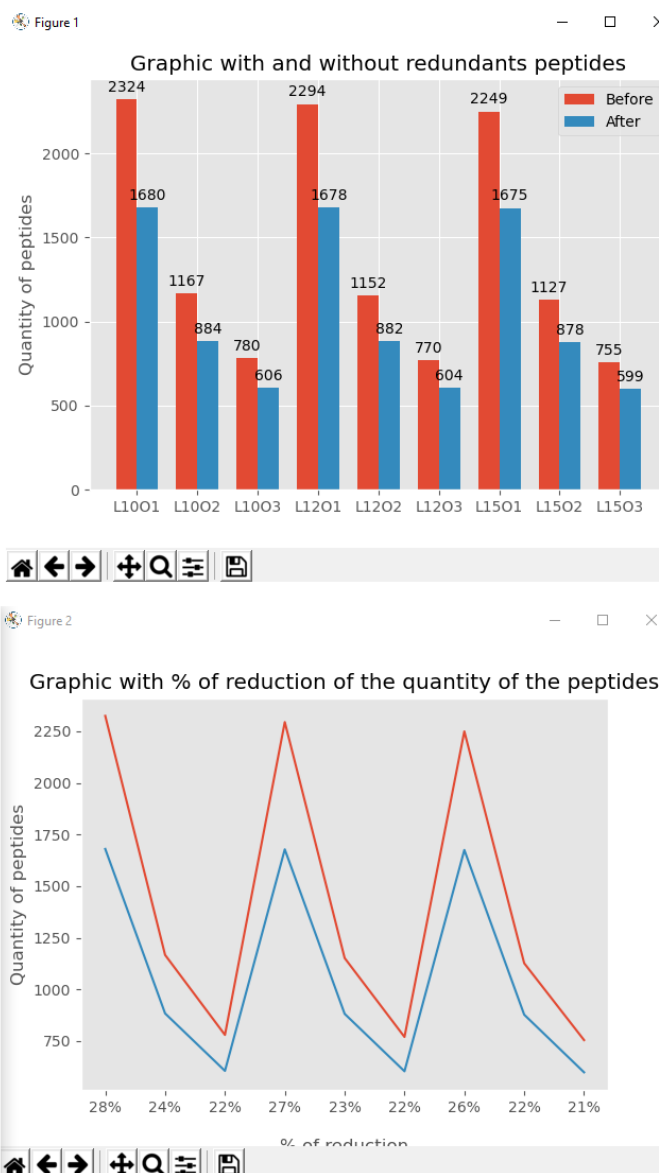


Figura 23: Telas de resultados gráficos. Telas com resultados gráficos de criação de peptídeos com e sem redundância, sendo o primeiro gráfico apresentando a quantidade de peptídeos e o segundo, as porcentagens de reduções.

Após a geração gráfica dos resultados, uma opção para realizar alinhamentos é oferecida na ferramenta, onde o usuário pode observar e manipular o alinhamento de todos os peptídeos gerados com as sequências iniciais ou apenas entre os peptídeos. Nessa etapa, é possível mapear os sítios de interação e produzir menos membranas com a mesma cobertura de peptídeos de antes (**Figura 24**).

A seguir, o sistema irá fornecer diferentes maneiras que esses peptídeos podem ser sintetizados em membranas de celulose. O usuário deve escolher o arquivo correspondente ao melhor resultado no alinhamento, observar em uma interface gráfica

(Graphical blueprint) como será o “mapa” da membrana de SPOT e a transferir os dados para o sistema sintetizador de peptídeos, que produzirá a membrana de interesse (**Figura 25**). Após esta etapa, o usuário poderá utilizar a membrana em imunoenaios e submeter o resultado de volta ao PepLess, que realizará a análise das membranas automaticamente. Além disso, todos os resultados gerados serão disponibilizados em formatos de texto e imagem em uma pasta gerada pela ferramenta.

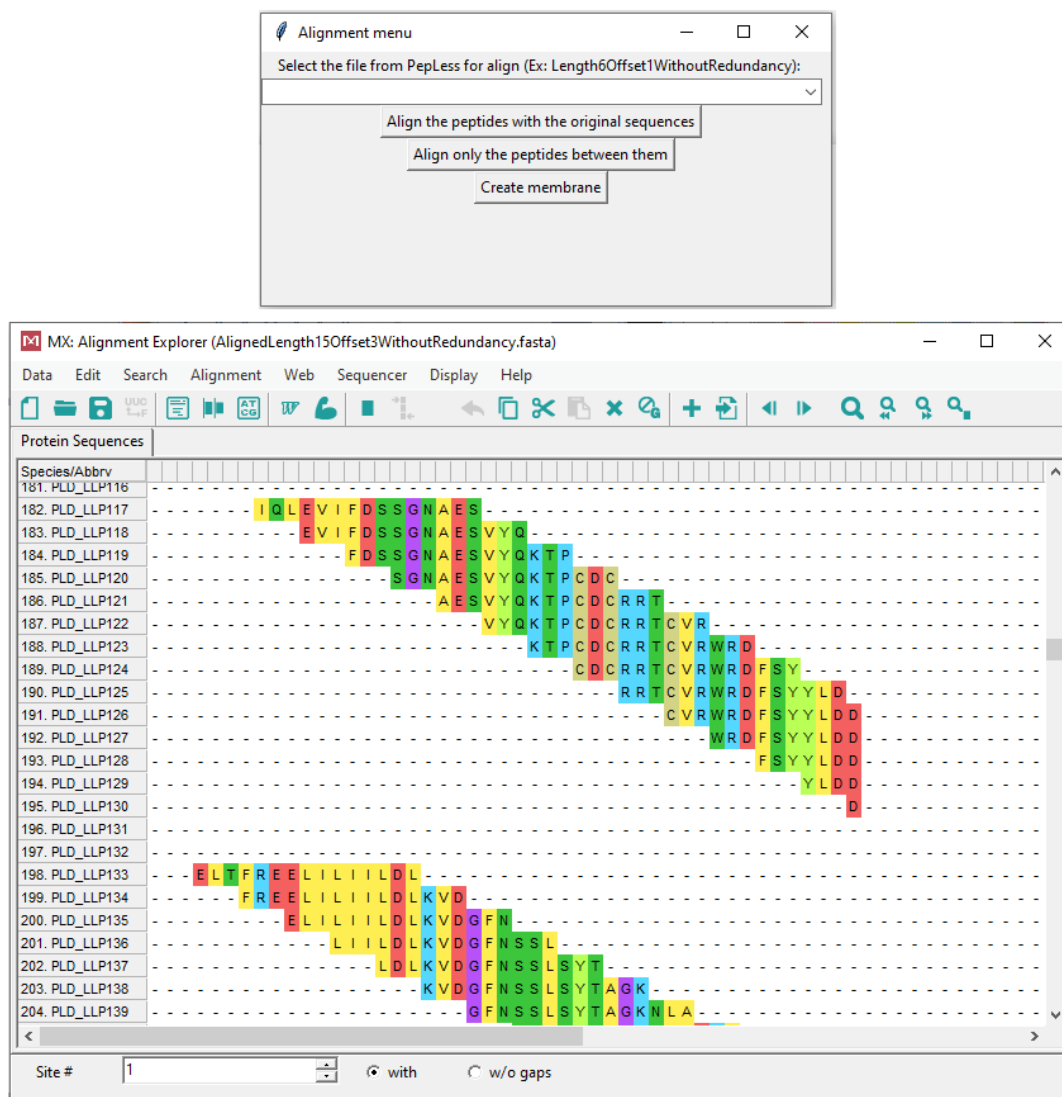


Figura 24: Tela para criação de alinhamentos e tela com alinhamentos em MAFFT (software para Alinhamento múltiplo de seqüências). Apresentação de tela em que deve ser informado o arquivo desejado para que seja realizado o alinhamento dos peptídeos criados. Os alinhamentos podem ser feitos tanto entre peptídeos e suas seqüências originais, quanto apenas entre os peptídeos criados.

Graphical blueprint of synthesis

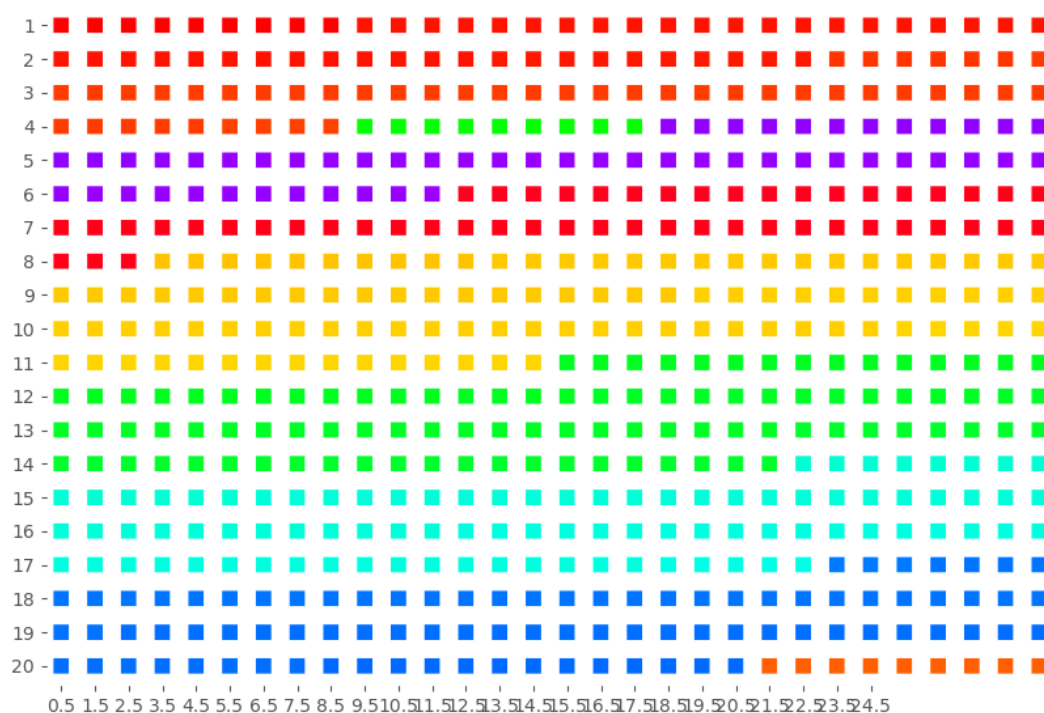


Figura 25: Graphical blueprint of synthesis. Apresentação de tela da membrana computadorizada que demonstra o tamanho e localização de peptídeos na membrana a ser produzida.

É importante que o usuário desenhe uma linha de 2 milímetros, próximo ao primeiro e ao último ponto da membrana após a realização dos imunoenaios. Esta etapa irá garantir que a análise das membranas ocorra sem problemas, uma vez que o sistema precisa identificar essas duas marcas para selecionar a área correta dos pontos na membrana.

Após o uso no imunoenasão, cada membrana precisa ser escaneada e as imagens salvas no computador. O usuário selecionará cada imagem e, por meio de uma macro no processador de imagem denominado ImageJ (a empresa Sys2Diag possui autorização de utilização do processador de imagem para fins de desenvolvimento de ferramentas), identificará as marcas que indicam o início e o fim de cada membrana para análise de pixel da área selecionada. Linhas horizontais serão criadas na área de todos os pontos, que indicarão a localização de cada ponto. Após essa análise, o sistema fornecerá a média dos pixels para calcular um valor único de intensidade de pixel para cada ponto (**Figura 26**).

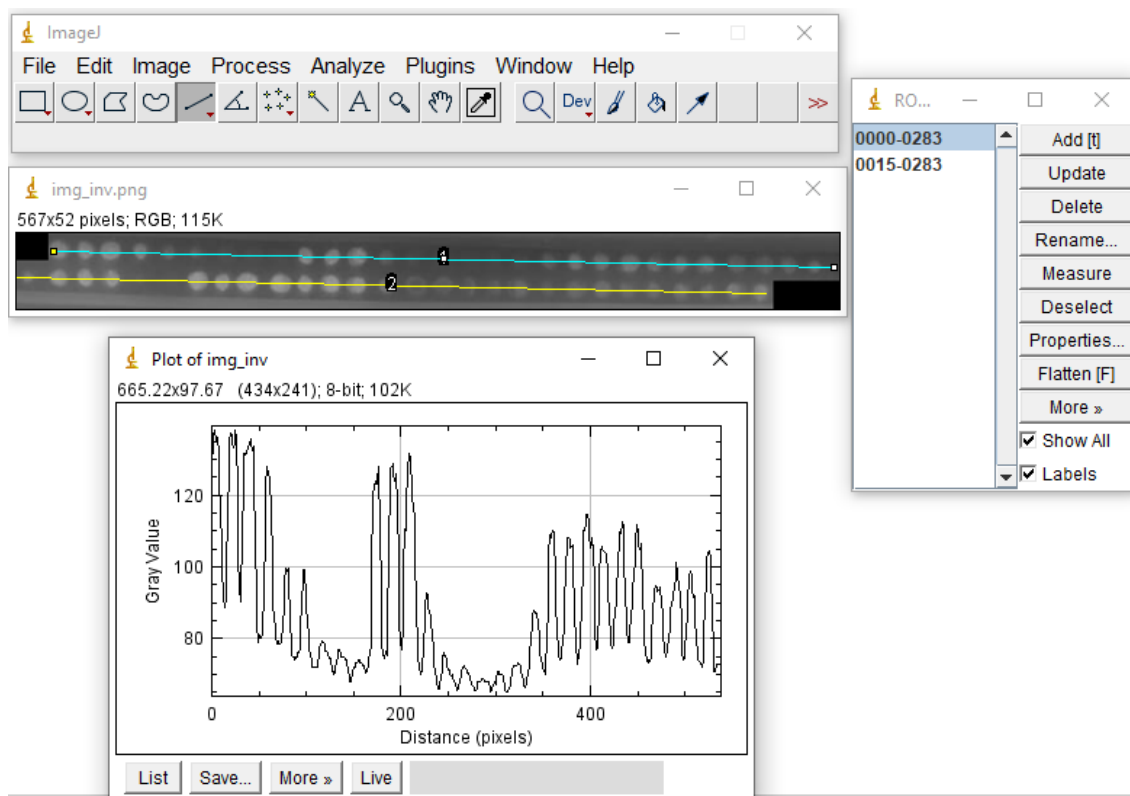


Figura 26: Tela da análise por ImageJ. Apresentação de tela no sistema ImageJ onde a análise é automatizada a partir de macros e os resultados de médias de pixels são plotados em gráficos.

Com esses dados, o sistema irá gerar: (i) Um resultado gráfico correspondente ao valor da intensidade de cada ponto; (ii) um arquivo excel com a sequência de peptídeo correspondente a cada valor de intensidade de todos os SPOTs; e (iii) uma membrana computadorizada com os dados correspondentes da imagem utilizada (**Figura 27**).



Figura 27: Tela da análise por ImageJ e membrana gráfica espelhada. Apresentação de tela no sistema ImageJ, com uma segunda tela onde uma membrana gráfica espelhada da imagem escaneada da membrana é produzida a partir dos valores de pixels identificados em cada SPOT.

Após a realização do procedimento em todas as membranas, o banco de dados da ferramenta PepLess fornecerá os valores de intensidade de todos os pontos e, conseqüentemente, de cada peptídeo. Com essa coleta de dados, a próxima etapa é realizar um novo alinhamento dos peptídeos usando uma pontuação de corte selecionada dos resultados anteriores: Padrão (que exclui apenas os valores de fundo, ou “background”), 25%, 50%, 75% ou um valor informado pelo usuário. Apenas os pontos considerados positivos pela análise do usuário serão apresentados no alinhamento (**Figura 28**).

O novo alinhamento irá gerar uma membrana artificial apenas com os peptídeos que apresentarem o valor de corte escolhido e, dessa forma, o usuário terá todos os dados relevantes deste trabalho em um único local, com possibilidade de modificação do valor de corte de acordo com sua preferência.

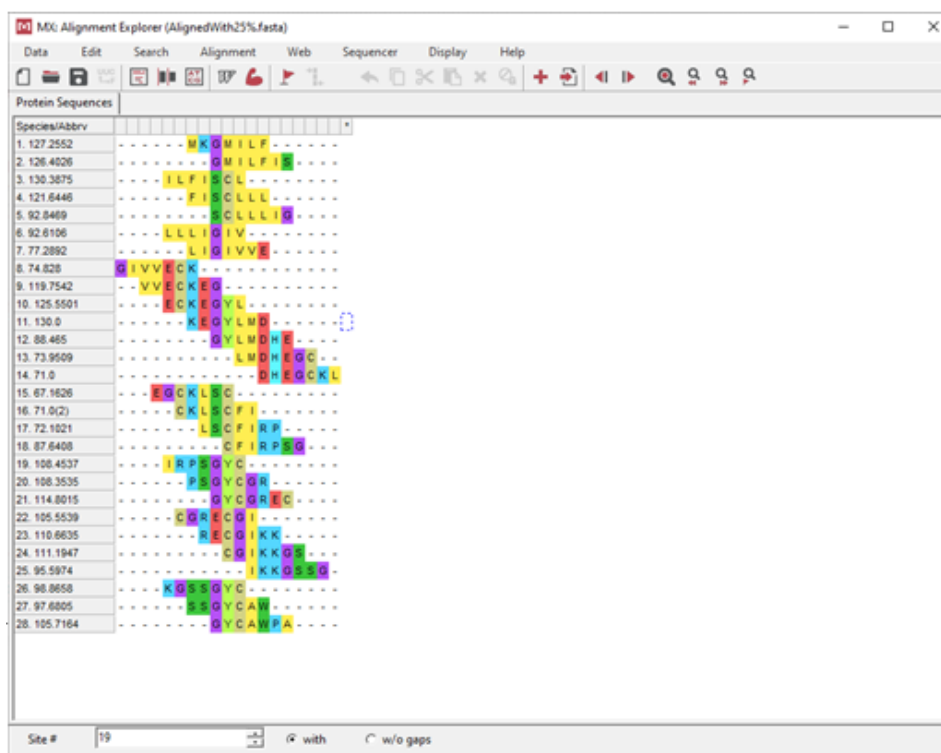


Figura 28: Tela de alinhamento de SPOTs positivos em MAFFT. Apresentação de alinhamento utilizando apenas peptídeos considerados positivos pelo usuário após a análise de resultados de pixels de SPOTs.

A técnica de SPOT é de grande utilidade para diversos tipos de estudos biológicos e produtos biotecnológicos, mas necessita de adaptações e melhorias. Por esta razão, esta técnica tem sido foco de discussão em grupos de pesquisa especializados, ao observar a dificuldade na realização de análises em larga escala. Além disso, poucos projetos visam

otimizar os pontos mais críticos desta técnica. Logo, o desenvolvimento da ferramenta PepLess tem sua aplicação necessária tanto na produção de membranas quanto nas análises de seus resultados, permitindo economizar tempo e reagentes de síntese, de fácil manipulação e integração de resultados.

A partir dos resultados apresentados no desenvolvimento da ferramenta, observa-se que a mesma está em funcionamento completo, desde a preparação das sequências para produção das membranas, até a análise final dos resultados dos imunoenaios de SPOT. Apesar disso, a ferramenta ainda requer melhorias de reestilização da interface para que fique ainda mais intuitivo e de fácil utilização, uma vez que a potencialização da usabilidade e interação humano-computador deve ser a melhor possível. Além disso, é importante que a ferramenta esteja disponibilizada de forma online, e por isso, o desenvolvimento web da mesma está em fase de criação. Quando se trata do desenvolvimento de um sistema com aplicações biológicas, o transporte das ideias para o sistema deve ser feito da forma mais assistencial concebível, garantindo uma contribuição mais efetiva e extensa para a comunidade científica (MENDONZA *et al.*, 2018; KALUZ, 2015; SANDEFER *et al.*, 2013).

As funcionalidades disponíveis no sistema PepLess visam o apoio à tomada de decisão, permitindo que a cada passo o pesquisador utilize o raciocínio e análise crítica dos seus resultados para as suas posteriores escolhas. Desta forma, a estruturação do sistema permite que o usuário possa sempre modificar suas decisões, avaliar os dados em diversas especificações e escolher quais deles mais lhe interessam.

CAPÍTULO III

ESTUDO DE CASO PEPLISS I – TRANSCRITOS DE LOXOSCELES LAETA

3.1. INTRODUÇÃO

3.1.1. PREDIÇÃO DE EPITOPOS EM TOXINAS DE VENENOS E SUAS APLICAÇÕES

Devido aos problemas causados pela produção e administração do soro contra o veneno da aranha *Loxosceles*, é importante a busca por novas técnicas para melhoria ou substituição da imunização comumente utilizada. Em 2003, Araujo e colaboradores (2003) imunizaram animais usando fosfolipase-D recombinante e observaram que esta proteína gerou anticorpos capazes de neutralizar a atividade dermonecrótica do veneno em coelhos. Já em 2008, De Almeida e colaboradores realizaram imunizações em cavalos com três fosfolipases-D recombinantes, que também garantiu neutralização (DE ALMEIDA *et al.*, 2008) desta mesma atividade. Apesar disso, nestes dois trabalhos as proteínas produzidas apresentaram efeitos tóxicos nos animais.

Nosso grupo vem trabalhando ao longo dos anos no estudo da utilização de epitopos sintéticos como imunógeno. Felicori e colaboradores em 2009 identificaram que a proteína dermonecrótica recombinante (rLiD1) do veneno de *L. intermedia* é capaz de induzir a produção de anticorpos que neutralizam eficientemente os efeitos tóxicos do Loxoscelismo (FELICORI *et al.*, 2009). Lima e colaboradores em 2018 predisseram e caracterizaram uma proteína multiepitópica quimérica (rMEPLox), a partir do trabalho de rLiD1 e de outros que se seguiram, contendo epitopos das principais proteínas de aranhas do gênero *Loxosceles*. Esta proteína conferiu proteção contra os efeitos dermonecróticos do envenenamento a um coelho imunizado (LIMA *et al.*, 2018).

Nestes e em outros trabalhos que estudam a substituição de venenos por epitopos sintéticos, a predição de epitopos pela técnica de SPOT é amplamente utilizada como forma de identificar peptídeos reativos para aprimorar suas proteínas recombinantes. Além disso, diversas ferramentas bioinformáticas são usadas para predição destes epitopos, usualmente utilizando redes neurais artificiais para interligar as informações disponibilizadas com as encontradas em bancos de dados.

Os dados obtidos com as análises transcriptômicas descritas no Capítulo I podem ser aplicados para diversos fins, incluindo na busca por epitopos de toxinas do veneno de aranhas *Loxosceles*. A análise de peptídeos provenientes das sequências contidas no transcriptoma pela técnica de SPOT pode revelar sequências reconhecidas pelo soro e que podem ser utilizadas como imunizante para produção deste mesmo soro. Entretanto, o

número de peptídeos a serem sintetizados em membrana de celulose precisa ser otimizado, a fim de se poupar tempo, reagentes e tornar a análise mais viável. Nesse contexto, o programa PepLess se torna uma ferramenta valiosa de *design* racional da membrana de SPOT.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. OBJETIVO GERAL

Implementar a ferramenta PepLess e todas as suas funcionalidades em formato de estudo de caso dos principais transcritos de toxinas identificadas no transcriptoma da aranha peruana *Loxosceles laeta*.

3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar as sequências de transcritos das principais toxinas identificadas no Capítulo I deste trabalho na ferramenta PepLess;
- Gerar todos os dados relativos as análises realizadas pela ferramenta;
- Selecionar um tamanho e cobertura de fragmentação de peptídeos adequados para análise por SPOT;
- Sintetizar uma membrana pela técnica de SPOT a partir do arquivo gerado pela ferramenta;
- Realizar imunoenaios com a membrana produzida;
- Analisar os resultados dos imunoenaios utilizando a ferramenta, visando mapear os principais epítopos lineares reconhecidos pelos soros de interesse.

3.3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1. IMPLEMENTAÇÃO DE PEPESS COM TRANSCRITOS DE *LOXOSCELES LAETA* PERUANA

Um arquivo em formato FASTA contendo os principais transcritos de cada grupo de toxinas de *Loxosceles laeta* peruana foi criado a partir das análises das sequências realizadas no Capítulo I, e incorporado à ferramenta PepLess.

Dezesseis sequências foram incorporadas, sendo quatro metalloproteases, cinco fosfolipases-D, uma serinoprotease, uma hialuronidase, quatro toxinas inseticidas e uma TCTP. Os seguintes tamanhos foram então informados à ferramenta para que a fragmentação se iniciasse: Lengths 10, 12 e 15; Offsets 1, 2, 3 e 5.

Escolheu-se a melhor cobertura a partir dos gráficos de redução e quantidade de peptídeos produzidos e gerou-se um arquivo específico a ser incorporado à ferramenta de síntese de membranas ResPep SL.

3.3.2. SÍNTESE E MAPEAMENTO DE EPITOPOS PELO MÉTODO DE SPOT E ANÁLISE POR PEPESS

A síntese da membrana de celulose foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila no laboratório da Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol localizado na Universidade Federal do Paraná (UFPR), através do aparelho de síntese automática ResPep SL (IntavisAG, Bioanalytical Instruments, Alemanha). Quinze pentadecapeptídeos sobrepostos por três resíduos cobrindo as principais toxinas da glândula de veneno de *L. laeta* peruana identificadas pela análise transcriptômica foram sintetizadas seguindo o protocolo descrito por Laune e colaboradores em 2002, depositando um volume de 0,6 µl de cada aminoácido, permitindo a obtenção de aproximadamente 50 nanomoles de peptídeo por ponto de membrana.

A membrana de celulose é transformada para disponibilizar grupamentos amino para o acoplamento de aminoácidos. Isso se dá pela esterificação de uma Fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc)-βAla-OH às funções hidroxila disponíveis na celulose, que permite que o suporte se torne funcional e afaste o peptídeo do mesmo, garantindo maior mobilidade e manutenção da conformação desde peptídeos.

Para avaliar a reatividade de anticorpos frente a essa membrana, foi utilizado o soro anti-metaloprotease de *L. intermedia* (LALP-1) cedido pelo Prof. Silvio Sanchez Veiga (UFPR). A membrana foi lavada com solução fosfato salina (PBS pH 7,4) e bloqueada com TBS 3% e Tween 0,1% overnight. Após uma nova lavagem, a membrana foi incubada com o soro por 120 minutos (diluição 1:100) e novamente lavada com TBS 3% e Tween 0,1%. A ligação dos anticorpos foi detectada utilizando anticorpos secundários anti-IgG de coelho ligados à fosfatase alcalina (diluição 1:2.000/SIGMA). Após 30 minutos da adição do substrato BCIP-MTT em 0,4% MgCl₂ em tampão citrato salina (CBS pH 7,0), observa-se as regiões reativas da membrana através da formação de precipitados azulados sobre os *spots* que contém peptídeos reconhecidos pelos anticorpos do soro testado. A membrana foi então escaneada para ser posteriormente analisada utilizando a ferramenta PepLess.

Este primeiro ensaio foi também utilizado para comparação com uma membrana previamente produzida em meu mestrado, que possuía peptídeos provenientes das três principais metaloproteases encontradas a partir dos mesmos dados transcriptômicos. Nesta membrana, os dados não foram tratados pela ferramenta PepLess e, por isso, ocuparam um número maior de *spots*. A sequência peptídica de uma das três metaloproteases, LALP-LP3, foi incorporada à nova membrana produzida neste capítulo, garantindo uma comparação de eficácia entre a utilização ou não da ferramenta PepLess.

Além disso, os seguintes soros com as seguintes diluições foram também utilizados para avaliar a reatividade de anticorpos: Soro comercial (produto final) do Instituto Nacional de Salud (INS) – Lima, Peru (diluição 1:1.000), soro comercial (produto final) do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) – Curitiba, Brasil (diluição 1:1.000), soro hiper imune de cavalos imunizados com veneno de *Loxosceles laeta* do Instituto Nacional de Salud (diluição 1:1.000) e soro hiper imune de cavalos imunizados com venenos de *Loxosceles spp.* do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (diluição 1:1.000).

Como controle destes experimentos, os mesmos ensaios foram realizados na membrana com soro de coelhos e cavalos antes de imunizações (soros pré-imune) (diluição para coelhos 1:100 e, para cavalos, 1:1000).

Para realizar as análises dos resultados dos imunoenaios de SPOT, a membrana foi fotografada após reatividade com o substrato mencionado anteriormente, e foi posteriormente regenerada, para ser reutilizada em outros ensaios. O processo de regeneração consiste na realização de lavagens de 10 minutos com reagente A

(mercaptoetanol), reagente B (etanol/água/ácido acético nas proporções 50:40:10 vol/vol/vol) e ao fim com metanol, para secagem da membrana.

As fotografias de cada imunoenensaio de SPOT utilizando a membrana de *L. laeta* peruana foram carregadas na ferramenta PepLess e os dois macros de ImageJ utilizados para leitura automática dos pixels de toda a membrana. A partir da média de cada circunferência, valores de cada SPOT foram disponibilizados para análise.

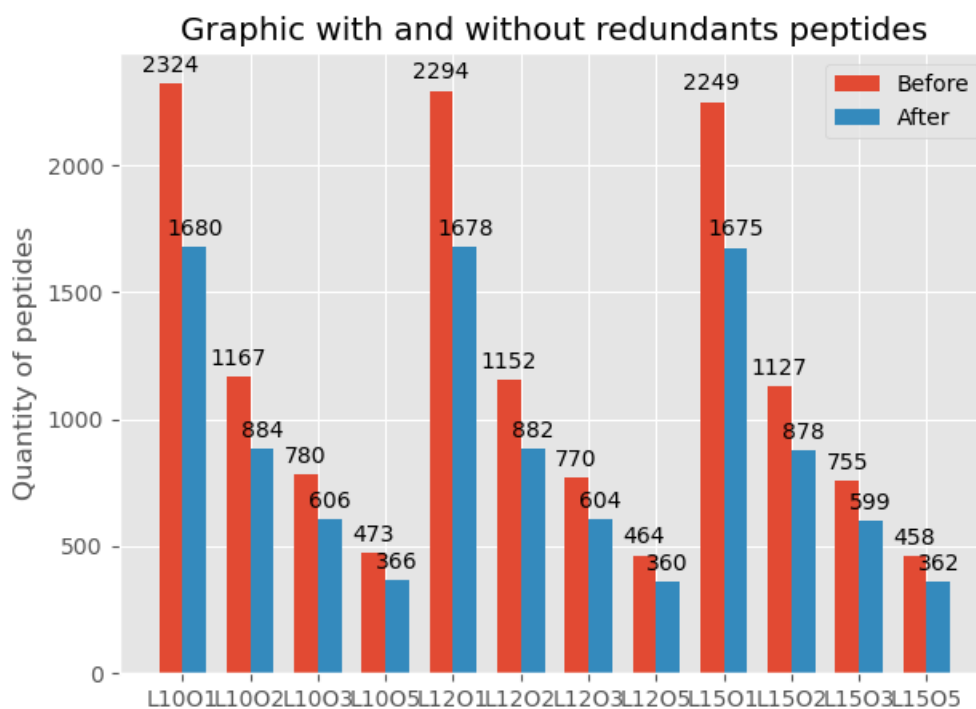
Considerou-se como resultado positivo os valores acima de 75% da média entre todos os valores, e os SPOTs positivos foram então alinhados entre si e entre a proteína multiepitópica quimérica rMEPLox predita e caracterizada por Lima e colaboradores em 2018, afim de buscar peptídeos potencialmente importantes para o desenvolvimento de metodologias alternativas no desenvolvimento de soros antiloxoscélicos (LIMA *et al.*, 2018).

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.4.1. IMPLEMENTAÇÃO DE PEPLESS COM TRANSCRITOS DE *LOXOSCELES LAETA* PERUANA

A partir dos tamanhos informados para as fragmentações, dois gráficos foram gerados, sendo o primeiro apresentando as quantidades de peptídeos com e sem redundância em todos os tamanhos desejados e o segundo apresentando a porcentagem de redução em quantidade de peptídeos necessários após a retirada de peptídeos redundantes (**Figura 29**).

(A)



(B)

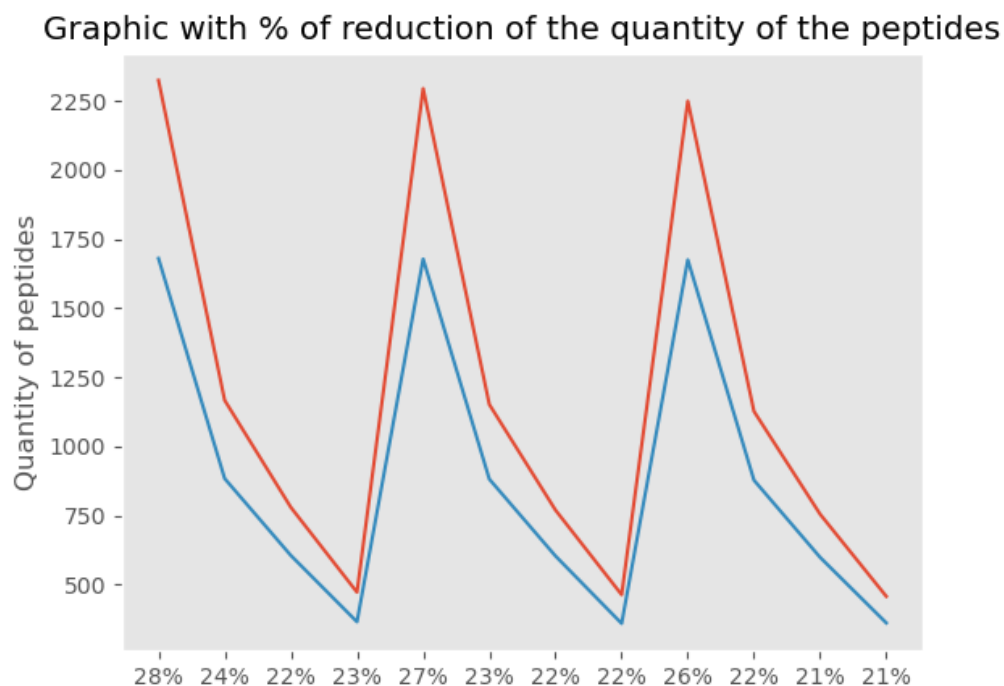


Figura 29: Resultado gráfico da utilização da ferramenta PepLess com um banco de dados das principais toxinas identificadas no transcriptoma de *L. laeta peruana*. (A) Quantidade de peptídeos produzidos; (B) Porcentagem de redução na quantidade de peptídeos produzidos: (Before) em vermelho representa a quantidade de peptídeos com a presença de peptídeos redundantes e (After) em azul representa a quantidade de peptídeos sem a presença de peptídeos redundantes.

A partir dos dados informados pela ferramenta PepLess, a cobertura de L15O3, com 599 peptídeos e 21% de redução de peptídeos em relação ao tamanho original foi escolhida para dar seguimento a síntese da membrana. A partir do tamanho escolhido, a ferramenta PepLess gerou um arquivo específico a ser incorporado a ferramenta de síntese de membranas ResPep SL.

3.4.2. SÍNTESE E MAPEAMENTO DE EPITOPOS PELO MÉTODO DE SPOT E ANÁLISE POR PEPLSS

A membrana sintetizada foi testada em imunoenaios utilizando soro de coelho não imune, soro de cavalo não imune, soro anti-metalloprotease de *L. Intermedia*, soro comercial (produto final) do Instituto Nacional de Salud (INS) – Lima, Peru, soro

comercial (produto final) do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) – Curitiba, Brasil, soro hiper imune de cavalos por *Loxosceles laeta* do Instituto Nacional de Salud e soro hiper imune de cavalos por *Loxosceles spp.* do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos.

A identificação de todas as toxinas e os peptídeos correspondentes a cada spot estão disponíveis no **Apêndice 1**.

Não observou-se reatividade dos soros não imunes de coelho e cavalo à membrana, conforme esperado, além de pouca ou nenhuma reatividade com os soros comerciais do INS e CPPI (**Figura 30**, **Figura 31** e **Figura 32**). Uma justificativa para este comportamento é que os soros industrializados contêm fenol em sua composição final, o que pode interferir no imunoensaio SPOT.

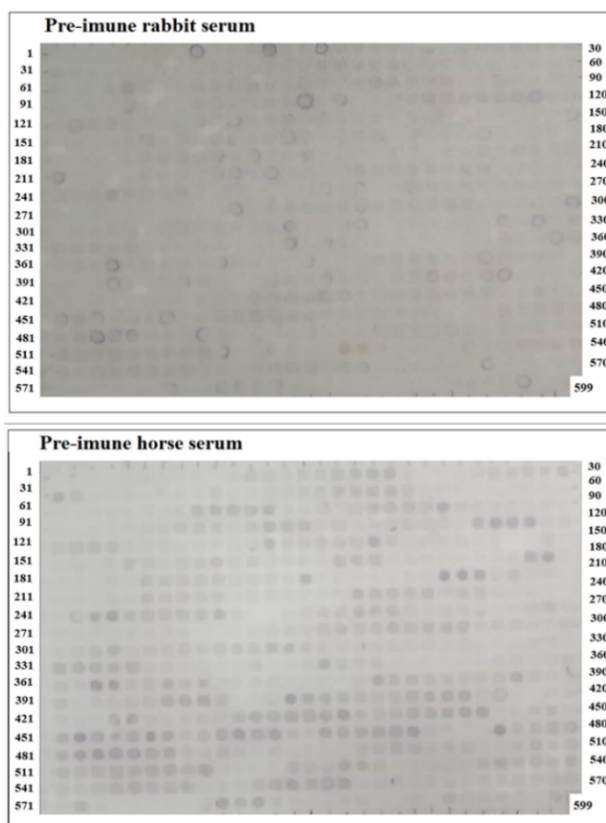


Figura 30: SPOTs com soros pré imunes em membrana de *L. laeta* peruana. Soros pré imunes de coelho e cavalos nas diluições 1:100 e 1:1.000 respectivamente. Utilizou-se anticorpo anti-IgG de coelho e de cavalo, respectivamente, conjugados à fosfatase alcalina (1:4000 e 1:3000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos SPOTs reativos.

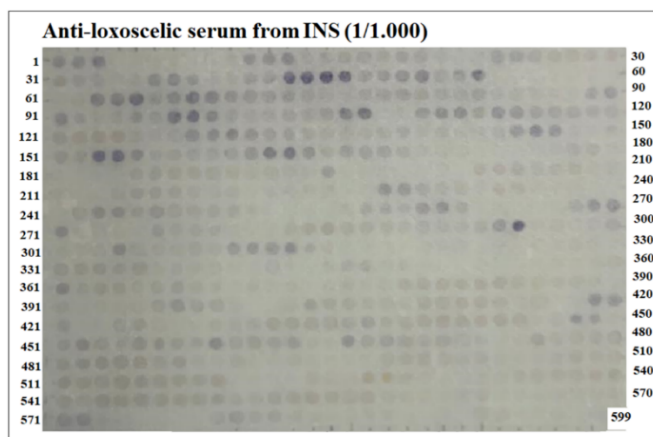


Figura 31: SPOT com soro comercial do INS produzido em cavalos na membrana de *L. laeta peruana*. Soro comercial do INS na diluição 1:1.000. Utilizou-se anticorpo anti-IgG de cavalo conjugado à fosfatase alcalina (1:3000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos SPOTs reativos.

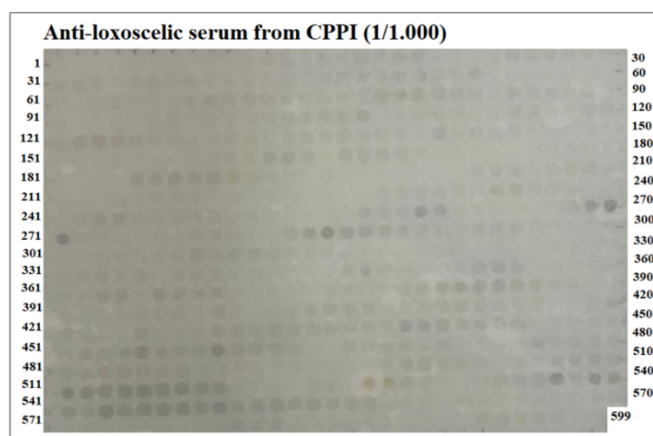


Figura 32: SPOT com soro comercial do CPPI produzido em cavalos na membrana de *L. laeta peruana*. Soro comercial do INS na diluição 1:1.000. Utilizou-se anticorpo anti-IgG de cavalo conjugado à fosfatase alcalina (1:3000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos SPOTs reativos.

Já nos outros três imunoenaios utilizando o soro anti-metalloprotease de *L. Intermedia*, o soro hiper imune do INS e o soro hiper imune do CPPI, foi possível observar alguns SPOTs reativos, indicando uma reatividade específica a ser avaliada (**Figura 33, Figura 34 e Figura 35**).

A partir das médias geradas pela ferramenta PepLess utilizando os macros de ImageJ, os SPOTs reativos com valores acima de 75% da média foram marcados em

vermelho e seus peptídeos, foram alinhados entre si e entre a proteína multiepitópica quimérica rMEPLox (**Figura 36**).

Todos os peptídeos considerados positivos nesta análise apresentaram semelhanças com rMEPLox no alinhamento, demonstrando algumas similaridades importantes entre peptídeos de *L. laeta* peruana, já que a partir de uma alta conservação entre espécies é possível facilitar e otimizar o tratamento de acidentes. Entretanto, também foram observadas diferenças relevantes entre toxinas fundamentais para o desenvolvimento do quadro de envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles*. Estes resultados reforçam a importância de estudos visando uma melhor compreensão das diferenças entre as aranhas *Loxosceles* na América do Sul, e planejamento de uma unificação de soros antiloxoscélicos para um tratamento mais abrangente dos diferentes casos de acidentes.

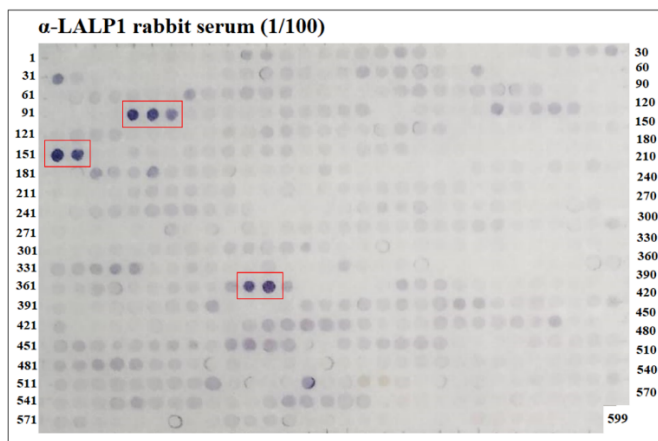


Figura 33: SPOT com soro anti-metalloprotease de *L. intermedia* produzido em coelhos na membrana de *L. laeta* peruana. Soro anti-metalloprotease LALP1 na diluição 1:100. Utilizou-se anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina (1:4000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos SPOTs reativos. SPOTs considerados positivos pela ferramenta PepLess foram marcados em vermelho.

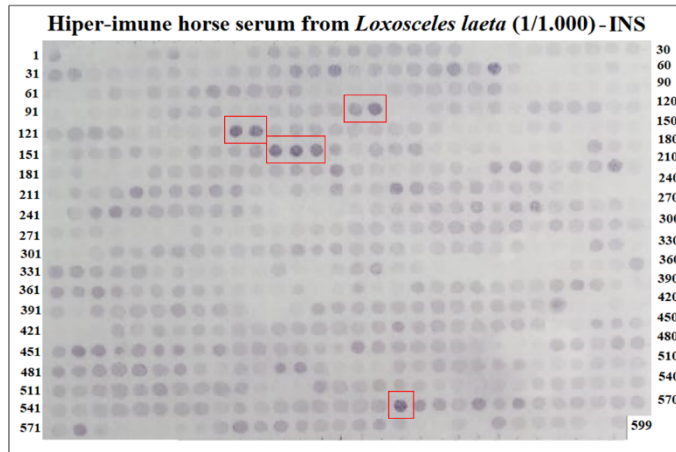


Figura 34: SPOT com soro hiper imune do INS produzido em cavalos na membrana de *L. laeta peruana*. Soro hiper imune do INS na diluição 1:1.000. Utilizou-se anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina (1:4000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos SPOTs reativos. SPOTs considerados positivos pela ferramenta PepLess foram marcados em vermelho.

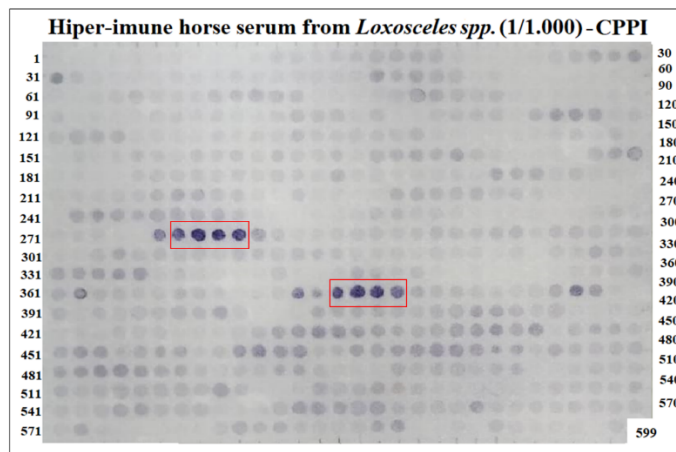


Figura 35: SPOT com soro hiper imune do CPPI produzido em cavalos na membrana de *L. laeta peruana*. Soro hiper imune do CPPI na diluição 1:1.000. Utilizou-se anticorpo anti-IgG de cavalo conjugado à fosfatase alcalina (1:3000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos SPOTs reativos. SPOTs considerados positivos pela ferramenta PepLess foram marcados em vermelho.

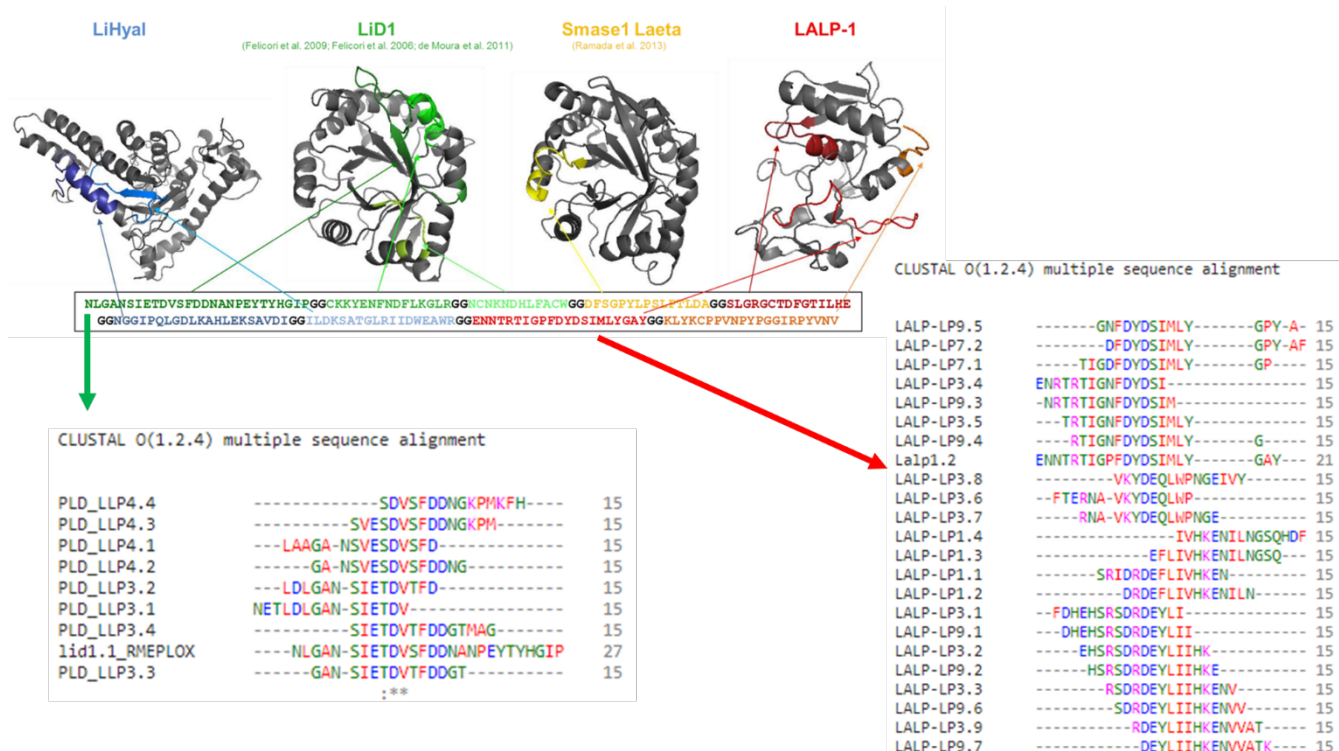


Figura 36: Alinhamento dos peptídeos reativos dos imunoenaios de SPOT com os peptídeos de metaloprotease e fosfolipase-D de rMEPLox. Em verde apresenta-se o alinhamento de epitopos de fosfolipases-D de *L. laeta* peruana com o epitopo de fosfolipase-D de *L. intermedia* em rMEPLox; em vermelho apresenta-se o alinhamento de epitopos de metaloproteases de *L. laeta* peruana com epitopo de metaloprotease de *L. intermedia* em rMEPLox.

Uma validação alternativa da ferramenta PepLess se deu pela comparação desses resultados de imunoenaios utilizando a membrana otimizada com uma membrana de *L. Laeta* previamente produzida. Na membrana anterior, os dados não foram tratados pela ferramenta PepLess, e por isso, foi necessário o uso de um número maior de SPOTs. A mesma sequência de metaloprotease (LALP-LP3) foi incorporada à membrana produzida neste capítulo, e ao utilizar o mesmo soro anti-metaloprotease de *L. intermedia* para realizar uma comparação de eficácia entre a utilização ou não da ferramenta PepLess, foi possível observar os mesmos principais peptídeos reativos (**Figura 37**).

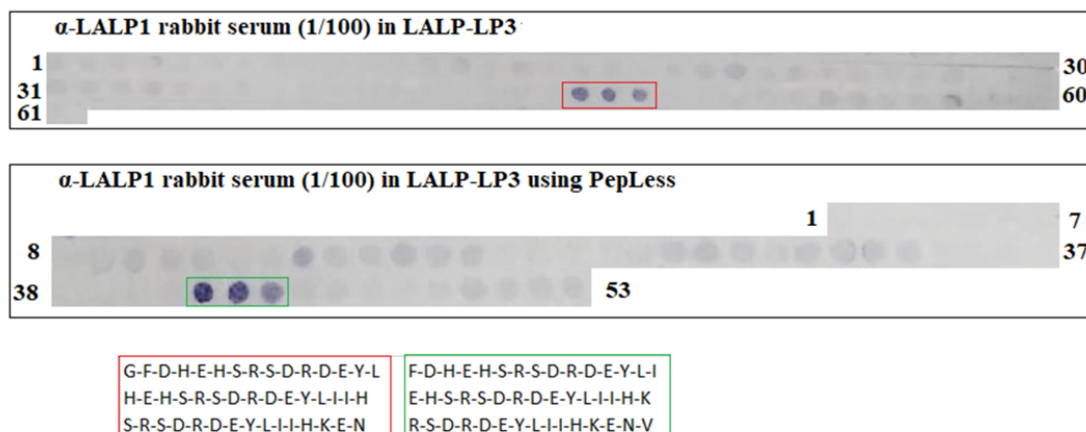


Figura 37: Recorte de membrana de metaloprotease de *L. laeta* peruana (LALP-LP3) sem e com a utilização da ferramenta PepLess. Apresentação dos SPOTS reativos após o imunoenensaio utilizando soro anti-metaloprotease de *L. intermedia* na diluição 1:1.000. Utilizou-se anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina (1:4000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos SPOTS reativos. SPOTS considerados positivos pela ferramenta PepLess foram marcados em vermelho (membrana não proveniente da ferramenta PepLess) e verde (membrana proveniente da ferramenta PepLess).

A partir dos resultados apresentados neste Capítulo, observou-se a funcionalidade completa da ferramenta PepLess frente a um estudo de caso real, e que a partir dos imunoenensaio realizados com a membrana sintetizada a partir dos peptídeos produzidos pela ferramenta, epitopos importantes no envenenamento pela aranha *Loxosceles* foram identificados e confirmados a partir da comparação com os epitopos utilizados na produção da rMEPLox.

CAPÍTULO IV

ESTUDO DE CASO PEPLISS II – TRANSCRITOS DA SERPENTE *MICRURUS* *SPP.*

4.1. INTRODUÇÃO

4.1.1. AS SERPENTES

As serpentes, pertencentes à superordem Lepidossauria, grupo Reptilia, ordem squamata, possuem morfologia para engolirem presas maiores que seu próprio corpo. As peçonhentas possuem presas anteriores com especializações de um sistema de inoculação ancestral que data de 170 milhões de anos, durante o período Jurássico (POUGH, *et al.*, 2008; FRY *et al.*, 2012). O veneno tem como função inicial incapacitar o sistema locomotor da sua presa, e as secreções orais auxiliam na digestão e lubrificação (WENSTEIN; SMITH & KARDONG, 2010).

Dentro da superfamília Columbroidea, as serpentes peçonhentas podem ser divididas em quatro famílias: Viperidae, Elapidae, Colubridae e Atractaspidae. As serpentes da família Viperidae possuem especializações maxilares que permitem que as presas inoculadoras de veneno se mantenham horizontalmente quando a boca está fechada. Elas são comumente localizadas na Europa, Ásia, África e Américas.

A família Colubridae é conhecida por não possuir presas inoculadoras para injetar veneno, mas, mesmo assim, muitas possuem glândulas que secretam veneno. A terceira família, Atractaspidae, possuem hábitos fossoriais, presas alongadas, e ocorrência principalmente na África e Ásia.

Por outro lado, as serpentes da família Elapidae possuem suas presas próximas à região do crânio, impossibilitando movimentação de maxilar. Elas são localizadas em todos os continentes, exceto na Antártida. Os representantes mais famosos desta família são as *Micrurus*, objeto de estudo deste capítulo, conhecidas como cobras corais na América do Sul e central (FRANCO *et al.*, 2009) (**Figura 38**).

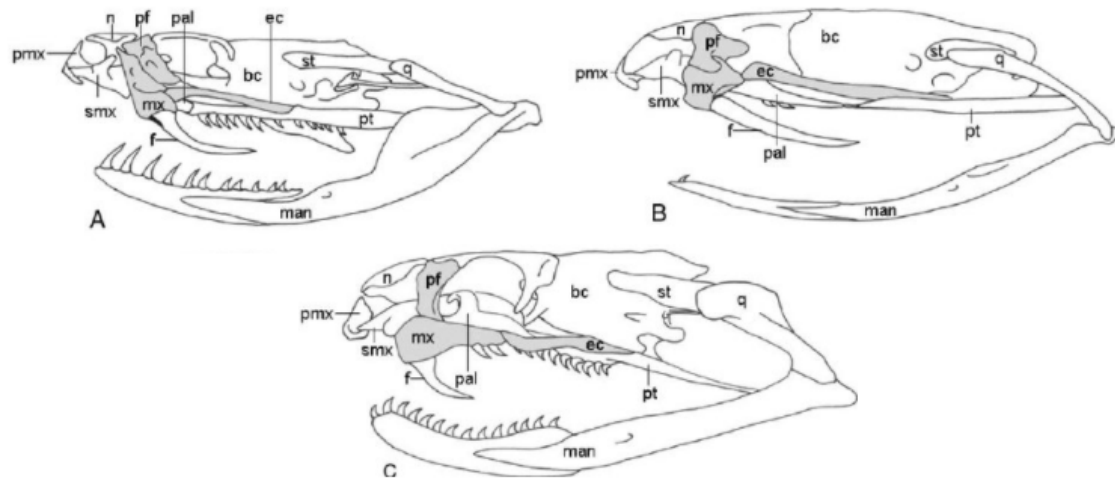


Figura 38: Vista lateral do crânio de (A) Viperidae, (B) Atractaspidae e (C) Elapidae. (Fonte: DEUFEL & CUNDALL, 2006)

4.1.2. SERPENTES DO GÊNERO *MICRURUS*

As serpentes do gênero *Micrurus* são divididas em mais de 120 espécies. Elas são amplamente encontradas nas Américas: desde a Argentina, até o sul dos Estados Unidos. Elas possuem este nome devido ao tamanho reduzido de sua cauda, sendo “micro” = pequeno e “urus” = cauda.

Na América do Sul, diversas espécies são encontradas. No Brasil, as principais são *M. lemniscatus*, *M. corallinus*, *M. frontallis* e *M. ibiboboca*. Entretanto, muitas outras espécies e subespécies são identificadas todos os anos no Brasil. Algumas destas espécies tem seus habitats bem elucidados por regiões no Brasil. Isto se dá pelo tipo de vegetação e clima em que elas se sentem mais confortáveis para habitar e reproduzir (**Figura 39**). Além do Brasil, é importante ressaltar a presença de outras espécies em países como Peru e Argentina, onde os acidentes com estas serpentes também são problemas de saúde pública (**Figura 40**).



Figura 39: Distribuição geográfica de subespécies de *M. lemniscatus* e *M. ibiboboca* no Brasil. Em amarelo, as serpentes *M. l. helleri*; em vermelho, as serpentes *M. l. lemniscatus*; em branco, as serpentes *M. l. carvalhoi*; e em verde, as serpentes *M. ibiboboca* (Fonte: CALVETE *et al.*, 2019)

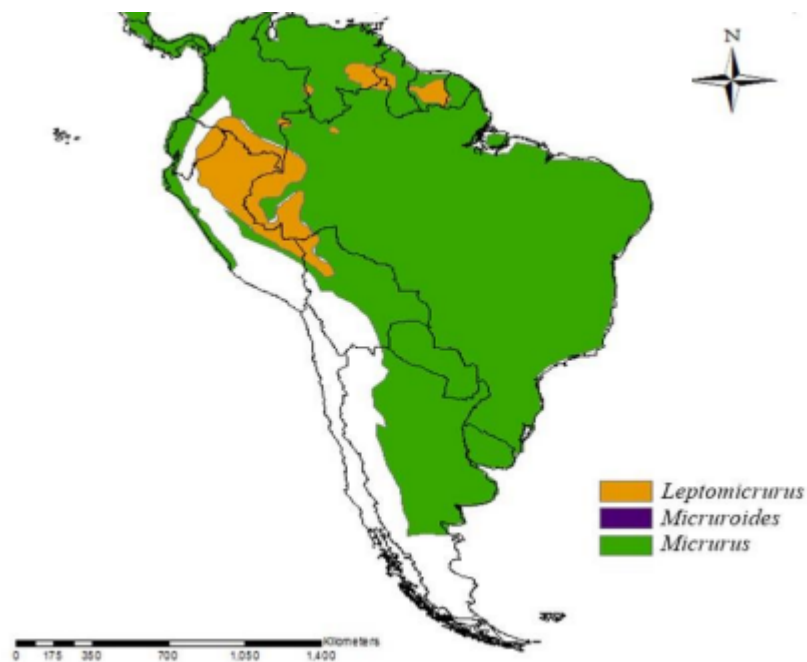


Figura 40: Distribuição geográfica do gênero elapídeos na América do Sul. Em amarelo, as serpentes do gênero *Leptomicrurus*; em roxo, as serpentes do gênero

Micruroides (não presentes na América do Sul); e em verde, as serpentes do gênero *Micrurus* (Fonte: Adaptado de CAMPBELL & LAMAR, 2004)

As serpentes deste gênero são conhecidas por sua coloração marcante, com anéis completos em todo o seu corpo. A partir desta coloração, elas se subdividem em dois grupos: O primeiro grupo possui coloração com arranjo consecutivo de anéis vermelhos, brancos, pretos, brancos e vermelhos (**Figura 41A**); já o segundo grupo, possui coloração com padrão triadal, em que a coloração dos anéis segue a regra: vermelhos, pretos, brancos, pretos, brancos, pretos e vermelhos (**Figura 41B**) (ROZE, 1983, 1996; SLOWINSKI, 1995; SILVA JR & SITES, 2001; CAMPBELL e LAMAR, 2004).

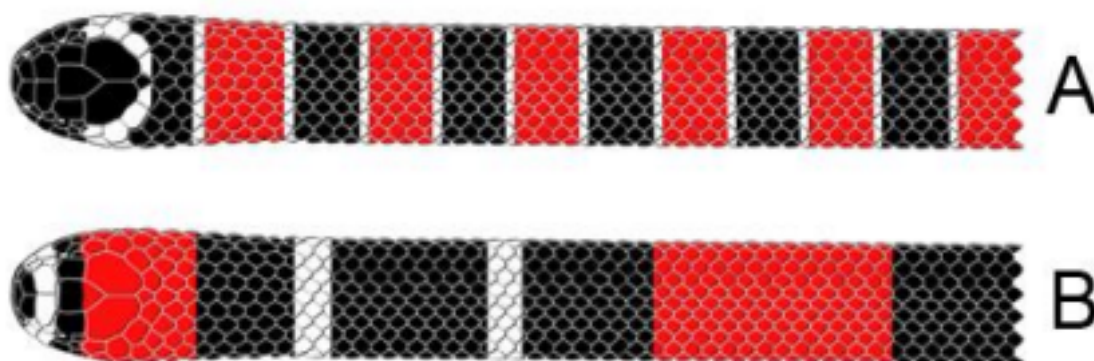


Figura 41: Padrão de coloração das serpentes *Micrurus*. (A) Coloração monadal e (B) Coloração triadal (Fonte: Adaptado de D. T. FEITOSA).

Elas se caracterizam por um tamanho pequeno, chegando no máximo a 1,60 metros. Sua cabeça é oval e não apresenta fossetas loreais. Além disso, os ossos craniais são fortes, permitindo que ela se especialize em escavações e tenham um habitat subterrâneo (MOREIRA *et al.*, 2010). Sua alimentação é, na maior parte, de serpentes menores, gimnofionas e anfisbenias, fazendo com que a criação em cativeiro seja laboriosa (MARQUES & SAZIMA, 1997).

Apesar dos acidentes não serem muito comuns, já que estas serpentes não são agressivas, elas se tornam de grande importância médica pelo fato de o veneno desencadear neurotoxicidade em acidentes envolvendo seres humanos. (CECCHINI *et al.*, 2005; MELGAREJO, 2009).

4.1.3. ACIDENTES ELAPÍDICOS, SEU DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

No Brasil, os acidentes com serpentes peçonhentas são principalmente ocasionados pelos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Micrurus* e *Lachesis*. De acordo com o SINAN, o Sistema de Informação de Agravos de Notificação, os acidentes com *Micrurus* são os em menores quantidades e sem notificação de óbitos. Além disso, a maior faixa etária acometida pelos acidentes está entre 40 e 59 anos do sexo masculino, justamente pela incidência de acidentes em zonas rurais pela atividade humana no campo (SINAN/SVS/MS3).

Após o acidente com uma serpente deste gênero, em aproximadamente 12 horas diversas manifestações podem ser observadas, como náuseas, vômitos, dores de cabeça, dores abdominais, ptose palpebral, oftalmoplegia, dispneia, insuficiência respiratória e danos neurológicos que podem culminar em paralisia (QUAN, 2012). Além disso, a atividade neurotóxica bloqueia a liberação de acetilcolina ocasionando uma síndrome miastênica aguda.

O tratamento leva em conta a espécie normalmente identificada na região onde ocorreu o acidente e a utilização do antiveneno, ou soro, deve ser rápida, pois existem dados que indicam a sua ineficiência caso os sinais neurológicos já tenham sido iniciados (QUAN, 2012). A dose recomendada é de 10 ampolas e todos os casos devem ser considerados potencialmente graves pelo risco de insuficiência respiratória. O soro anti-elapídico utilizado no tratamento de acidentes de *Micrurus*, é produzido no Brasil em quatro locais: Instituto Butantan, Instituto Vital Brasil, Fundação Ezequiel Dias e Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), e a produção ocorre no mesmo formato que a produção de antivenenos aracnídeos descrita no Capítulo II.

Por dificuldades no mantimento de serpentes deste gênero em cativeiro, difícil manipulação e pouca quantidade de veneno passível de ser extraído, a produção do soro anti-elapídico é considerada pelo Ministério da Saúde como de difícil fabricação, sendo necessário alternativas para a produção em massa.

4.1.4. COMPOSIÇÃO DO VENENO DAS SERPENTES DO GÊNERO *MICRURUS*

O veneno de serpentes do gênero *Micrurus* é conhecido por ser variado e ao mesmo tempo, muito conservado. A presença e proporção de famílias de toxinas presentes nos venenos de *Micrurus* dependem muito da espécie a ser discutida. Entretanto, as principais e mais importantes famílias estão na maioria das vezes, presentes em todas espécies (Figura 42).

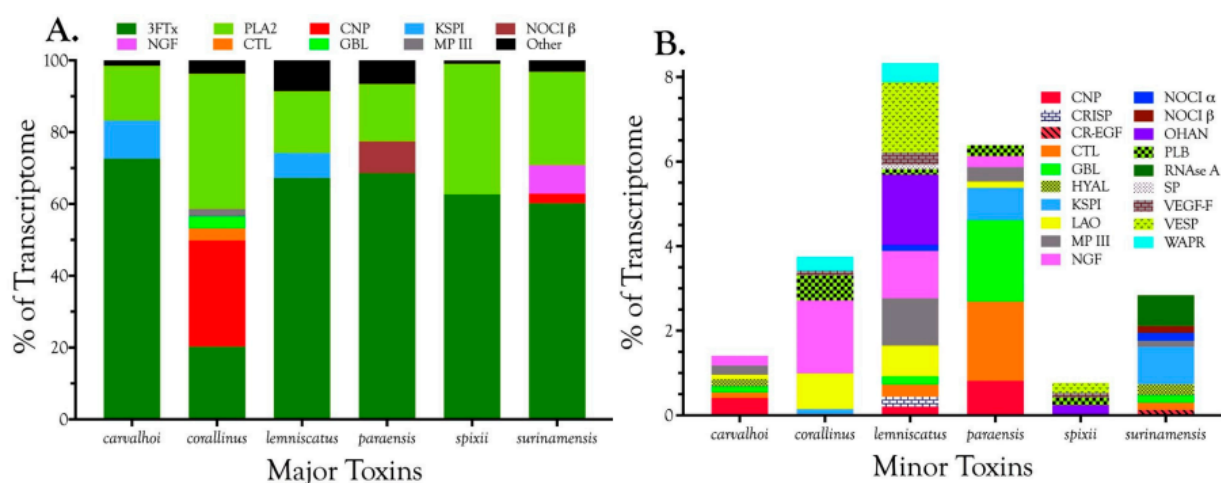


Figura 42: Proporção de presença de toxinas de acordo com cada espécie de *Micrurus* de importante incidência no Brasil. (A) Toxinas principais: Toxina de três dígitos (3FTX), Fosfolipase A2 (PLA2), Peptídeo natriurético do tipo C (CNP), Inibidor de serinoprotease Kunitz (KSPI), Toxina noceptiva (NOCI), Fator de crescimento do nervo (NGF), Proteína semelhante a Lectina do tipo C (CTL), Lectina de ligação à galactose (GBL), Metalloprotease do tipo III (MP III) e outras; e (B) Toxinas secundárias: CNP, Proteína secretora rica em cisteína (CRISP), Proteínas secretoras ricas em cisteína com domínios EGF (CR-EGF), CTL, GBL, Hialuronidase (HYAL), KSPI, L-aminoácido oxidase (LAO), MP III, NGF, NOCI, Vespryns (OHAN e VESP), Fosfolipase-B (PLB), Ribonuclease (RNase A), Serinoprotease (SP), Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e Waprans (WAPR) (Fonte: AIRD *et al.*, 2017).

Considerada como principal família de toxina no veneno de *Micrurus*, a Toxina de três dígitos, ou three-finger toxin, (3FTX), estão geralmente associadas ao bloqueio pós-sináptico com diversos efeitos na farmacologia (LEÃO *et al.*, 2009). Elas possuem este nome justamente por seu enovelamento que apresenta três alças que se assemelham a três

dedos (**Figura 43**). Elas se ligam aos receptores de acetilcolina e bloqueiam a transmissão nervosa do músculo esquelético. A partir deste momento a presa é paralisada com a finalidade de facilitar a alimentação da serpente.

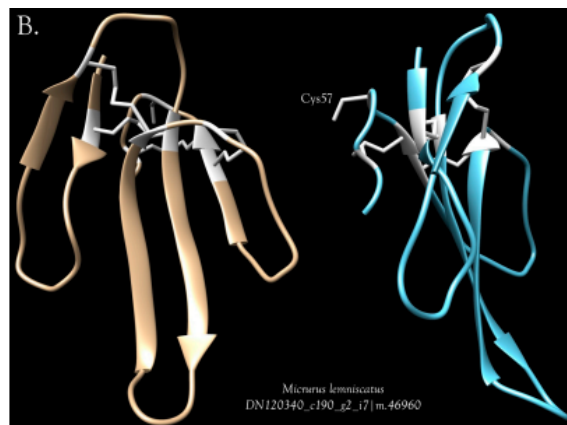


Figura 43: Modelo tridimensional da proteína 3FTX de *M. lemniscatus*. (Fonte: Adaptado de AIRD *et al.*, 2017)

A segunda família de toxina mais estudada dentre as presentes nos venenos de *Micrurus* são as fosfolipases- A_2 (PLA $_2$): enzimas com funções miotóxicas, edematológicas, neurotóxicas, cardiotoxicas e de agregação plaquetária (PERUMAL SAMY *et al.*, 2008). Com essas atividades é possível compreender que a função principal desta toxina no veneno é o bloqueio da transmissão neuromuscular, causando paralisia respiratória e seguidamente, óbitos (DE CARVALHO *et al.*, 2014). Além disso, elas também estão presentes no auxílio da digestão da presa através de efeitos farmacológicos que influenciam na fisiologia da presa (DOLEY *et al.*, 2010; KOPPER *et al.*, 2013).

Outras famílias de toxinas são também importantes na composição geral do veneno de *Micrurus*, como as Lectinas do tipo C, responsáveis pela ação de agregação plaquetária, causando trombozes e afetando a homeostase; os peptídeos natriuréticos, que atuam no controle da natriurese e pressão sanguínea da presa; as metaloproteases, que atuam na hemorragia e coagulopatia causadas pelo veneno, além de respostas inflamatórias; L-aminoácido oxidases (LAAO), que atua também na inibição da agregação plaquetária, causando hemorragias; serinoproteases, que atuam na cascata de coagulação, além de outras atividades biológicas como a digestão da presa (JIANG *et al.*, 2011).

4.2. OBJETIVOS

4.2.1. OBJETIVO GERAL

Implementar a ferramenta PepLess e todas as suas funcionalidades em formato de estudo de caso dos principais transcritos de toxinas (PLA2 e 3FTx) identificados por Aird e colaboradores em 2017 de quatro espécies de serpentes do gênero *Micrurus spp.* mais endêmicas que correspondam a toda a América do Sul: *M. altirostris*, *M. lemniscatus*, *M. surinamensis* e *M. corallinus*.

4.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar na ferramenta PepLess as sequências de transcritos das principais toxinas de quatro espécies de serpentes do gênero *Micrurus spp.* identificadas por Aird e colaboradores (2017);
- Gerar todos os dados relativos as análises realizadas pela ferramenta;
- Selecionar um tamanho e cobertura de fragmentação de peptídeos;
- Sintetizar uma membrana pela técnica de SPOT a partir do arquivo gerado pela ferramenta;
- Produzir um soro específico contra os venenos das quatro espécies de serpentes;
- Realizar imunoenaios de SPOT com a membrana produzida;
- Analisar dos resultados de mapeamento dos imunoenaios utilizando a ferramenta.

4.3. MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1. IMPLEMENTAÇÃO DE PEPLESS COM TRANSCRITOS DA SERPENTE *MICRURUS SPP*

Um arquivo em formato FASTA contendo os principais transcritos das duas famílias de toxinas de *Micrurus spp.* foi criado a partir dos dados de Aird e colaboradores (2017) e incorporado à ferramenta PepLess.

Quarenta e nove sequências foram incorporadas, sendo treze de *M. lemniscatus*, onze de *M. surinamensis*, quinze de *M. corallinus* e dez de *M. altirostris*. Os seguintes tamanhos foram então informados a ferramenta para que a fragmentação se iniciasse: Lengths 10, 12 e 15; Offsets 1, 2, 3 e 5.

Escolheu-se a melhor cobertura a partir dos gráficos de redução e quantidade de peptídeos produzidos, e gerou-se um arquivo específico a ser incorporado à ferramenta de síntese de membranas ResPep SL.

4.3.2. PRODUÇÃO DE SORO ESPECÍFICO CONTRA O VENENO DE *MICRURUS SPP*

Uma coelha fêmea adulta foi imunizada com uma mistura de venenos de *M. altirostris*, *M. lemniscatus*, *M. surinamensis* e *M. corallinus* (25 µg de cada veneno) para obtenção de anticorpos anti-*Micrurus spp.* O soro pré-imune (PI) foi coletado e, uma semana depois, o animal recebeu uma injeção subcutânea inicial de 100 µg de venenos em adjuvante Montanide. Três injeções de reforço foram administradas em um intervalo de duas semanas cada, usando a mesma dosagem, e uma amostra de sangue foi coletada sete dias após a quarta dose para análise de título de anticorpos. Após duas semanas, um novo ciclo de imunizações foi iniciado, com a mesma dosagem de venenos em quatro doses. Sete dias após a última dose, uma amostra de sangue foi coletada para análise de título de anticorpos.

A reatividade do soro produzido frente à mistura de venenos de *Micrurus* foi determinada por ELISA como descrito por Chávez-Olortegui e colaboradores em 1991 (CHÁVEZ-OLORTEGUI *et al.*, 1991). Placas Costar foram sensibilizadas por 18 horas a 4 °C com 100 µL de solução de 0,5 µg/mL de venenos de *M. altirostris*, *M. lemniscatus*,

M. surinamensis e *M. corallinus* em tampão de bicarbonato de sódio 0,02 M em pH 9.6. Realizou-se o bloqueio com 1% de leite desnatado em tampão fosfato salino - PBS e lavagem com 0,05% de Tween 20 em PBS. Em seguida, os soros colhidos após as duas rodadas de imunização e o soro pré-imune foram adicionados em diluição em série de 1:1.000 a 1:128.000 e incubados durante 1h a 37 °C. A placa foi lavada e incubada com anticorpo anti-IgG de coelho conjugada com peroxidase *horseradish* (HRP, Sigma-Aldrich A9292) diluída 1:4.000, durante 1h a 37 °C. Os valores de absorbância foram determinados a 490 nm em um leitor de placas ELISA (BIO-RAD, 680). Os ensaios foram realizados em duplicatas para todas as amostras e as médias e desvios padrões, calculados.

4.3.3. SÍNTESE E MAPEAMENTO DE EPITOPOS PELO MÉTODO DE SPOT E ANÁLISE POR PEPESS

A síntese da membrana de celulose foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila no laboratório da Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol localizado na Universidade Federal do Paraná (UFPR), através do aparelho de síntese automática ResPep SL (IntavisAG, Bioanalytical Instruments, Alemanha) pela mesma metodologia descrita no Capítulo III (sessão 3.3.2.), onde quinze pentadecapeptídeos foram sintetizados, sobrepostos por cinco resíduos cobrindo os principais transcritos de toxinas (PLA2 e 3FTx) identificados em *M. altirostris*, *M. lemniscatus*, *M. surinamensis* e *M. corallinus*.

Para avaliar a reatividade de anticorpos frente a membrana de SPOT, foi utilizado soro anti-*Micrurus spp* de *M. altirostris*, *M. lemniscatus*, *M. surinamensis* e *M. corallinus* produzido neste Capítulo na diluição 1:200.

Além disso, os seguintes soros com as seguintes diluições foram também utilizados: Soro de coelho anti-veneno de *M. surinamensis* produzido por nosso grupo de pesquisa (diluição 1:2.000) e soros de cavalos imunizados com venenos de *M. corallinus*, *M. ibiboboca* e *M. frontalis* produzidos por nosso grupo de pesquisa (diluições 1:5.000). Um ELISA foi realizado com os quatro soros, utilizando a mesma metodologia dissertada em 4.3.2.: Placa Costar sensibilizada também com solução de 0,5 µg/mL de venenos e soros em diluições em série de 1:1.000 a 1:128.000. A placa foi lavada e incubada com anticorpos anti-IgG de coelho e anti-IgG de cavalo, ambas conjugadas com peroxidase *horseradish* (HRP, Sigma-Aldrich A9292), e diluídas 1:4.000. Os valores de absorbância

foram determinados a 490 nm em um leitor de placas ELISA (BIO-RAD, 680). Os ensaios foram realizados em duplicatas para todas as amostras e as médias e desvios padrões, calculados.

Como controle destes experimentos, os mesmos ensaios foram realizados na membrana com soro de coelhos e cavalos não imunizados (soros pré-imune) (diluição para coelhos 1:200 e 1:2.000 e diluição para o de cavalos 1:5000).

As fotografias de cada imunoensaio de SPOT utilizando a membrana de *Micrurus spp.* foram carregadas na ferramenta PepLess e os dois macros de ImageJ foram utilizados para leitura automática dos *pixels* de toda a membrana. A partir da média de cada circunferência, valores de cada SPOT foram disponibilizados para análise.

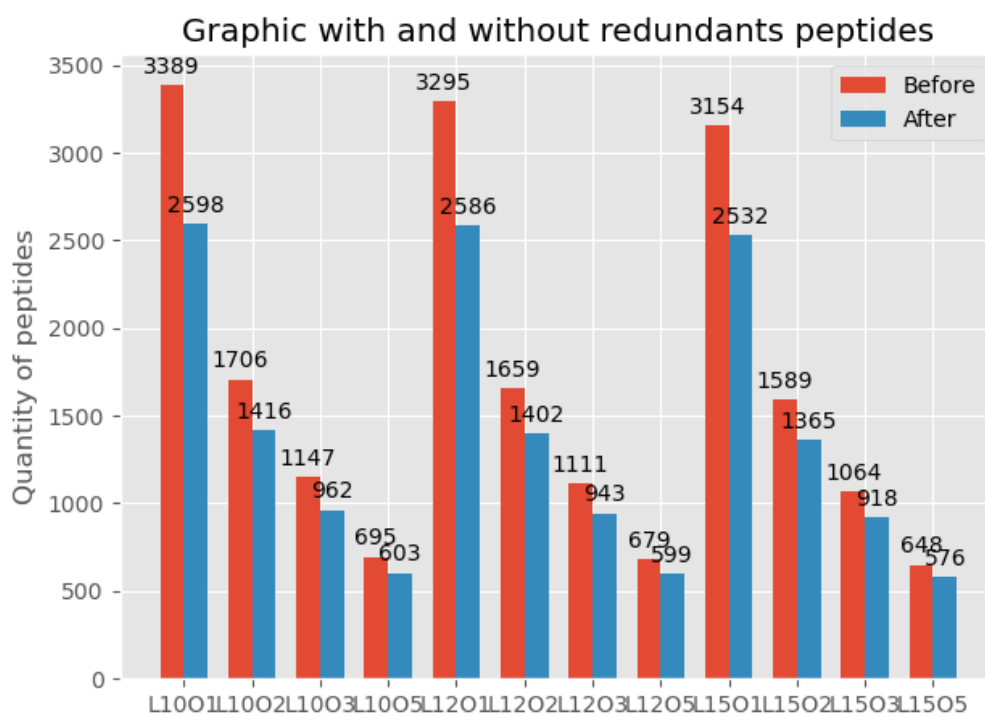
Considerou-se como resultado positivo os valores acima de 75% da média entre todos os valores, e os SPOTs positivos foram então alinhados entre si, a fim de buscar peptídeos potencialmente importantes para produção de anticorpos capazes de reconhecer e neutralizar venenos de *Micrurus spp.*, como alternativas no desenvolvimento de soros.

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.4.1. IMPLEMENTAÇÃO DE PEPESS COM TRANSCRITOS DA SERPENTE *MICRURUS SPP*

A partir dos tamanhos informados para as fragmentações, dois gráficos foram gerados, sendo o primeiro apresentando as quantidades de peptídeos com e sem redundância em todos os tamanhos desejados e o segundo apresentando a porcentagem de redução em quantidade de peptídeos necessários após a retirada de peptídeos redundantes (**Figura 44**).

(A)



(B)

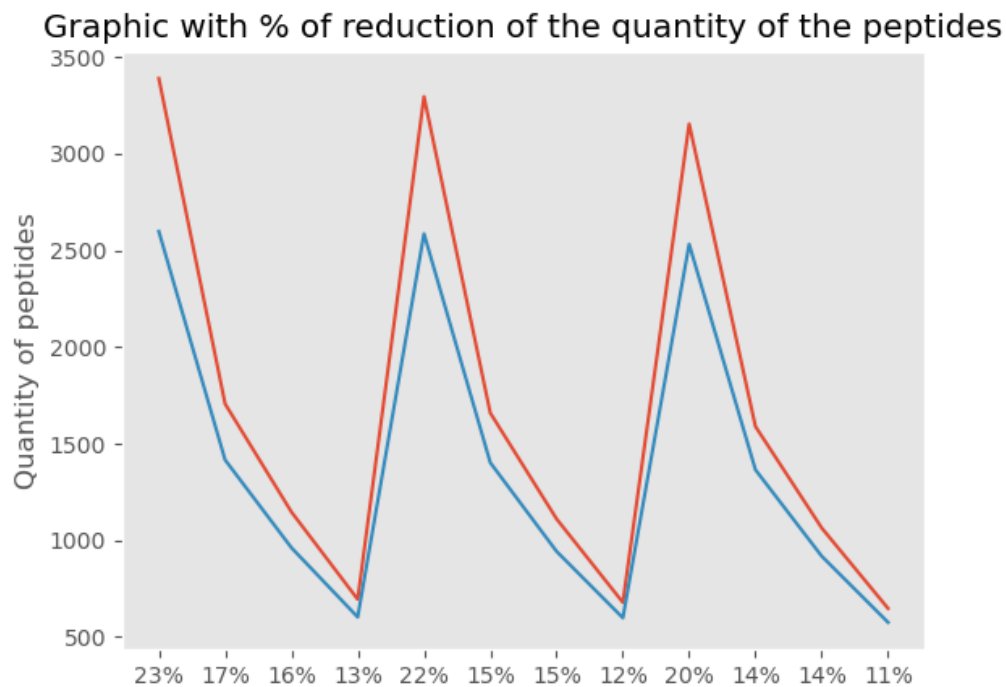


Figura 44: Resultado gráfico da utilização da ferramenta PepLess com um banco de dados das duas principais toxinas identificadas no transcriptoma de *Micrurus spp.* (A) Quantidade de peptídeos produzidos; (B) Porcentagem de redução na quantidade de peptídeos produzidos: (Before) em vermelho representa a quantidade de peptídeos com a presença de peptídeos redundantes e (After) em azul representa a quantidade de peptídeos sem a presença de peptídeos redundantes:

A partir dos dados informados pela ferramenta PepLess, a cobertura de L15O5, com 576 peptídeos e 11% de redução de peptídeos em relação ao tamanho original foi escolhida para dar seguimento à síntese da membrana. A partir do tamanho escolhido, a ferramenta PepLess gerou um arquivo específico a ser incorporado a ferramenta de síntese de membranas ResPep SL.

4.4.2. PRODUÇÃO DE SORO ESPECÍFICO CONTRA O VENENO DE *MICRURUS SPP*

A coelha imunizada com a mistura de venenos de *Micrurus* teve seu título de anticorpos avaliados por ELISA frente à mesma mistura após 4 e 8 doses. Conforme o esperado, a titulação de anticorpos foi praticamente duplicada entre as duas rodadas de imunização (**Figura 45**).

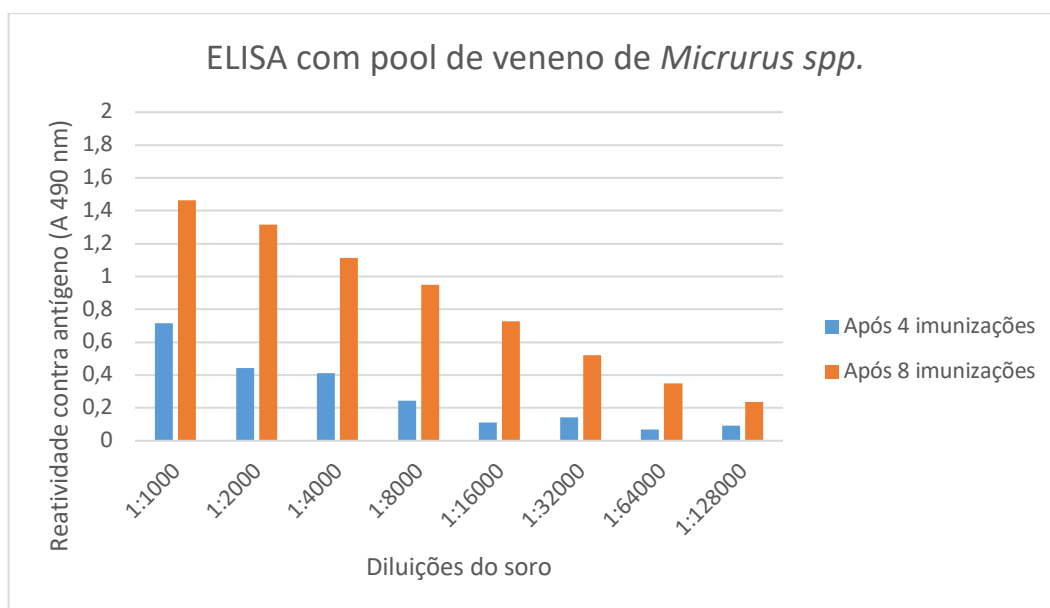


Figura 45: ELISA com soro produzido em coelha a partir de mistura de venenos de quatro espécies de *Micrurus spp.* presentes na América do Sul. (Azul) Soro extraído após quatro imunizações e (Laranja) Soro extraído após oito imunizações. A placa foi sensibilizada com 100 μ L de uma solução de 0,5 μ g/mL de venenos de *M. altirostris*, *M. lemniscatus*, *M. surinamensis* e *M. corallinus* e o soro foi testado em diluição em série de 1:1.000 a 1:128.000, revelado com anticorpo IgG anti-coelho diluído 1:4.000 e OPD e lido em comprimento de onda de 490 nm.

4.4.3. SÍNTESE E MAPEAMENTO DE EPITOPOS PELO MÉTODO DE SPOT E ANÁLISE POR PEPLISS

A membrana sintetizada foi testada em imunoenaios seguindo a metodologia descrita no Capítulo III (sessão 3.3.2.), com soro de coelho não imune, soro de cavalo não imune, soro anti-*Micrurus spp* de *M. altirostris*, *M. lemniscatus*, *M. surinamensis* e

M. corallinus produzido neste capítulo, soro de coelho contra o veneno de *M. surinamensis* produzido por nosso grupo de pesquisa e soros de cavalos anti-*M. corallinus*, *M. ibiboboca* e *M. frontalis* produzidos por nosso grupo de pesquisa.

A identificação de todas as toxinas e os peptídeos correspondentes a cada spot estão disponíveis no **Apêndice 2**.

Não observou-se reatividade dos soros não imunes de coelho e cavalo à membrana, conforme esperado, com exceção de dois SPOTs com soro não imune de cavalo, que serão desconsiderados nos outros imunoenaios, caso reativos (**Figura 46**).

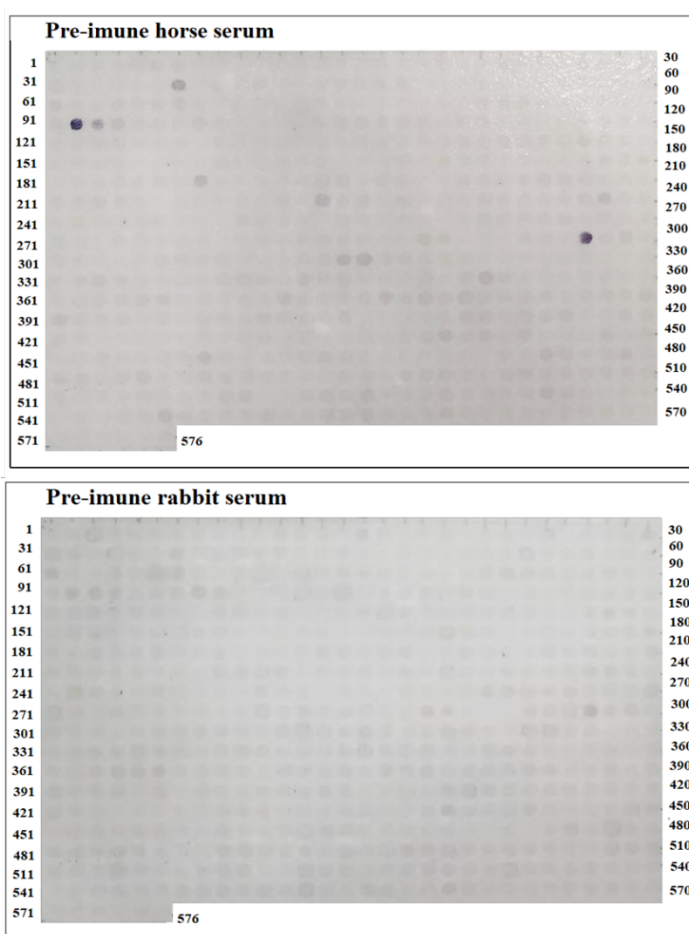


Figura 46: SPOTs com soros pré-ímenes em membrana de *Micrurus spp.* Soros pré-ímenes de coelho e cavalos nas diluições 1:200 e 1:5.000 respectivamente. Utilizou-se anticorpo anti-IgG de coelho e de cavalo, respectivamente, conjugados à fosfatase alcalina (1:4000 e 1:3000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos SPOTs reativos.

No imunoenaiio utilizando o soro produzido neste Capítulo foi possível observar SPOTs pouco reativos, o que não condiz com a alta especificidade observado por ELISA.

Esta baixa reatividade pode se dar pela presença de epitopos conformacionais ou ainda poucas rodadas de imunizações no animal. Já os imunoenaios utilizando os soros provenientes de outros trabalhos em nosso laboratório apresentaram SPOTs bastante reativos, que quando alinhados aos SPOTs do soro produzido neste Capítulo, apresentam semelhanças importantes (**Figura 47, Figura 48, Figura 49, Figura 50 e Figura 51**).

A partir das médias geradas pela ferramenta PepLess utilizando os macros de ImageJ, os SPOTs reativos com valores acima de 75% da média foram considerados positivos e suas sequências peptídicas, foram alinhadas entre si (**Figura 52 e Figura 53**). A partir das semelhanças identificadas nos imunoenaios, confirmadas pelos alinhamentos, pensa-se na utilização destes peptídeos para o desenvolvimento de uma proteína recombinante multiepitópica que possa ser usada como imunógeno, desencadear a produção de anticorpos neutralizantes *in vivo* e, assim, gerar proteção contra o envenenamento das principais *Micrurus* de toda a América do Sul.

Além disso, para todos os quatro soros utilizados nestes imunoenaios, um ELISA foi realizado para garantir a uma boa titulação de anticorpos para os ensaios de SPOTs (**Figura 54**).

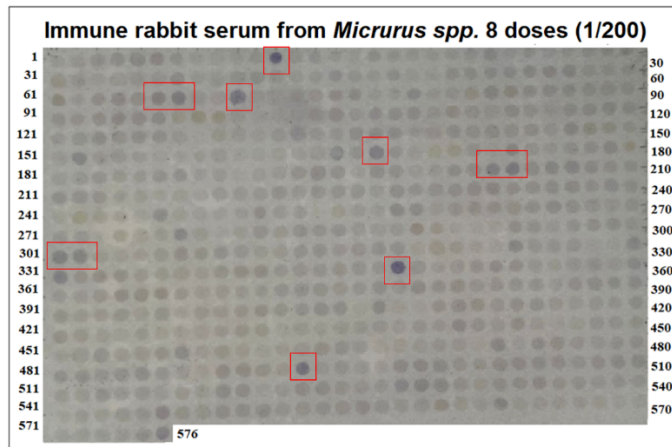


Figura 47: SPOT com soro anti-*Micrurus spp* de mistura de quatro espécies de *Micrurus spp.*, produzido em coelho na membrana de *Micrurus spp*. Soro anti-*Micrurus*spp na diluição 1:200. Utilizou-se anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina (1:4000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos SPOTs reativos. SPOTs considerados positivos pela ferramenta PepLess foram marcados em vermelho.

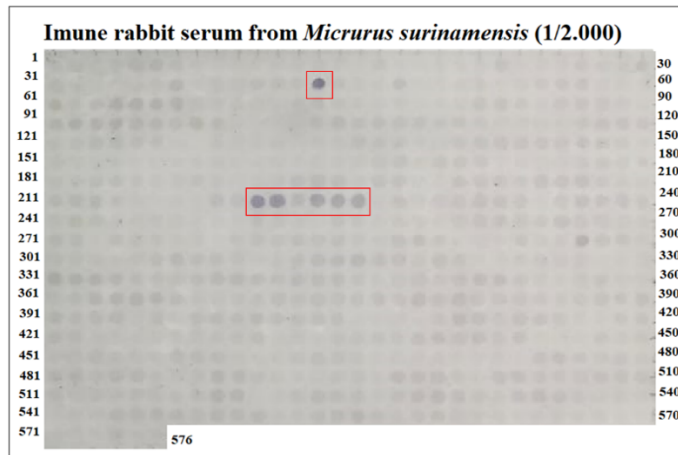


Figura 48: SPOT com soro de *Micrurus surinamensis* produzido em coelhos na membrana de *Micrurus spp.* Soro de *Micrurus surinamensis* na diluição 1:2.000. Utilizou-se anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina (1:4000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos SPOTs reativos. SPOTs considerados positivos pela ferramenta PepLess foram marcados em vermelho.

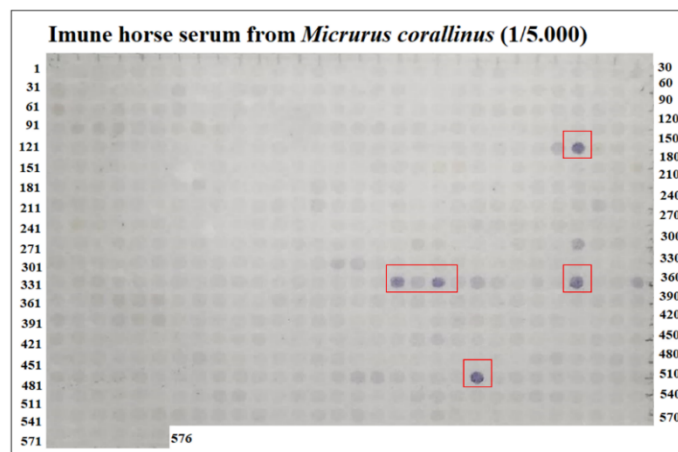


Figura 49: SPOT com soro de *Micrurus corallinus* produzido em cavalos na membrana de *Micrurus spp.* Soro de *Micrurus corallinus* na diluição 1:5.000. Utilizou-se anticorpo anti-IgG de cavalo conjugado à fosfatase alcalina (1:3000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos SPOTs reativos. SPOTs considerados positivos pela ferramenta PepLess foram marcados em vermelho.

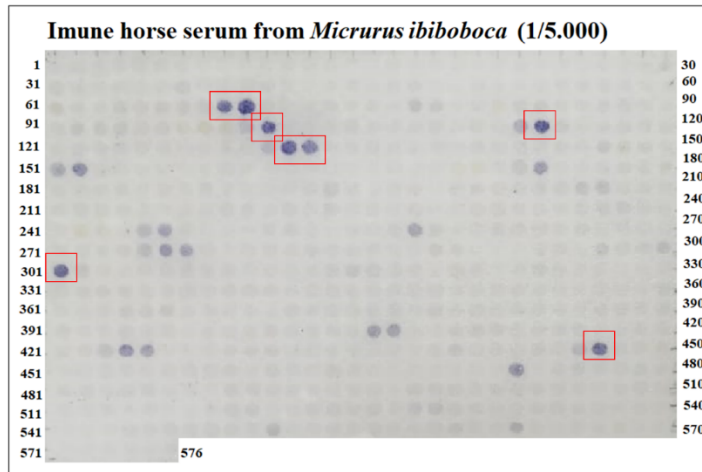


Figura 50: SPOT com soro de *Micrurus ibiboboca* produzido em cavalos na membrana de *Micrurus spp.* Soro de *Micrurus ibiboboca* na diluição 1:5.000. Utilizou-se anticorpo anti-IgG de cavalo conjugado à fosfatase alcalina (1:3000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos SPOTs reativos. SPOTs considerados positivos pela ferramenta PepLess foram marcados em vermelho.

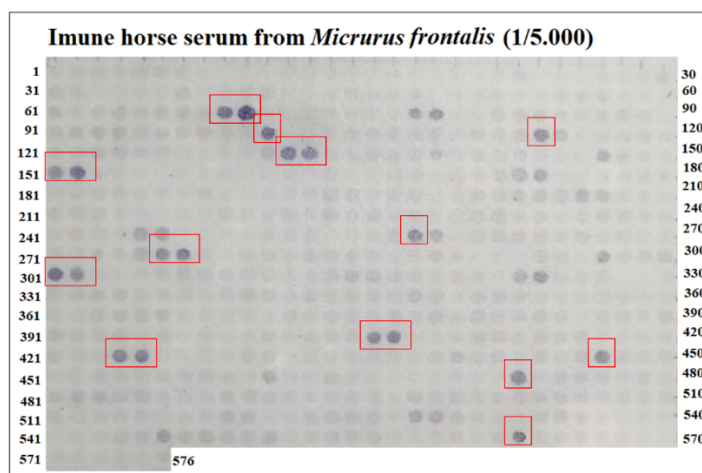


Figura 51: SPOT com soro de *Micrurus frontalis* produzido em cavalos na membrana de *Micrurus spp.* Soro de *Micrurus frontalis* na diluição 1:5.000. Utilizou-se anticorpo anti-IgG de cavalo conjugado à fosfatase alcalina (1:3000) e o substrato MTT-BCIP para a revelação dos SPOTs reativos. SPOTs considerados positivos pela ferramenta PepLess foram marcados em vermelho.

```

M.surinamensis3FTx      -QCYKKTWSDRHGTII----- 15
M.surinamensis3FTx.2   -----TWSDRHGTIIERGCA- 15
M.corallinus3FTx       LICYNTMM-QKV-----TCPE 15
M.lemniscatus3FTx      LICYVSMEGAKM-----TCP- 15
M.altirostris3FTx      LICYVSEYGAKM-----TCP- 15

M.lemniscatusPla2.4    -----PFIEE-NYNMDPERC-Q----- 15
M.surinamensisPla2     -----GGSGTPVDELDRCCQ----- 15
M.lemniscatusPla2.3    -----GTPVDELDRCCQVHD-- 15
M.surinamensisPla2.2   -----PVDELDRCCQVHDNDC 15
M.lemniscatusPla2      NTRTWVHFGWYGCY-----C----- 15
M.lemniscatusPla2.2    -----VHFGWYGCY-----CGRGGS- 15

```

Figura 52: Alinhamento entre os peptídeos reativos no imunoenensaio de SPOT utilizando o soro produzido neste Capítulo.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

M.corallinus3FTx.3      -----VTCPEGKDKCEKYAV----- 15
M.corallinus3FTx.1     -----LICYNMTMMQKVTCPE----- 15
M.corallinus3FTx.2     -----TMMQKVTCPEGKDKC----- 15
M.surinamensis3FTx.6   -----RIERRCVANCPKLGSL----- 15
M.surinamensis3FTx.5   -----EHRGERIERRCVANCL----- 15
M.surinamensis3FTx.4   -----QKKWEEHRGERIERR----- 15
M.surinamensis3FTx.3   -----KNICYQKKWEEHRGEL----- 15
M.surinamensis3FTx.2   -----TCPAGKNICYQKKWEL----- 15
M.surinamensis3FTx.1   -----CANSETCPAGKNICY----- 15
M.lemniscatus3FTx      -----CADSETCPVGNICY----- 15
M.corallinus3FTx.4     -----AYDVCCSTDLCKNKSS----- 15
M.altirostris3FTx      -----GAYNICCSTDLCKNKI----- 15
M.lemniscatusPla2.8    -----YTAVDELDRCCQTHF----- 15
M.surinamensisPla2.5   -----PVDELDRCCQVHDNCL----- 15
M.lemniscatusPla2.6    -----TPVDELDRCCQVHDD----- 15
M.corallinusPla2.6     -----GTPVDDLDRCCQAQK----- 15
M.corallinusPla2.2     -----GTPVDDLDRCCQAHD----- 15
M.corallinusPla2.4     -----GTPVDDLDRCCQVHD----- 15
M.lemniscatusPla2.2    -----GTPVDELDRCCQVHD----- 15
M.surinamensisPla2.3   -----TPVDDLDRCCQVHDN----- 15
M.lemniscatusPla2.7    GYGANYTAVDELDRCL----- 15
M.surinamensisPla2.1   --RGGGTPVDDLDRCCQ----- 15
M.altirostrisPla2      --GGGTPVDDLDRCCQ----- 15
M.surinamensisPla2.2   -RGGSGTPVDDLDRCC----- 15
M.lemniscatusPla2.1    GRGGSGTPVDELDRCL----- 15
M.corallinusPla2.5     -AGGSGTPVDELDRCC----- 15
M.lemniscatusPla2.4    --GGSGTPVDELDRCCK----- 15
M.lemniscatusPla2.5    -RGGSGTPVDELDRCC----- 15
M.surinamensisPla2.4   --GGSGTPVDELDRCCQ----- 15
M.corallinusPla2.3     GSGGSGTPVDDLDRCL----- 15
M.corallinusPla2.1     DSRGSGTPVDDLDRCL----- 15
M.lemniscatusPla2.3    DSRGSGTPVDELDRCL----- 15

```

Figura 53: Alinhamento entre os peptídeos reativos nos imunoenensaio de SPOT utilizando os soros de coelho imunizados com veneno de *M. surinamensis* produzido por nosso grupo de pesquisa e soros de cavalos imunizados com venenos de *M. corallinus*, *M. ibiboboca* e *M. frontalis* produzidos por nosso grupo de pesquisa.

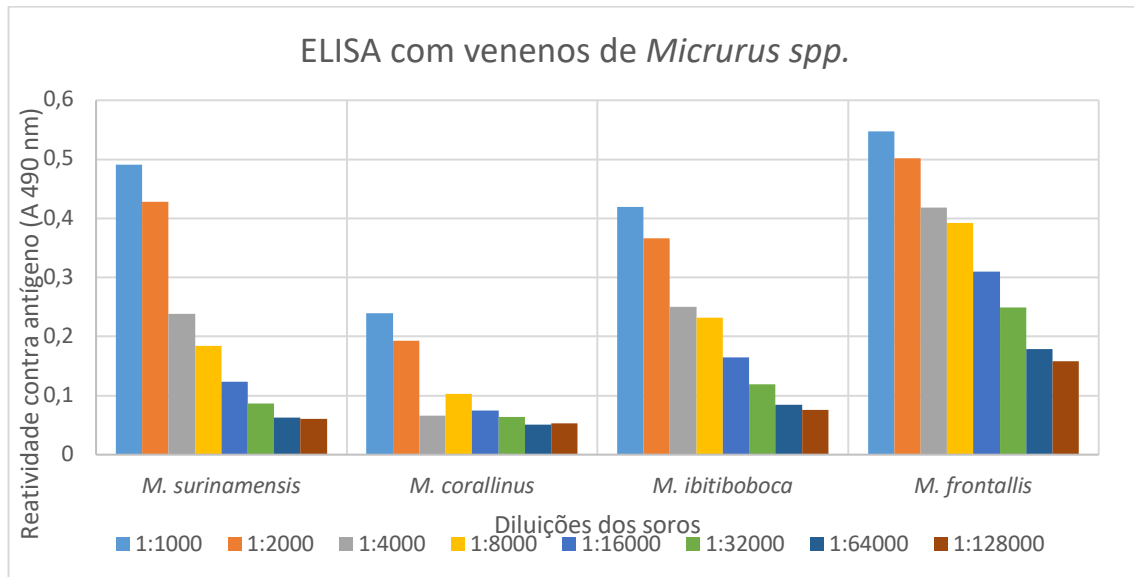


Figura 54: ELISA com soro de *M. surinamensis* produzido em coelha, e soros de *M. corallinus*, *M. ibiboboca* e *M. frontalis* produzidos em cavalos. A placa foi sensibilizada com solução de venenos e soros de 0,5 µg/mL o em diluição em série de 1:1.000 a 1:128.000, revelado com anticorpos IgGs anti-coelho e anti-cavalo diluídos 1:4.000 e OPD e lido em comprimento de onda de 490 nm.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

- O transcriptoma de *Loxosceles laeta* peruana possui semelhanças importantes, mas também diferenças visíveis quando comparado ao transcriptoma de *Loxosceles laeta* brasileira;
- A atividade hialuronidásica entre os venenos de *Loxosceles laeta* peruana e brasileira são potencialmente diferentes;
- A ferramenta PepLess se demonstrou eficiente na produção de dados não redundantes e na avaliação de imunoenaios de SPOT de forma automatizada;
- A utilização de transcritos de *Loxosceles laeta* como estudo de caso para a ferramenta PepLess resultou da determinação de importantes peptídeos relacionados ao envenenamento por esta aranha;
- A utilização de transcritos de *Micrurus spp.* como segundo estudo de caso para a ferramenta PepLess resultou em peptídeos com grande semelhança entre espécies diferentes da América do Sul.

6. PERSPECTIVAS

6.1. PERSPECTIVAS GERAIS

A ferramenta PepLess se apresenta como uma inovadora forma de estudos de peptídeos em todas as áreas biológicas, portanto, melhorias e adaptações podem ser feitas em suas funcionalidades para expandir sua utilização. Desta forma, nós propomos as seguintes perspectivas para esta ferramenta:

- Integrar a ferramenta PepLess em ambiente web através da utilização do framework Django;
- Utilizar a ferramenta em um estudo de caso de grandes proporções com potencial biotecnológico, como por exemplo o estudo de peptídeos da proteína spike de Covid-19.

Além disto, como perspectivas para os estudos de casos realizados tanto com os transcritos de *Loxosceles laeta* quanto os transcritos de *Micrurus spp.*, nós propomos as seguintes perspectivas:

- Sintetizar os principais peptídeos identificados no estudo de caso de *Loxosceles laeta*, visando aprimorar a proteína multiepitópica recombinante rMEPLox;
- Sintetizar os principais peptídeos identificados no estudo de caso de *Micrurus spp.*, visando a produção de uma proteína recombinante multiepitópica entre espécies que abranja toda a América do Sul;

6.2. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO: PROTEÍNA SPIKE DE COVID-19 (SARS-CoV-2)

Um exemplo de potencial biotecnológico a ser explorado com a ferramenta PepLess é a proteína spike de Covid-19. A proteína spike é responsável por mediar a ligação do vírus aos receptores da superfície celular do hospedeiro e a fusão entre o vírus e as membranas celulares. Além disso, ela também é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes gerados após a infecção por SARS-CoV-2, logo, mutações que afetam a antigenicidade da proteína spike são de particular importância.

Ao utilizar a ferramenta PepLess no banco de dados de mutações da proteína spike no NCBI, foi possível observar uma redução de até 94% dos peptídeos necessários a serem sintetizados em uma membrana. Desta forma, nós propomos a utilização destes dados para a síntese de membranas e a realização de imunoenaios com as mesmas como uma perspectiva biotecnológica para identificação dos principais peptídeos que estão presentes nesta proteína, considerando suas mutações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. *Imunidade Celular e Molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.

ABREU, L. C. DE; BERNARDE, P. S.; MOTA DA SILVA, A. Acidentes Com Animais Peçonhentos No Brasil Por Sexo E Idade. *Journal of Human Growth and Development*, v. 25, n. 1, p. 54–62, 2015.

AIRD SD, da Silva NJ, Qiu L, Villar-Briones A, Saddi VA, Telles MP de C, Grau ML, Mikheyev AS. 2017. Coralsnake venomomics: Analyses of venom gland transcriptomes and proteomes of six Brazilian taxa. *Toxins (Basel)*. 9:1–64. doi:10.3390/toxins9060187.

ARNON, R. and VAN REGENMORTEL, M.H.V. 1992. Structural basis of antigenic specificity and design of new vaccines. *FASEB J*. 6: 3265–3274.

BODE, W.; GOMIS-RÜTH, F. X.; STÖCKLER, W. Astacins, serralyins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins”. *FEBS Letters*, v. 331, n. 1–2, p. 134–140, 1993.

BOIA-FERREIRA M, Moreno KG, Basílio ABC, *et al.* TCTP from *Loxosceles Intermedia* (Brown Spider) Venom Contributes to the Allergic and Inflammatory Response of Cutaneous Loxoscelism. *Cells*. 2019;8(12):1489. Published 2019 Nov 22. doi:10.3390/cells8121489

CAMPBELL HW, LAMAR WW. 2004. *The Venomous Reptiles of Western Hemisphere: Coral snakes and sea snakes, Elapidae Family*. Nova York: Cornell University Press.

CARVALHO, L. S.; BONALDO, A. B.; BRESCOVIT, A. D. first record family Cithaeronidae Gnaphosoidea) wor orld T he f ir st r ecor d of the f amil y Cithaer onidae

(Ar aneae , Gna phosoidea) to the new w or ld. Revista Brasileira de Zoologia, v. 24, n. Ibsp 70223, p. 512–514, 2007.

CARVALHO, M B, Franck Molina, Liza F Felicori, Yvis: antibody high-density alignment visualization and analysis platform with an integrated database, Nucleic Acids Research, Volume 47, Issue W1, 02 July 2019, Pages W490–W495, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz387>.

CECCHINI, A. L. *et al.* Biological and enzymatic activities of Micrurus sp. (Coral) snake venoms. Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology, v. 140, n. 1, p. 125–34, jan. 2005.

CHAIM, O. M. *et al.* Brown spider (Loxosceles genus) venom toxins: Tools for biological purposes. Toxins, v. 3, n. 3, p. 309–344, 2011.

CHANG, J, Chapman B, Friedberg I, *et al.* Biopython Tutorial and Cookbook.; 2009.

CHATZAKI, M. *et al.* Cutaneous loxoscelism caused by Loxosceles similis venom and neutralization capacity of its specific antivenom. Toxicon, v. 60, n. 1, p. 21–30, 2012.

CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; AMARAL, D.A.; ROCHAT, H.; DINIZ, C., GRANIER, C. In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization. Vaccine, v. 9, n. 12, p. 907-10, 1991.

DA SILVA, P. *et al.* Brown spiders and loxoscelism. Toxicon, v. 44, p. 693–709, 2004.

DA SILVEIRA RB, Pigozzo RB, Chaim OM, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from Loxosceles intermedia (brown spider) venom gland. Biochimie. 2006 Sep;88(9):1241-1253. DOI: 10.1016/j.biochi.2006.02.008.

DE CARVALHO, N. D. *et al.* Neurotoxicity of coral snake phospholipases A2 in cultured rat hippocampal neurons. Brain research, v. 1552, p. 1–16, 27 jan. 2014.

DEUFEL A, CUNDALL D. Feeding in *Atractaspis* (Serpentes: Atractaspididae): a study in conflicting functional constraints. *Zoology (Jena)*. 2003;106(1):43-61. doi: 10.1078/0944-2006-00088. PMID: 16351890.

DOLEY, Robin; ZHOU, Xingding; KINI, Manjunatha. Snake Venom Phospholipase A2 Enzymes. Snake Venom Phospholipase A2 Enzymes. . In: Handbook of Venoms and Toxins. 1. ed. New York: Taylor & Francis Group, LLC, 2010. Chap 8, p. 174-195.

ESRI. ESRI Shapefile Technical Description. An ESRI White Paper – July 1998.

FEITOSA, L. *et al.* Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon*, v. 36, n. 7, p. 1039–1051, 1998.

FELICORI, L., Araujo, S. C., Machado de Ávila, R. A., 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(5), 509.

FELICORI, L. *et al.* An in vivo protective response against toxic effects of the dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. *Vaccine*, v. 27, n. 31, p. 4201–8, 2009.

FERNANDES-PEDROSA, M. DE F. *et al.* Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. *BMC Genomics*, v. 9, p. 1–12, 2008.

FRANCO, Francisco Luís. Origem e Diversidade das Serpentes. Em: *Animais Peçonhentos no Brasil*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. Cap. 3, p. 22-41

FRANK, R. (2002). The SPOT-synthesis technique. *Journal of Immunological Methods*, 267(1), 13–26. doi:10.1016/s0022-1759(02)00137-0).

FRANK, R. (1992). Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable,

parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron*, 48(42), 9217–9232. doi:10.1016/s0040-4020(01)85612-x.

FRY, B. G. *et al.* The structural and functional diversification of the Toxicofera reptile venom system. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology, v. 60, n. 4, p. 434–48, 15 set. 2012.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. *Am. J. Med. Sci*, v. 304, p. 261–267, 1992.

GIBAS, C., Jambeck, P., *Developing Bioinformatics Computer Skills*, O'Reilly, 2001.

GIUSEPPE PO, ULLAH A, SILVA DT, GREMSKI LH, WILLE AC, CHAVES MOREIRA D, RIBEIRO AS, CHAIM OM, MURAKAMI MT, VEIGA SS, ARNI RK. Structure of a novel class II phospholipase D: catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jun 17;409(4):622-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.05.053. Epub 2011 May 17. PMID: 21616057.

GLADA, M. L. R.; Miranda, M. T. M.; Marquez, U. M. L.; *Food Chem*. 1998, 61, 177.

GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; VILARINHO TAMBOURGI, D. First record on *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae, Sicariidae) in the West Zone of São Paulo City, São Paulo, Brazil, and considerations regarding its geographic distribution. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 3, p. 425–426, 2003.

GREMSKI, L. H., da Silveira, R. B., Chaim, O. M., Probst, C. M., Ferrer, V. P., Nowatzki, J., ... Veiga, S. S. (2010). A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Mol Biosyst*, 6(12), 2403–2416. <https://doi.org/10.1039/c004118a>

GUIMARÃES, G. *et al.* Biochemical and immunological characteristics of Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom: Neutralization of its toxic effects by anti-loxoscelic antivenoms. *Toxicon*, v. 70, p. 90–97, 2013.

GUTTE, B.; *Peptides: Synthesis, Structure, and Applications*, Academic Press: New York, 1995.

HERNAN, S.; ZAVALETA, A. Panorama Epidemiológico del Loxoscelismo en el Perú *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 1997.

HILPERT, K., Winkler, D. F., & Hancock, R. E. (2007). Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. *Nature Protocols*, 2(6), 1333–1349. doi:10.1038/nprot.2007.160.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: Old obstacles, new directions. *Annals of Emergency Medicine*, v. 44, n. 6, p. 608–624, 2004.

HOLDING ML, Margres MJ, Mason AJ, Parkinson CL, Rokyta DR. Evaluating the Performance of De Novo Assembly Methods for Venom-Gland Transcriptomics. *Toxins (Basel)*. 2018;10(6):249. Published 2018 Jun 19. doi:10.3390/toxins10060249

HORTA CC, MAGALHÃES BDE F, OLIVEIRA-MENDES BB, DO CARMO AO, DUARTE CG, FELICORI LF, MACHADO-DE-ÁVILA RA, CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C, KALAPOTHAKIS E. Molecular, immunological, and biological characterization of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase: new insights into its role in envenomation. *PLoS Negl Trop Dis*. Feb 13;8(2):e2693. 2014

ISBISTER, G. K.; FAN, H. W. Spider bite. *Lancet*, v. 378, n. 9808, p. 2039–2047, 2011.

JIANG, Y. *et al.* Venom gland transcriptomes of two elapid snakes (*Bungarus multicinctus* and *Naja atra*) and evolution of toxin genes. *BMC genomics*, v. 12, n. 1, p. 1, jan. 2011.

JUSTA, H. C. d., Matsubara, F. H., de-Bona, E., Schemczssen-Graeff, Z., Polli, N. L. C., de Mari, T. L., *et al.* (2020). LALLT (Loxosceles Allergen-like Toxin) from the Venom of *Loxosceles Intermedia*: Recombinant Expression in Insect Cells and Characterization

as a Molecule with Allergenic Properties. *Int. J. Biol. Macromolecules* 164, 3984–3999. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.08.212

KALUZ, Martin *et al.* A flexible and configurable architecture for automatic control remote laboratories. *IEEE Transactions on Learning Technologies*, v. 8, n. 3, p. 299–310, 2015.

KÖHLER, G., MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495–497 (1975). <https://doi.org/10.1038/256495a0>

KOPPER, R. A *et al.* Comparison of total protein and phospholipase A2 levels in individual coralsnake venoms. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, v. 76, p. 59–62, 15 dez. 2013.

LAUNE, D., Molina, F., Ferrières, G., Villard, S., Bès, C., Rieunier, F., ... Granier, C. (2002). Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *Journal of Immunological Methods*, 267(1), 53–70. doi:10.1016/s0022-1759(02)00140-0.

LEÃO, L. I.; HO, P. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. D. L. M. Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. *BMC genomics*, v. 10, p. 112, jan. 2009.

LIMA, S. DE A. *et al.* Recombinant protein containing B-cell epitopes of different *Loxosceles* spider toxins generates neutralizing antibodies in immunized rabbits. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. APR, 2018.

MACHADO, A., Liria, C. W., Proti, P. B., Remuzgo, C., & Miranda, M. T. M. (2004). Síntesis química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. *Química Nova*, 27(5), 781–789. doi:10.1590/s0100.

MAGUINÃ-VARGAS, C. *et al.* Enfermedades por artrópodos. Parte I: Loxoscelismo cutáneo y cutáneo-visceral en el Perú. *Dermatología Peruana*, v. 14, p. 134–139, 2004.

MARQUES OA V., SAZIMA I. 1997. Diet and feeding behavior of the coral snake *Micrurus corallinus*, from the Atlantic Forest of Brazil. *Herpetol. Nat. Hist.* 5:88–93.

MEDINA-SANTOS, R., Guerra-Duarte, C., de Almeida Lima, S., Costal-Oliveira, F., Alves de Aquino, P., Oliveira do Carmo, A., ... Chavez-Olortegui, C. (2019). Diversity of astacin-like metalloproteases identified by transcriptomic analysis in Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom and in vitro activity characterization. *Biochimie*. doi:10.1016/j.biochi.2019.08.017.

MELGAREJO, A.R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. Em: *Animais Peçonhentos no Brasil*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. Cap. 4, p.42-70.

MENDOZA, Abner; GU, Guofei. Mobile application web api reconnaissance: Web-to-mobile inconsistencies & vulnerabilities. In: 2018 IEEE Symposium on Security and Privacy (SP). IEEE, 2018. p. 756-769.

MERRIFIELD, R.B. Solid-phase peptide synthesis. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1969; (32):221-296.121.

MILLER, C.; Rivier, J.; *Biopolymers* 1996, 40, 265.

MINISTERIO DE SAUDE, B. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. [s.l: s.n.].

MOREIRA, K. G. *et al.* Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurus frontalis* venom, decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology, v. 56, n. 1, p. 55–63, 1 ago. 2010.

MURAKAMI MT, FERNANDES-PEDROSA MF, TAMBOURGI DV, ARNI RK. Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. *J Biol Chem.* 2005 Apr 8;280(14):13658-64. doi: 10.1074/jbc.M412437200. Epub 2005 Jan 14. PMID: 15654080.

MURAKAMI MT, FERNANDES-PEDROSA MF, DE ANDRADE SA, GABDOULKHAKOV A, BETZEL C, TAMBOURGI DV, ARNI RK. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Mar 31;342(1):323-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.01.123. Epub 2006 Feb 3. PMID: 16480957.

OLIVEIRA, S.; SILVA, C. Levantamento da artropodofauna de um fragmento de mata e de uma pastagem, localizados próximo ao campus da universidade do estado de Mato Grosso, Tangará da Serra - MT. [s.l: s.n.].

OLVERA A, Ramos-Cerrillo B, Estévez J, *et al*. North and South American Loxosceles spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*. 2006 Jul;48(1):64-74. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.04.010.

PETERSEN, T. N., Brunak, S., Heijne, G. Von, & Nielsen, H. (2011). SignalP 4 . 0 : discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785–786. <https://doi.org/10.1038/nmeth>

PERUMAL SAMY, R. *et al*. Purification, characterization and bactericidal activities of basic phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon halys* (Chinese pallas). *Biochimie*, v. 90, n. 9, p. 1372–88, set. 2008.

POLEGATTO, C. Aspectos evolutivos em araneomorphae: arthropoda arachinida. [s.l.] Centro Universitário Claretiano, 2008.

POSTIC G, Gracy J, Périn C, Chiche L, Gelly JC. KNOTTIN: the database of inhibitor cystine knot scaffold after 10 years, toward a systematic structure modeling. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D454-D458. doi:10.1093/nar/gkx1084

POUGH, F. Harvey; HEISER, John B.; JANIS, CRISTINE, M. A vida dos vertebrados. 4. Ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 718 p.

QUAN, D. North American poisonous bites and stings. *Critical care clinics*, v. 28, n. 4, p. 633–59, out. 2012.

RECH P. SI AS: Sequence identities and similarities. 2008. <http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>

REINEKE, U., Kramer, A., Schneider-Mergener, J. Antigen sequence- and library-based mapping of linear and discontinuous protein-protein interaction sites by spot synthesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1999; 243:23-36.

RIBEIRO, M. F. *et al.* Pattern of inflammatory response to *Loxosceles intermedia* venom in distinct mouse strains: A key element to understand skin lesions and dermonecrosis by poisoning. *Toxicon*, v. 96, p. 10–23, 2015.

ROZE JA, Tilger GM. 1983. *Micrurus fulvius* (Linnaeus) North American Coral Snake. *Cat. Am. Amphib. Reptil.*:1951–1954.

ROZE, J. A., 1996. *Coral snakes of the Americas: Biology, identification and venoms.* Malabar, Florida. Krieger Publishing Company. xii + 328 p.

SADE YB, Bóia-Ferreira M, Gremski LH, *et al.* Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2012 Jan;44(1):170-177. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.10.013. PMID: 22051631.

SANDENFER R, Brinda D, Wapola J, Maki SE, Marc D. EHR usability on mobile devices. *Online Res J Educ Perspectives Health Informatics Information Manage*, 2013.

SCHEMCZSSEN-GRAEFF, Z., Justa, H. C. d., Nowatzki, J., Baldissera, A. B., Polli, N. L. C., De-Bona, E., *et al.* (2021). Description of a Serpin Toxin in *Loxosceles* (Brown Spider) Venoms: Cloning, Expression in Baculovirus-Infected Insect Cells and Functional Characterization. *Int. J. Biol. Macromolecules* 183, 1607–1620. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.05.129

SILVA JR. NJ, SITES JC. 2001. Phylogeny of South American triad coral snakes (Elapidae: Micrurus) based on molecular characters. *Herpetologica* 57:1–22.

SILVEIRA, A. L. First synanthropic record of *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae, Sicariidae) in the municipality of Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n. 6, p. 723–726, 2009.

SLOWINSKI, J.B. A Phylogenetic Analysis of the New World Coral Snakes (Elapidae: Leptomicrurus, Micruroides, and Micrurus) Based on Allozymic and Morphological Characters. *J. Herpetol.* 1995, 29, 325–338.

SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. *Clinics in Dermatology*, v. 24, n. 3, p. 213–221, 2006.

TREVISAN-SILVA, D. *et al.* Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). *Biochimie*, v. 92, n. 1, p. 21–32, 2010.

TREVISAN-SILVA, D. *et al.* Differential metalloprotease content and activity of three *Loxosceles* spider venoms revealed using two-dimensional electrophoresis approaches. *Toxicon*, v. 76, p. 11–22, 2013.

VETTER, R. S.; VISSCHER, P. K.; D, P. Bites and stings of medically important venomous arthropods. *International Journal of Dermatology*, v. 37, p. 481–496, 1998.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics *Zhong. Nat Rev Genet*, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2009.

WEINSTEIN, Scott A.; SMITH, Tamara L.; KARDONG, Kenneth V. Reptile Venom Glands: Form, Functions and Future. In: *Handbook of Venoms and Toxins*. 1. ed. New York: Taylor & Francis Group, LLC, 2010. Chap. 3, p.65-94.

WEN, F. H. Evolução Loxoscelismo cutâneo.

ZOBEL-THROPP, P. A., Correa, S. M., Garb, J. E., and Binford, G. J. (2014). Spit and Venom from Scytodes Spiders: A Diverse and Distinct Cocktail. *J. Proteome Res.* 13, 817–835. doi:10.1021/pr400875s

ZHOU, Q.; SU, X.; NING, K. Assessment of quality control approaches for metagenomic data analysis. *Scientific Reports*, v. 4, n. 4, p. 1–11, 2014.

8. APÊNDICES

8.1. APÊNDICE 1: Lista de toxinas e os peptídeos correspondentes a cada spot da membrana de *L. laeta* peruana

Número	Posição	Peso Molecular	Sequência	Toxina
1	A 1	1.703.814	L-D-F-E-T-V-I-S-N-Q-D-P-I-V-D	LALP-LP1
2	A 2	1.672.798	E-T-V-I-S-N-Q-D-P-I-V-D-G-M-R	
3	A 3	1.684.834	I-S-N-Q-D-P-I-V-D-G-M-R-L-V-E	
4	A 4	1.673.764	Q-D-P-I-V-D-G-M-R-L-V-E-G-D-M	
5	A 5	1.708.805	I-V-D-G-M-R-L-V-E-G-D-M-L-F-D	
6	A 6	1.722.748	G-M-R-L-V-E-G-D-M-L-F-D-D-E-P	
7	A 7	1.755.744	L-V-E-G-D-M-L-F-D-D-E-P-F-T-E	
8	A 8	1.755.730	G-D-M-L-F-D-D-E-P-F-T-E-R-N-A	
9	A 9	1.842.868	L-F-D-D-E-P-F-T-E-R-N-A-V-K-Y	
10	A10	1.838.832	D-E-P-F-T-E-R-N-A-V-K-Y-D-Q-Q	
11	A11	1.893.926	F-T-E-R-N-A-V-K-Y-D-Q-Q-L-W-P	
12	A12	1.786.900	R-N-A-V-K-Y-D-Q-Q-L-W-P-N-G-V	
13	A13	1.834.951	V-K-Y-D-Q-Q-L-W-P-N-G-V-I-I-Y	
14	A14	1.772.935	D-Q-Q-L-W-P-N-G-V-I-I-Y-K-I-S	
15	A15	1.713.971	L-W-P-N-G-V-I-I-Y-K-I-S-Q-A-L	
16	A16	1.764.978	N-G-V-I-I-Y-K-I-S-Q-A-L-R-Q-Y	
17	A17	1.850.042	I-I-Y-K-I-S-Q-A-L-R-Q-Y-A-Q-R	
18	A18	1.859.038	K-I-S-Q-A-L-R-Q-Y-A-Q-R-I-R-E	
19	A19	1.860.999	Q-A-L-R-Q-Y-A-Q-R-I-R-E-A-M-K	
20	A20	1.878.937	R-Q-Y-A-Q-R-I-R-E-A-M-K-S-N-E	
21	A21	1.789.827	A-Q-R-I-R-E-A-M-K-S-N-E-D-E-N	
22	A22	1.811.789	I-R-E-A-M-K-S-N-E-D-E-N-D-Y-V	
23	A23	1.778.731	A-M-K-S-N-E-D-E-N-D-Y-V-D-I-H	
24	A24	1.758.733	S-N-E-D-E-N-D-Y-V-D-I-H-R-G-P	
25	A25	1.822.783	D-E-N-D-Y-V-D-I-H-R-G-P-K-C-Y	
26	A26	1.806.872	D-Y-V-D-I-H-R-G-P-K-C-Y-S-R-V	
27	A27	1.701.862	D-I-H-R-G-P-K-C-Y-S-R-V-G-K-S	
28	A28	1.578.830	R-G-P-K-C-Y-S-R-V-G-K-S-K-G-G	
29	A29	1.590.819	K-C-Y-S-R-V-G-K-S-K-G-G-P-Q-P	
30	A30	1.509.852	S-R-V-G-K-S-K-G-G-P-Q-P-L-S-L	
31	B 1	1.409.788	G-K-S-K-G-G-P-Q-P-L-S-L-G-K-G	
32	B 2	1.470.739	K-G-G-P-Q-P-L-S-L-G-K-G-C-T-E	
33	B 3	1.533.739	P-Q-P-L-S-L-G-K-G-C-T-E-F-G-T	
34	B 4	1.574.802	L-S-L-G-K-G-C-T-E-F-G-T-I-L-H	
35	B 5	1.560.750	G-K-G-C-T-E-F-G-T-I-L-H-E-L-G	
36	B 6	1.641.771	C-T-E-F-G-T-I-L-H-E-L-G-H-S-V	

37	B 7	1.599.793	F-G-T-I-L-H-E-L-G-H-S-V-G-F-S	LALP-LP3
38	B 8	1.697.816	I-L-H-E-L-G-H-S-V-G-F-S-H-E-H	
39	B 9	1.690.807	E-L-G-H-S-V-G-F-S-H-E-H-S-R-I	
40	B10	1.777.813	H-S-V-G-F-S-H-E-H-S-R-I-D-R-D	
41	B11	1.843.849	G-F-S-H-E-H-S-R-I-D-R-D-E-F-L	
42	B12	1.901.939	H-E-H-S-R-I-D-R-D-E-F-L-I-V-H	
43	B13	1.869.959	S-R-I-D-R-D-E-F-L-I-V-H-K-E-N	
44	B14	1.853.952	D-R-D-E-F-L-I-V-H-K-E-N-I-L-N	
45	B15	1.739.910	E-F-L-I-V-H-K-E-N-I-L-N-G-S-Q	
46	B16	1.749.869	I-V-H-K-E-N-I-L-N-G-S-Q-H-D-F	
47	B17	1.784.942	K-E-N-I-L-N-G-S-Q-H-D-F-K-K-K	
48	B18	1.769.931	I-L-N-G-S-Q-H-D-F-K-K-K-L-E-N	
49	B19	1.815.912	G-S-Q-H-D-F-K-K-K-L-E-N-E-T-R	
50	B20	1.814.953	H-D-F-K-K-K-L-E-N-E-T-R-T-I-G	
51	B21	1.792.921	K-K-K-L-E-N-E-T-R-T-I-G-D-F-D	
52	B22	1.773.758	L-E-N-E-T-R-T-I-G-D-F-D-Y-D-S	
53	B23	1.774.797	E-T-R-T-I-G-D-F-D-Y-D-S-I-M-L	
54	B24	1.690.819	L-D-F-E-T-V-I-S-T-Q-D-P-I-V-D	
55	B25	1.659.803	E-T-V-I-S-T-Q-D-P-I-V-D-G-M-R	
56	B26	1.671.839	I-S-T-Q-D-P-I-V-D-G-M-R-L-V-E	
57	B27	1.674.821	I-V-D-G-M-R-L-V-E-G-D-M-L-L-D	
58	B28	1.688.764	G-M-R-L-V-E-G-D-M-L-L-D-D-E-P	
59	B29	1.721.760	L-V-E-G-D-M-L-L-D-D-E-P-F-T-E	
60	B30	1.721.746	G-D-M-L-L-D-D-E-P-F-T-E-R-N-A	
61	C 1	1.808.883	L-L-D-D-E-P-F-T-E-R-N-A-V-K-Y	
62	C 2	1.839.816	D-E-P-F-T-E-R-N-A-V-K-Y-D-E-Q	
63	C 3	1.894.910	F-T-E-R-N-A-V-K-Y-D-E-Q-L-W-P	
64	C 4	1.817.859	R-N-A-V-K-Y-D-E-Q-L-W-P-N-G-E	
65	C 5	1.851.893	V-K-Y-D-E-Q-L-W-P-N-G-E-I-V-Y	
66	C 6	1.790.825	D-E-Q-L-W-P-N-G-E-I-V-Y-E-I-S	
67	C 7	1.730.877	L-W-P-N-G-E-I-V-Y-E-I-S-Q-A-L	
68	C 8	1.734.883	N-G-E-I-V-Y-E-I-S-Q-A-L-R-P-F	
69	C 9	1.847.031	I-V-Y-E-I-S-Q-A-L-R-P-F-K-Q-R	
70	C10	1.870.043	E-I-S-Q-A-L-R-P-F-K-Q-R-I-R-E	
71	C11	1.899.063	Q-A-L-R-P-F-K-Q-R-I-R-E-A-M-R	
72	C12	1.966.021	R-P-F-K-Q-R-I-R-E-A-M-R-S-Y-E	
73	C13	1.882.921	K-Q-R-I-R-E-A-M-R-S-Y-E-D-T-T	
74	C14	1.815.802	I-R-E-A-M-R-S-Y-E-D-T-T-C-I-E	
75	C15	1.823.760	A-M-R-S-Y-E-D-T-T-C-I-E-K-D-Y	
76	C16	1.791.776	S-Y-E-D-T-T-C-I-E-K-D-Y-V-N-I	
77	C17	1.734.814	D-T-T-C-I-E-K-D-Y-V-N-I-H-K-G	
78	C18	1.791.829	C-I-E-K-D-Y-V-N-I-H-K-G-D-R-C	
79	C19	1.852.889	K-D-Y-V-N-I-H-K-G-D-R-C-Y-S-R	

80	C20	1.730.889	V-N-I-H-K-G-D-R-C-Y-S-R-V-G-K	
81	C21	1.752.837	H-K-G-D-R-C-Y-S-R-V-G-K-S-F-N	
82	C22	1.673.747	D-R-C-Y-S-R-V-G-K-S-F-N-G-G-E	
83	C23	1.637.805	Y-S-R-V-G-K-S-F-N-G-G-E-Q-P-L	
84	C24	1.502.762	V-G-K-S-F-N-G-G-E-Q-P-L-S-L-A	
85	C25	1.479.655	S-F-N-G-G-E-Q-P-L-S-L-A-T-G-C	
86	C26	1.508.671	G-G-E-Q-P-L-S-L-A-T-G-C-T-E-F	
87	C27	1.536.738	Q-P-L-S-L-A-T-G-C-T-E-F-G-T-I	
88	C28	1.577.728	S-L-A-T-G-C-T-E-F-G-T-I-L-H-E	
89	C29	1.613.740	T-G-C-T-E-F-G-T-I-L-H-E-L-G-H	
90	C30	1.595.783	T-E-F-G-T-I-L-H-E-L-G-H-S-V-G	
91	D 1	1.617.779	G-T-I-L-H-E-L-G-H-S-V-G-F-D-H	
92	D 2	1.699.759	L-H-E-L-G-H-S-V-G-F-D-H-E-H-S	
93	D 3	1.678.734	L-G-H-S-V-G-F-D-H-E-H-S-R-S-D	
94	D 4	1.771.740	S-V-G-F-D-H-E-H-S-R-S-D-R-D-E	
95	D 5	1.917.849	F-D-H-E-H-S-R-S-D-R-D-E-Y-L-I	
96	D 6	1.896.933	E-H-S-R-S-D-R-D-E-Y-L-I-I-H-K	
97	D 7	1.885.954	R-S-D-R-D-E-Y-L-I-I-H-K-E-N-V	
98	D 8	1.798.947	R-D-E-Y-L-I-I-H-K-E-N-V-V-A-T	
99	D 9	1.792.973	Y-L-I-I-H-K-E-N-V-V-A-T-K-E-H	
100	D10	1.779.879	I-H-K-E-N-V-V-A-T-K-E-H-N-F-D	
101	D11	1.828.900	E-N-V-V-A-T-K-E-H-N-F-D-K-L-W	
102	D12	1.885.932	V-A-T-K-E-H-N-F-D-K-L-W-E-N-R	
103	D13	1.972.976	K-E-H-N-F-D-K-L-W-E-N-R-T-R-T	
104	D14	1.862.928	N-F-D-K-L-W-E-N-R-T-R-T-I-G-N	
105	D15	1.911.948	K-L-W-E-N-R-T-R-T-I-G-N-F-D-Y	
106	D16	1.799.833	E-N-R-T-R-T-I-G-N-F-D-Y-D-S-I	
107	D17	1.807.834	T-R-T-I-G-N-F-D-Y-D-S-I-M-L-Y	
108	D18	1.759.863	L-L-D-D-E-P-F-T-E-R-N-A-V-K-N	
109	D19	1.847.833	D-E-P-F-T-E-R-N-A-V-K-N-D-W-Q	
110	D20	1.902.927	F-T-E-R-N-A-V-K-N-D-W-Q-L-W-P	
111	D21	1.825.875	R-N-A-V-K-N-D-W-Q-L-W-P-N-G-E	
112	D22	1.859.910	V-K-N-D-W-Q-L-W-P-N-G-E-I-V-Y	
113	D23	1.847.862	D-W-Q-L-W-P-N-G-E-I-V-Y-E-I-S	
114	D24	1.686.883	N-G-E-I-V-Y-E-I-S-Q-A-L-R-P-V	
115	D25	1.799.031	I-V-Y-E-I-S-Q-A-L-R-P-V-K-Q-R	
116	D26	1.822.043	E-I-S-Q-A-L-R-P-V-K-Q-R-I-R-E	
117	D27	1.851.063	Q-A-L-R-P-V-K-Q-R-I-R-E-A-M-R	
118	D28	1.918.021	R-P-V-K-Q-R-I-R-E-A-M-R-S-Y-E	
119	D29	1.814.854	I-R-E-A-M-R-S-Y-E-D-T-T-C-I-K	
120	D30	1.856.855	A-M-R-S-Y-E-D-T-T-C-I-K-F-R-H	
121	E 1	1.808.852	S-Y-E-D-T-T-C-I-K-F-R-H-R-G-P	
122	E 2	1.823.881	D-T-T-C-I-K-F-R-H-R-G-P-K-C-Y	LALP-LP7

123	E 3	1.848.961	C-I-K-F-R-H-R-G-P-K-C-Y-S-R-V	LALP-LP9
124	E 4	1.776.921	F-R-H-R-G-P-K-C-Y-S-R-V-G-K-S	
125	E 5	1.549.734	P-Q-P-L-S-L-G-K-G-C-T-E-Y-G-T	
126	E 6	1.590.797	L-S-L-G-K-G-C-T-E-Y-G-T-I-L-H	
127	E 7	1.576.744	G-K-G-C-T-E-Y-G-T-I-L-H-E-L-G	
128	E 8	1.657.766	C-T-E-Y-G-T-I-L-H-E-L-G-H-S-V	
129	E 9	1.615.788	Y-G-T-I-L-H-E-L-G-H-S-V-G-F-S	
130	E10	1.705.743	T-I-G-D-F-D-Y-D-S-I-M-L-Y-G-P	
131	E11	1.815.759	D-F-D-Y-D-S-I-M-L-Y-G-P-Y-A-F	
132	E12	1.768.791	Y-D-S-I-M-L-Y-G-P-Y-A-F-S-K-D	
133	E13	1.865.906	K-Q-R-I-R-E-A-M-R-S-Y-E-Q-G-D	
134	E14	1.875.825	I-R-E-A-M-R-S-Y-E-Q-G-D-R-C-Y	
135	E15	1.819.798	A-M-R-S-Y-E-Q-G-D-R-C-Y-S-R-V	
136	E16	1.733.768	S-Y-E-Q-G-D-R-C-Y-S-R-V-G-K-S	
137	E17	1.672.763	Q-G-D-R-C-Y-S-R-V-G-K-S-F-N-G	
138	E18	1.686.779	R-C-Y-S-R-V-G-K-S-F-N-G-G-E-Q	
139	E19	1.561.774	S-R-V-G-K-S-F-N-G-G-E-Q-P-L-S	
140	E20	1.504.741	G-K-S-F-N-G-G-E-Q-P-L-S-L-A-T	
141	E21	1.493.671	F-N-G-G-E-Q-P-L-S-L-A-T-G-C-T	
142	E22	1.508.671	G-E-Q-P-L-S-L-A-T-G-C-T-E-F-G	
143	E23	1.521.764	P-L-S-L-A-T-G-C-T-E-F-G-T-I-L	
144	E24	1.603.781	L-A-T-G-C-T-E-F-G-T-I-L-H-E-L	
145	E25	1.599.724	G-C-T-E-F-G-T-I-L-H-E-L-G-H-S	
146	E26	1.641.804	E-F-G-T-I-L-H-E-L-G-H-S-V-G-F	
147	E27	1.689.800	T-I-L-H-E-L-G-H-S-V-G-F-D-H-E	
148	E28	1.742.776	H-E-L-G-H-S-V-G-F-D-H-E-H-S-R	
149	E29	1.721.751	G-H-S-V-G-F-D-H-E-H-S-R-S-D-R	
150	E30	1.847.771	V-G-F-D-H-E-H-S-R-S-D-R-D-E-Y	
151	F 1	1.883.865	D-H-E-H-S-R-S-D-R-D-E-Y-L-I-I	
152	F 2	1.896.933	H-S-R-S-D-R-D-E-Y-L-I-I-H-K-E	
153	F 3	1.828.921	S-D-R-D-E-Y-L-I-I-H-K-E-N-V-V	
154	F 4	1.770.941	D-E-Y-L-I-I-H-K-E-N-V-V-A-T-K	
155	F 5	1.743.952	L-I-I-H-K-E-N-V-V-A-T-K-E-H-N	
156	F 6	1.794.890	H-K-E-N-V-V-A-T-K-E-H-N-F-D-K	
157	F 7	1.828.900	N-V-V-A-T-K-E-H-N-F-D-K-L-W-E	
158	F 8	1.887.912	A-T-K-E-H-N-F-D-K-L-W-E-N-R-T	
159	F 9	1.957.965	E-H-N-F-D-K-L-W-E-N-R-T-R-T-I	
160	F10	1.895.953	F-D-K-L-W-E-N-R-T-R-T-I-G-N-F	
161	F11	1.898.880	L-W-E-N-R-T-R-T-I-G-N-F-D-Y-D	
162	F12	1.801.831	N-R-T-R-T-I-G-N-F-D-Y-D-S-I-M	
163	F13	1.763.808	R-T-I-G-N-F-D-Y-D-S-I-M-L-Y-G	
164	F14	1.724.728	G-N-F-D-Y-D-S-I-M-L-Y-G-P-Y-A	
165	F15	1.741.743	D-Y-D-S-I-M-L-Y-G-P-Y-A-F-S-T	

166	F16	1.826.891	D-S-D-E-V-G-D-R-R-R-P-I-W-N-I
167	F17	1.837.991	E-V-G-D-R-R-R-P-I-W-N-I-A-R-T
168	F18	1.837.007	D-R-R-R-P-I-W-N-I-A-R-T-V-N-A
169	F19	1.798.937	R-P-I-W-N-I-A-R-T-V-N-A-E-Y-P
170	F20	1.791.850	W-N-I-A-R-T-V-N-A-E-Y-P-I-D-M
171	F21	1.767.839	A-R-T-V-N-A-E-Y-P-I-D-M-F-L-E
172	F22	1.710.770	V-N-A-E-Y-P-I-D-M-F-L-E-G-D-V
173	F23	1.723.790	E-Y-P-I-D-M-F-L-E-G-D-V-S-P-I
174	F24	1.605.785	I-D-M-F-L-E-G-D-V-S-P-I-G-I-T
175	F25	1.635.829	F-L-E-G-D-V-S-P-I-G-I-T-E-F-L
176	F26	1.531.766	G-D-V-S-P-I-G-I-T-E-F-L-D-L-G
177	F27	1.516.766	S-P-I-G-I-T-E-F-L-D-L-G-A-N-A
178	F28	1.573.824	G-I-T-E-F-L-D-L-G-A-N-A-I-Q-L
179	F29	1.643.866	E-F-L-D-L-G-A-N-A-I-Q-L-E-V-I
180	F30	1.603.798	D-L-G-A-N-A-I-Q-L-E-V-I-F-D-S
181	G 1	1.576.762	A-N-A-I-Q-L-E-V-I-F-D-S-S-G-N
182	G 2	1.607.757	I-Q-L-E-V-I-F-D-S-S-G-N-A-E-S
183	G 3	1.643.720	E-V-I-F-D-S-S-G-N-A-E-S-V-Y-Q
184	G 4	1.628.721	F-D-S-S-G-N-A-E-S-V-Y-Q-K-T-P
185	G 5	1.600.639	S-G-N-A-E-S-V-Y-Q-K-T-P-C-D-C
186	G 6	1.755.792	A-E-S-V-Y-Q-K-T-P-C-D-C-R-R-T
187	G 7	1.826.859	V-Y-Q-K-T-P-C-D-C-R-R-T-C-V-R
188	G 8	1.893.876	K-T-P-C-D-C-R-R-T-C-V-R-W-R-D
189	G 9	1.964.845	C-D-C-R-R-T-C-V-R-W-R-D-F-S-Y
190	G10	2.034.974	R-R-T-C-V-R-W-R-D-F-S-Y-Y-L-D
191	G11	2.005.936	C-V-R-W-R-D-F-S-Y-Y-L-D-D-L-R
192	G12	2.051.974	W-R-D-F-S-Y-Y-L-D-D-L-R-R-F-T
193	G13	1.849.889	F-S-Y-Y-L-D-D-L-R-R-F-T-T-P-G
194	G14	1.795.899	Y-L-D-D-L-R-R-F-T-T-P-G-E-L-T
195	G15	1.836.937	D-L-R-R-F-T-T-P-G-E-L-T-F-R-E
196	G16	1.807.936	R-F-T-T-P-G-E-L-T-F-R-E-E-L-I
197	G17	1.742.971	T-P-G-E-L-T-F-R-E-E-L-I-L-I-I
198	G18	1.829.044	E-L-T-F-R-E-E-L-I-L-I-I-L-D-L
199	G19	1.828.060	F-R-E-E-L-I-L-I-I-L-D-L-K-V-D
200	G20	1.713.981	E-L-I-L-I-I-L-D-L-K-V-D-G-F-N
201	G21	1.645.918	L-I-I-L-D-L-K-V-D-G-F-N-S-S-L
202	G22	1.657.809	L-D-L-K-V-D-G-F-N-S-S-L-S-Y-T
203	G23	1.572.767	K-V-D-G-F-N-S-S-L-S-Y-T-A-G-K
204	G24	1.528.741	G-F-N-S-S-L-S-Y-T-A-G-K-N-L-A
205	G25	1.580.830	S-S-L-S-Y-T-A-G-K-N-L-A-E-K-L
206	G26	1.649.851	S-Y-T-A-G-K-N-L-A-E-K-L-L-E-N
207	G27	1.775.910	A-G-K-N-L-A-E-K-L-L-E-N-Y-W-Q
208	G28	1.891.884	N-L-A-E-K-L-L-E-N-Y-W-Q-E-E-N

PLD_LLP1

209	G29	1.910.842	E-K-L-L-E-N-Y-W-Q-E-E-N-T-E-S
210	G30	1.881.802	L-E-N-Y-W-Q-E-E-N-T-E-S-N-A-R
211	H 1	1.872.817	Y-W-Q-E-E-N-T-E-S-N-A-R-A-Y-I
212	H 2	1.708.816	E-E-N-T-E-S-N-A-R-A-Y-I-L-L-S
213	H 3	1.619.841	T-E-S-N-A-R-A-Y-I-L-L-S-V-P-S
214	H 4	1.645.904	N-A-R-A-Y-I-L-L-S-V-P-S-T-K-N
215	H 5	1.559.881	A-Y-I-L-L-S-V-P-S-T-K-N-A-A-L
216	H 6	1.586.903	L-L-S-V-P-S-T-K-N-A-A-L-F-R-A
217	H 7	1.647.899	V-P-S-T-K-N-A-A-L-F-R-A-F-N-L
218	H 8	1.706.936	T-K-N-A-A-L-F-R-A-F-N-L-T-L-Q
219	H 9	1.591.836	A-A-L-F-R-A-F-N-L-T-L-Q-N-G-G
220	H10	1.625.820	F-R-A-F-N-L-T-L-Q-N-G-G-F-A-A
221	H11	1.600.741	F-N-L-T-L-Q-N-G-G-F-A-A-Y-G-E
222	H12	1.510.731	T-L-Q-N-G-G-F-A-A-Y-G-E-K-V-G
223	H13	1.542.736	N-G-G-F-A-A-Y-G-E-K-V-G-I-N-F
224	H14	1.629.756	F-A-A-Y-G-E-K-V-G-I-N-F-A-E-D
225	H15	1.683.752	Y-G-E-K-V-G-I-N-F-A-E-D-D-D-L
226	H16	1.667.793	K-V-G-I-N-F-A-E-D-D-D-L-F-S-V
227	H17	1.739.826	I-N-F-A-E-D-D-D-L-F-S-V-S-R-I
228	H18	1.734.843	A-E-D-D-D-L-F-S-V-S-R-I-V-N-R
229	H19	1.690.889	D-D-L-F-S-V-S-R-I-V-N-R-L-G-T
230	H20	1.588.894	F-S-V-S-R-I-V-N-R-L-G-T-A-G-L
231	H21	1.677.932	S-R-I-V-N-R-L-G-T-A-G-L-H-V-W
232	H22	1.623.837	V-N-R-L-G-T-A-G-L-H-V-W-Q-S-S
233	H23	1.567.825	L-G-T-A-G-L-H-V-W-Q-S-S-V-I-T
234	H24	1.626.808	A-G-L-H-V-W-Q-S-S-V-I-T-N-C-L
235	H25	1.783.893	H-V-W-Q-S-S-V-I-T-N-C-L-L-R-E
236	H26	1.691.804	Q-S-S-V-I-T-N-C-L-L-R-E-N-S-E
237	H27	1.704.824	V-I-T-N-C-L-L-R-E-N-S-E-L-S-D
238	H28	1.689.788	N-C-L-L-R-E-N-S-E-L-S-D-A-V-Q
239	H29	1.759.823	L-R-E-N-S-E-L-S-D-A-V-Q-E-R-D
240	H30	1.633.707	N-S-E-L-S-D-A-V-Q-E-R-D-S-Q-G
241	I 1	1.711.736	L-S-D-A-V-Q-E-R-D-S-Q-G-Y-M-N
242	I 2	1.786.820	A-V-Q-E-R-D-S-Q-G-Y-M-N-K-V-Y
243	I 3	1.803.835	E-R-D-S-Q-G-Y-M-N-K-V-Y-T-L-T
244	I 4	1.745.830	S-Q-G-Y-M-N-K-V-Y-T-L-T-A-D-R
245	I 5	1.782.861	Y-M-N-K-V-Y-T-L-T-A-D-R-H-A-T
246	I 6	1.757.943	K-V-Y-T-L-T-A-D-R-H-A-T-I-R-N
247	I 7	1.707.938	T-L-T-A-D-R-H-A-T-I-R-N-A-L-R
248	I 8	1.649.896	A-D-R-H-A-T-I-R-N-A-L-R-A-S-V
249	I 9	1.578.848	H-A-T-I-R-N-A-L-R-A-S-V-D-G-V
250	I10	1.615.835	I-R-N-A-L-R-A-S-V-D-G-V-M-T-N
251	I11	1.590.771	A-L-R-A-S-V-D-G-V-M-T-N-F-P-N

252	I12	1.589.686	A-S-V-D-G-V-M-T-N-F-P-N-H-M-A	
253	I13	1.659.727	D-G-V-M-T-N-F-P-N-H-M-A-D-V-L	
254	I14	1.759.791	M-T-N-F-P-N-H-M-A-D-V-L-K-E-N	
255	I15	1.817.866	F-P-N-H-M-A-D-V-L-K-E-N-E-F-K	
256	I16	1.849.892	H-M-A-D-V-L-K-E-N-E-F-K-D-K-F	
257	I17	1.822.972	D-V-L-K-E-N-E-F-K-D-K-F-K-L-A	
258	I18	1.874.930	K-E-N-E-F-K-D-K-F-K-L-A-T-Y-D	
259	I19	1.829.873	E-F-K-D-K-F-K-L-A-T-Y-D-D-N-P	
260	I20	1.840.888	D-K-F-K-L-A-T-Y-D-D-N-P-W-K-T	
261	I21	1.841.873	K-L-A-T-Y-D-D-N-P-W-K-T-Y-V-E	
262	I22	1.888.789	T-Y-D-D-N-P-W-K-T-Y-V-E-E-T-E	
263	I23	1.810.779	D-N-P-W-K-T-Y-V-E-E-T-E-D-V-S	
264	I24	1.840.826	W-K-T-Y-V-E-E-T-E-D-V-S-N-E-L	
265	I25	1.754.726	Y-V-E-E-T-E-D-V-S-N-E-L-D-V-D	
266	I26	1.691.690	E-T-E-D-V-S-N-E-L-D-V-D-D-V-N	
267	I27	1.704.685	D-V-S-N-E-L-D-V-D-D-V-N-N-E-E	
268	I28	1.699.842	G-T-E-A-I-K-S-A-D-E-R-Q-P-I-W	
269	I29	1.710.894	A-I-K-S-A-D-E-R-Q-P-I-W-N-I-A	
270	I30	1.742.830	S-A-D-E-R-Q-P-I-W-N-I-A-N-M-V	
271	J 1	1.798.893	E-R-Q-P-I-W-N-I-A-N-M-V-T-D-I	
272	J 2	1.740.876	P-I-W-N-I-A-N-M-V-T-D-I-N-Q-I	
273	J 3	1.688.793	N-I-A-N-M-V-T-D-I-N-Q-I-N-E-T	
274	J 4	1.731.824	N-M-V-T-D-I-N-Q-I-N-E-T-L-D-L	
275	J 5	1.629.774	T-D-I-N-Q-I-N-E-T-L-D-L-G-A-N	
276	J 6	1.629.774	N-Q-I-N-E-T-L-D-L-G-A-N-S-I-E	
277	J 7	1.589.731	N-E-T-L-D-L-G-A-N-S-I-E-T-D-V	
278	J 8	1.608.741	L-D-L-G-A-N-S-I-E-T-D-V-T-F-D	
279	J 9	1.540.642	G-A-N-S-I-E-T-D-V-T-F-D-D-G-T	
280	J10	1.557.639	S-I-E-T-D-V-T-F-D-D-G-T-M-A-G	
281	J11	1.655.655	T-D-V-T-F-D-D-G-T-M-A-G-Y-T-Y	
282	J12	1.625.644	T-F-D-D-G-T-M-A-G-Y-T-Y-E-G-V	
283	J13	1.549.632	D-G-T-M-A-G-Y-T-Y-E-G-V-L-C-A	
284	J14	1.523.598	M-A-G-Y-T-Y-E-G-V-L-C-A-C-S-G	
285	J15	1.555.588	Y-T-Y-E-G-V-L-C-A-C-S-G-S-C-T	
286	J16	1.515.644	E-G-V-L-C-A-C-S-G-S-C-T-K-K-M	
287	J17	1.514.660	L-C-A-C-S-G-S-C-T-K-K-M-N-I-G	
288	J18	1.616.725	C-S-G-S-C-T-K-K-M-N-I-G-E-F-L	
289	J19	1.676.827	S-C-T-K-K-M-N-I-G-E-F-L-H-G-L	
290	J20	1.797.009	K-K-M-N-I-G-E-F-L-H-G-L-R-R-V	
291	J21	1.708.926	N-I-G-E-F-L-H-G-L-R-R-V-T-T-P	
292	J22	1.693.879	E-F-L-H-G-L-R-R-V-T-T-P-G-D-P	
293	J23	1.754.889	H-G-L-R-R-V-T-T-P-G-D-P-M-Y-R	
294	J24	1.817.946	R-R-V-T-T-P-G-D-P-M-Y-R-K-E-L	PLD_LL3

295	J25	1.689.865	T-T-P-G-D-P-M-Y-R-K-E-L-A-L-V
296	J26	1.750.897	G-D-P-M-Y-R-K-E-L-A-L-V-V-F-N
297	J27	1.824.022	M-Y-R-K-E-L-A-L-V-V-F-N-L-K-T
298	J28	1.722.945	K-E-L-A-L-V-V-F-N-L-K-T-S-D-F
299	J29	1.623.840	A-L-V-V-F-N-L-K-T-S-D-F-S-P-S
300	J30	1.675.798	V-F-N-L-K-T-S-D-F-S-P-S-T-A-Y
301	K 1	1.588.715	L-K-T-S-D-F-S-P-S-T-A-Y-E-S-G
302	K 2	1.655.637	S-D-F-S-P-S-T-A-Y-E-S-G-M-M-F
303	K 3	1.548.648	S-P-S-T-A-Y-E-S-G-M-M-F-G-G-K
304	K 4	1.631.758	T-A-Y-E-S-G-M-M-F-G-G-K-L-L-Q
305	K 5	1.758.836	E-S-G-M-M-F-G-G-K-L-L-Q-I-Y-W
306	K 6	1.713.826	M-M-F-G-G-K-L-L-Q-I-Y-W-N-G-G
307	K 7	1.662.862	G-G-K-L-L-Q-I-Y-W-N-G-G-K-T-E
308	K 8	1.807.929	L-L-Q-I-Y-W-N-G-G-K-T-E-R-K-C
309	K 9	1.778.866	I-Y-W-N-G-G-K-T-E-R-K-C-D-P-I
310	K10	1.614.840	N-G-G-K-T-E-R-K-C-D-P-I-K-G-I
311	K11	1.671.923	K-T-E-R-K-C-D-P-I-K-G-I-V-V-S
312	K12	1.698.909	R-K-C-D-P-I-K-G-I-V-V-S-R-N-D
313	K13	1.553.841	D-P-I-K-G-I-V-V-S-R-N-D-G-G-K
314	K14	1.575.862	K-G-I-V-V-S-R-N-D-G-G-K-A-Y-I
315	K15	1.590.862	V-V-S-R-N-D-G-G-K-A-Y-I-I-I-S
316	K16	1.630.857	R-N-D-G-G-K-A-Y-I-I-I-S-I-P-D
317	K17	1.650.876	G-G-K-A-Y-I-I-I-S-I-P-D-I-E-Y
318	K18	1.773.912	A-Y-I-I-I-S-I-P-D-I-E-Y-F-A-F
319	K19	1.683.865	I-I-S-I-P-D-I-E-Y-F-A-F-I-S-G
320	K20	1.801.929	I-P-D-I-E-Y-F-A-F-I-S-G-F-R-K
321	K21	1.819.940	I-E-Y-F-A-F-I-S-G-F-R-K-T-L-E
322	K22	1.685.903	F-A-F-I-S-G-F-R-K-T-L-E-I-T-G
323	K23	1.692.857	I-S-G-F-R-K-T-L-E-I-T-G-N-E-E
324	K24	1.732.925	F-R-K-T-L-E-I-T-G-N-E-E-I-L-A
325	K25	1.613.851	T-L-E-I-T-G-N-E-E-I-L-A-R-V-G
326	K26	1.661.851	I-T-G-N-E-E-I-L-A-R-V-G-Y-E-V
327	K27	1.648.795	N-E-E-I-L-A-R-V-G-Y-E-V-S-G-N
328	K28	1.715.877	I-L-A-R-V-G-Y-E-V-S-G-N-Y-Y-L
329	K29	1.701.862	R-V-G-Y-E-V-S-G-N-Y-Y-L-G-L-I
330	K30	1.712.794	Y-E-V-S-G-N-Y-Y-L-G-L-I-H-D-A
331	L 1	1.718.899	S-G-N-Y-Y-L-G-L-I-H-D-A-L-R-K
332	L 2	1.687.930	Y-Y-L-G-L-I-H-D-A-L-R-K-A-G-V
333	L 3	1.647.942	G-L-I-H-D-A-L-R-K-A-G-V-K-D-R
334	L 4	1.729.923	H-D-A-L-R-K-A-G-V-K-D-R-E-H-V
335	L 5	1.807.969	L-R-K-A-G-V-K-D-R-E-H-V-W-Q-S
336	L 6	1.695.822	A-G-V-K-D-R-E-H-V-W-Q-S-D-G-I
337	L 7	1.786.795	K-D-R-E-H-V-W-Q-S-D-G-I-T-N-C

338	L 8	1.753.810	E-H-V-W-Q-S-D-G-I-T-N-C-I-P-R	PLD_LL4
339	L 9	1.730.794	W-Q-S-D-G-I-T-N-C-I-P-R-D-L-N	
340	L10	1.684.834	D-G-I-T-N-C-I-P-R-D-L-N-L-I-E	
341	L11	1.698.850	T-N-C-I-P-R-D-L-N-L-I-E-E-A-V	
342	L12	1.778.989	I-P-R-D-L-N-L-I-E-E-A-V-K-N-R	
343	L13	1.711.863	D-L-N-L-I-E-E-A-V-K-N-R-D-S-P	
344	L14	1.704.821	L-I-E-E-A-V-K-N-R-D-S-P-D-G-Y	
345	L15	1.704.832	E-A-V-K-N-R-D-S-P-D-G-Y-I-N-K	
346	L16	1.804.875	K-N-R-D-S-P-D-G-Y-I-N-K-V-Y-H	
347	L17	1.707.799	D-S-P-D-G-Y-I-N-K-V-Y-H-S-T-I	
348	L18	1.780.852	D-G-Y-I-N-K-V-Y-H-S-T-I-E-D-K	
349	L19	1.700.899	I-N-K-V-Y-H-S-T-I-E-D-K-A-A-I	
350	L20	1.618.773	V-Y-H-S-T-I-E-D-K-A-A-I-S-D-A	
351	L21	1.518.730	S-T-I-E-D-K-A-A-I-S-D-A-L-D-A	
352	L22	1.488.683	E-D-K-A-A-I-S-D-A-L-D-A-G-V-D	
353	L23	1.399.708	A-A-I-S-D-A-L-D-A-G-V-D-G-I-I	
354	L24	1.515.742	S-D-A-L-D-A-G-V-D-G-I-I-S-Q-R	
355	L25	1.585.766	L-D-A-G-V-D-G-I-I-S-Q-R-P-D-M	
356	L26	1.675.813	G-V-D-G-I-I-S-Q-R-P-D-M-I-F-E	
357	L27	1.729.933	G-I-I-S-Q-R-P-D-M-I-F-E-V-L-L	
358	L28	1.832.898	S-Q-R-P-D-M-I-F-E-V-L-L-D-D-R	
359	L29	1.835.902	P-D-M-I-F-E-V-L-L-D-D-R-F-I-N	
360	L30	1.952.052	I-F-E-V-L-L-D-D-R-F-I-N-R-F-R	
361	M 1	1.848.026	V-L-L-D-D-R-F-I-N-R-F-R-L-A-T	
362	M 2	1.853.891	D-D-R-F-I-N-R-F-R-L-A-T-S-E-D	
363	M 3	1.864.911	F-I-N-R-F-R-L-A-T-S-E-D-N-P-W	
364	M 4	1.822.864	R-F-R-L-A-T-S-E-D-N-P-W-A-N-F	
365	M 5	1.756.875	K-Q-D-G-I-E-R-T-D-S-G-R-P-I-W	
366	M 6	1.683.858	G-I-E-R-T-D-S-G-R-P-I-W-N-I-A	
367	M 7	1.751.878	R-T-D-S-G-R-P-I-W-N-I-A-H-M-V	
368	M 8	1.736.867	S-G-R-P-I-W-N-I-A-H-M-V-N-D-K	
369	M 9	1.719.902	P-I-W-N-I-A-H-M-V-N-D-K-G-L-I	
370	M10	1.730.819	N-I-A-H-M-V-N-D-K-G-L-I-D-E-Y	
371	M11	1.687.813	H-M-V-N-D-K-G-L-I-D-E-Y-L-A-A	
372	M12	1.562.747	N-D-K-G-L-I-D-E-Y-L-A-A-G-A-N	
373	M13	1.520.725	G-L-I-D-E-Y-L-A-A-G-A-N-S-V-E	
374	M14	1.538.663	D-E-Y-L-A-A-G-A-N-S-V-E-S-D-V	
375	M15	1.480.657	L-A-A-G-A-N-S-V-E-S-D-V-S-F-D	
376	M16	1.511.590	G-A-N-S-V-E-S-D-V-S-F-D-D-N-G	
377	M17	1.625.677	S-V-E-S-D-V-S-F-D-D-N-G-K-P-M	
378	M18	1.722.756	S-D-V-S-F-D-D-N-G-K-P-M-K-F-H	
379	M19	1.771.810	S-F-D-D-N-G-K-P-M-K-F-H-H-G-R	
380	M20	1.737.772	D-N-G-K-P-M-K-F-H-H-G-R-P-C-D	

381	M21	1.767.812	K-P-M-K-F-H-H-G-R-P-C-D-C-G-R
382	M22	1.743.703	K-F-H-H-G-R-P-C-D-C-G-R-N-C-D
383	M23	1.746.681	H-G-R-P-C-D-C-G-R-N-C-D-R-Q-M
384	M24	1.731.648	P-C-D-C-G-R-N-C-D-R-Q-M-S-F-T
385	M25	1.807.733	C-G-R-N-C-D-R-Q-M-S-F-T-D-Y-L
386	M26	1.900.732	N-C-D-R-Q-M-S-F-T-D-Y-L-D-Y-M
387	M27	1.965.897	R-Q-M-S-F-T-D-Y-L-D-Y-M-R-Q-L
388	M28	1.849.845	S-F-T-D-Y-L-D-Y-M-R-Q-L-T-T-P
389	M29	1.787.793	D-Y-L-D-Y-M-R-Q-L-T-T-P-G-T-D
390	M30	1.742.749	D-Y-M-R-Q-L-T-T-P-G-T-D-N-T-M
391	N 1	1.765.831	R-Q-L-T-T-P-G-T-D-N-T-M-F-R-E
392	N 2	1.708.798	T-T-P-G-T-D-N-T-M-F-R-E-N-L-I
393	N 3	1.766.858	G-T-D-N-T-M-F-R-E-N-L-I-L-I-M
394	N 4	1.868.942	N-T-M-F-R-E-N-L-I-L-I-M-L-D-F
395	N 5	1.892.085	F-R-E-N-L-I-L-I-M-L-D-F-K-L-K
396	N 6	1.788.084	N-L-I-L-I-M-L-D-F-K-L-K-K-L-S
397	N 7	1.758.037	L-I-M-L-D-F-K-L-K-K-L-S-P-N-V
398	N 8	1.735.976	L-D-F-K-L-K-K-L-S-P-N-V-A-Y-T
399	N 9	1.616.914	K-L-K-K-L-S-P-N-V-A-Y-T-A-G-Q
400	N10	1.546.788	K-L-S-P-N-V-A-Y-T-A-G-Q-E-V-A
401	N11	1.591.719	P-N-V-A-Y-T-A-G-Q-E-V-A-N-Q-M
402	N12	1.610.714	A-Y-T-A-G-Q-E-V-A-N-Q-M-L-D-T
403	N13	1.752.803	A-G-Q-E-V-A-N-Q-M-L-D-T-Y-W-K
404	N14	1.837.903	E-V-A-N-Q-M-L-D-T-Y-W-K-R-G-K
405	N15	1.825.867	N-Q-M-L-D-T-Y-W-K-R-G-K-S-E-A
406	N16	1.842.927	L-D-T-Y-W-K-R-G-K-S-E-A-R-A-Y
407	N17	1.872.989	Y-W-K-R-G-K-S-E-A-R-A-Y-F-V-L
408	N18	1.692.920	R-G-K-S-E-A-R-A-Y-F-V-L-S-I-P
409	N19	1.679.914	S-E-A-R-A-Y-F-V-L-S-I-P-S-I-K
410	N20	1.678.966	R-A-Y-F-V-L-S-I-P-S-I-K-K-A-S
411	N21	1.634.965	F-V-L-S-I-P-S-I-K-K-A-S-F-A-K
412	N22	1.642.897	S-I-P-S-I-K-K-A-S-F-A-K-G-F-Y
413	N23	1.701.934	S-I-K-K-A-S-F-A-K-G-F-Y-D-K-L
414	N24	1.703.841	K-A-S-F-A-K-G-F-Y-D-K-L-N-S-E
415	N25	1.736.794	F-A-K-G-F-Y-D-K-L-N-S-E-G-F-D
416	N26	1.837.816	G-F-Y-D-K-L-N-S-E-G-F-D-Q-Y-R
417	N27	1.826.869	D-K-L-N-S-E-G-F-D-Q-Y-R-E-K-V
418	N28	1.741.780	N-S-E-G-F-D-Q-Y-R-E-K-V-G-V-D
419	N29	1.702.784	G-F-D-Q-Y-R-E-K-V-G-V-D-F-S-G
420	N30	1.697.790	Q-Y-R-E-K-V-G-V-D-F-S-G-N-E-A
421	O 1	1.583.699	E-K-V-G-V-D-F-S-G-N-E-A-F-A-D
422	O 2	1.555.679	G-V-D-F-S-G-N-E-A-F-A-D-T-R-A
423	O 3	1.585.726	F-S-G-N-E-A-F-A-D-T-R-A-T-L-S

424	O 4	1.608.763	N-E-A-F-A-D-T-R-A-T-L-S-S-L-N	
425	O 5	1.621.820	F-A-D-T-R-A-T-L-S-S-L-N-I-V-D	
426	O 6	1.724.910	T-R-A-T-L-S-S-L-N-I-V-D-H-I-W	
427	O 7	1.726.842	T-L-S-S-L-N-I-V-D-H-I-W-Q-S-D	
428	O 8	1.696.831	S-L-N-I-V-D-H-I-W-Q-S-D-G-I-T	
429	O 9	1.712.808	I-V-D-H-I-W-Q-S-D-G-I-T-N-C-L	
430	O10	1.752.826	H-I-W-Q-S-D-G-I-T-N-C-L-P-R-N	
431	O11	1.731.840	Q-S-D-G-I-T-N-C-L-P-R-N-M-K-R	
432	O12	1.770.996	G-I-T-N-C-L-P-R-N-M-K-R-L-K-K	
433	O13	1.798.044	N-C-L-P-R-N-M-K-R-L-K-K-A-V-K	
434	O14	1.868.078	P-R-N-M-K-R-L-K-K-A-V-K-E-R-D	
435	O15	1.758.978	M-K-R-L-K-K-A-V-K-E-R-D-S-N-G	
436	O16	1.736.913	L-K-K-A-V-K-E-R-D-S-N-G-Y-M-V	
437	O17	1.757.866	A-V-K-E-R-D-S-N-G-Y-M-V-K-V-Y	
438	O18	1.846.820	E-R-D-S-N-G-Y-M-V-K-V-Y-N-W-S	
439	O19	1.788.839	S-N-G-Y-M-V-K-V-Y-N-W-S-V-D-K	
440	O20	1.895.902	Y-M-V-K-V-Y-N-W-S-V-D-K-Y-T-T	
441	O21	1.917.966	K-V-Y-N-W-S-V-D-K-Y-T-T-M-R-K	
442	O22	1.895.993	N-W-S-V-D-K-Y-T-T-M-R-K-V-L-R	
443	O23	1.707.934	V-D-K-Y-T-T-M-R-K-V-L-R-A-G-A	
444	O24	1.668.833	Y-T-T-M-R-K-V-L-R-A-G-A-D-G-M	
445	O25	1.631.849	M-R-K-V-L-R-A-G-A-D-G-M-I-T-N	
446	O26	1.517.755	V-L-R-A-G-A-D-G-M-I-T-N-F-P-G	
447	O27	1.517.755	A-G-A-D-G-M-I-T-N-F-P-G-R-L-V	
448	O28	1.617.844	D-G-M-I-T-N-F-P-G-R-L-V-S-V-L	
449	O29	1.713.942	I-T-N-F-P-G-R-L-V-S-V-L-N-E-R	
450	O30	1.748.910	F-P-G-R-L-V-S-V-L-N-E-R-E-F-S	
451	P 1	1.779.952	R-L-V-S-V-L-N-E-R-E-F-S-G-K-F	
452	P 2	1.751.921	S-V-L-N-E-R-E-F-S-G-K-F-R-L-A	
453	P 3	1.787.884	N-E-R-E-F-S-G-K-F-R-L-A-T-Y-A	
454	P 4	1.714.820	E-F-S-G-K-F-R-L-A-T-Y-A-D-N-P	
455	P 5	1.822.900	G-K-F-R-L-A-T-Y-A-D-N-P-W-E-R	
456	P 6	1.769.877	S-V-L-N-E-R-E-F-S-G-K-F-R-M-A	
457	P 7	1.849.831	N-E-R-E-F-S-G-K-F-R-M-A-T-Y-D	
458	P 8	1.776.767	E-F-S-G-K-F-R-M-A-T-Y-D-D-N-P	PLD_ILLP5
459	P 9	1.856.841	G-K-F-R-M-A-T-Y-D-D-N-P-W-E-K	
460	P10	1.704.919	V-C-G-V-D-S-T-Q-K-Q-K-K-R-T	
461	P11	1.836.995	V-D-S-T-Q-K-Q-K-K-R-T-Y-V-E	
462	P12	1.892.037	T-Q-K-Q-K-K-R-T-Y-V-E-L-D-Q	
463	P13	1.848.995	Q-K-K-K-R-T-Y-V-E-L-D-Q-L-S-N	SERINE_ILLP
464	P14	1.775.931	K-R-T-Y-V-E-L-D-Q-L-S-N-I-P-T	
465	P15	1.717.903	Y-V-E-L-D-Q-L-S-N-I-P-T-T-L-L	
466	P16	1.737.999	L-D-Q-L-S-N-I-P-T-T-L-L-V-R-R	

467	P17	1.734.052	L-S-N-I-P-T-T-L-L-V-R-R-R-P-V	
468	P18	1.805.089	I-P-T-T-L-L-V-R-R-R-P-V-K-Q-E	
469	P19	1.822.079	T-L-L-V-R-R-R-P-V-K-Q-E-A-K-E	
470	P20	1.927.075	V-R-R-R-P-V-K-Q-E-A-K-E-E-F-R	
471	P21	1.828.021	R-P-V-K-Q-E-A-K-E-E-F-R-I-A-K	
472	P22	1.800.962	K-Q-E-A-K-E-E-F-R-I-A-K-P-D-I	
473	P23	1.744.925	A-K-E-E-F-R-I-A-K-P-D-I-I-E-S	
474	P24	1.675.867	E-F-R-I-A-K-P-D-I-I-E-S-T-A-S	
475	P25	1.673.855	I-A-K-P-D-I-I-E-S-T-A-S-F-P-W	
476	P26	1.761.926	I-K-E-G-Q-L-T-N-Y-T-A-Q-Q-R-I	
477	P27	1.825.900	G-Q-L-T-N-Y-T-A-Q-Q-R-I-W-F-T	
478	P28	1.854.901	T-N-Y-T-A-Q-Q-R-I-W-F-T-N-G-R	
479	P29	1.846.933	T-A-Q-Q-R-I-W-F-T-N-G-R-L-Q-E	
480	P30	1.887.012	Q-R-I-W-F-T-N-G-R-L-Q-E-A-L-R	
481	Q 1	1.787.932	W-F-T-N-G-R-L-Q-E-A-L-R-V-A-Q	
482	Q 2	1.649.921	N-G-R-L-Q-E-A-L-R-V-A-Q-P-K-A	
483	Q 3	1.755.004	L-Q-E-A-L-R-V-A-Q-P-K-A-R-I-Y	
484	Q 4	1.758.019	A-L-R-V-A-Q-P-K-A-R-I-Y-P-Y-I	
485	Q 5	1.781.935	V-A-Q-P-K-A-R-I-Y-P-Y-I-N-Y-S	
486	Q 6	1.825.998	P-K-A-R-I-Y-P-Y-I-N-Y-S-I-K-T	
487	Q 7	1.848.916	R-I-Y-P-Y-I-N-Y-S-I-K-T-G-M-M	
488	Q 8	1.741.831	P-Y-I-N-Y-S-I-K-T-G-M-M-V-P-E	
489	Q 9	1.743.810	N-Y-S-I-K-T-G-M-M-V-P-E-V-E-F	
490	Q10	1.820.921	I-K-T-G-M-M-V-P-E-V-E-F-W-R-V	HYALU_LL2
491	Q11	1.808.830	G-M-M-V-P-E-V-E-F-W-R-V-M-A-Q	
492	Q12	1.760.881	V-P-E-V-E-F-W-R-V-M-A-Q-I-A-S	
493	Q13	1.736.863	V-E-F-W-R-V-M-A-Q-I-A-S-L-G-M	
494	Q14	1.604.769	W-R-V-M-A-Q-I-A-S-L-G-M-D-G-A	
495	Q15	1.561.752	M-A-Q-I-A-S-L-G-M-D-G-A-V-I-W	
496	Q16	1.462.702	I-A-S-L-G-M-D-G-A-V-I-W-G-S-S	
497	Q17	1.464.681	L-G-M-D-G-A-V-I-W-G-S-S-S-V	
498	Q18	1.435.683	D-G-A-V-I-W-G-S-S-S-S-V-G-S-K	
499	Q19	1.571.754	V-I-W-G-S-S-S-S-V-G-S-K-I-Y-C	
500	Q20	1.485.702	G-S-S-S-S-V-G-S-K-I-Y-C-A-Q-L	
501	Q21	1.658.859	S-S-V-G-S-K-I-Y-C-A-Q-L-L-K-Y	
502	Q22	1.698.890	G-S-K-I-Y-C-A-Q-L-L-K-Y-I-A-E	
503	Q23	1.695.916	I-Y-C-A-Q-L-L-K-Y-I-A-E-V-L-G	
504	Q24	1.585.897	A-Q-L-L-K-Y-I-A-E-V-L-G-P-A-T	
505	Q25	1.716.861	E-V-K-L-G-D-I-L-Q-I-S-E-R-D-C	
506	Q26	1.764.897	L-G-D-I-L-Q-I-S-E-R-D-C-I-K-Y	
507	Q27	1.777.929	I-L-Q-I-S-E-R-D-C-I-K-Y-G-Q-L	SICARITOXI
508	Q28	1.739.834	I-S-E-R-D-C-I-K-Y-G-Q-L-C-G-R	
509	Q29	1.701.808	R-D-C-I-K-Y-G-Q-L-C-G-R-P-H-G	

510	Q30	1.624.840	I-K-Y-G-Q-L-C-G-R-P-H-G-L-P-S	SICARITOXI2
511	R 1	1.540.659	G-Q-L-C-G-R-P-H-G-L-P-S-N-C-C	
512	R 2	1.600.622	C-G-R-P-H-G-L-P-S-N-C-C-G-D-W	
513	R 3	1.640.671	P-H-G-L-P-S-N-C-C-G-D-W-K-N-N	
514	R 4	1.665.670	L-P-S-N-C-C-G-D-W-K-N-N-G-R-C	
515	R 5	1.659.590	N-C-C-G-D-W-K-N-N-G-R-C-S-C-T	
516	R 6	1.639.651	G-D-W-K-N-N-G-R-C-S-C-T-G-G-W	
517	R 7	1.615.637	K-N-N-G-R-C-S-C-T-G-G-W-C-K-C	
518	R 8	1.642.720	G-R-C-S-C-T-G-G-W-C-K-C-R-K-V	
519	R 9	1.707.837	S-C-T-G-G-W-C-K-C-R-K-V-P-K-R	
520	R10	1.889.905	Q-I-Y-T-L-Q-I-Q-Q-D-I-D-H-F-E	
521	R11	1.826.869	T-L-Q-I-Q-Q-D-I-D-H-F-E-N-L-N	
522	R12	1.856.898	I-Q-Q-D-I-D-H-F-E-N-L-N-M-K-I	
523	R13	1.762.824	D-I-D-H-F-E-N-L-N-M-K-I-G-A-F	
524	R14	1.730.907	H-F-E-N-L-N-M-K-I-G-A-F-V-L-V	
525	R15	1.644.953	N-L-N-M-K-I-G-A-F-V-L-V-T-L-L	
526	R16	1.572.957	M-K-I-G-A-F-V-L-V-T-L-L-V-A-V	
527	R17	1.501.883	G-A-F-V-L-V-T-L-L-V-A-V-C-V-V	
528	R18	1.527.884	V-L-V-T-L-L-V-A-V-C-V-V-T-A-E	
529	R19	1.556.910	T-L-L-V-A-V-C-V-V-T-A-E-V-K-L	
530	R20	1.514.827	V-A-V-C-V-V-T-A-E-V-K-L-G-D-I	
531	R21	1.599.880	C-V-V-T-A-E-V-K-L-G-D-I-L-Q-I	
532	R22	1.670.909	T-A-E-V-K-L-G-D-I-L-Q-I-S-E-R	
533	R23	1.700.902	V-K-L-G-D-I-L-Q-I-S-E-R-D-C-I	
534	R24	1.708.834	G-D-I-L-Q-I-S-E-R-D-C-I-K-Y-G	
535	R25	1.767.854	L-Q-I-S-E-R-D-C-I-K-Y-G-Q-L-C	
536	R26	1.723.802	S-E-R-D-C-I-K-Y-G-Q-L-C-G-R-P	
537	R27	1.658.791	D-C-I-K-Y-G-Q-L-C-G-R-P-H-G-L	
538	R28	1.625.799	K-Y-G-Q-L-C-G-R-P-H-G-L-P-S-N	
539	R29	1.540.659	Q-L-C-G-R-P-H-G-L-P-S-N-C-C-G	
540	R30	1.625.708	G-R-P-H-G-L-P-S-N-C-C-G-D-W-K	
541	S 1	1.600.640	H-G-L-P-S-N-C-C-G-D-W-K-N-N-G	LLPTI3
542	S 2	1.503.597	C-H-G-E-G-S-K-G-C-A-T-K-P-D-D	
543	S 3	1.598.605	E-G-S-K-G-C-A-T-K-P-D-D-W-C-C	
544	S 4	1.682.747	K-G-C-A-T-K-P-D-D-W-C-C-K-K-T	
545	S 5	1.722.778	A-T-K-P-D-D-W-C-C-K-K-T-P-C-K	
546	S 6	1.693.697	P-D-D-W-C-C-K-K-T-P-C-K-C-P-A	
547	S 7	1.754.729	W-C-C-K-K-T-P-C-K-C-P-A-W-S-D	
548	S 8	1.679.754	K-K-T-P-C-K-C-P-A-W-S-D-T-S-E	
549	S 9	1.684.636	P-C-K-C-P-A-W-S-D-T-S-E-C-R-C	
550	S10	1.670.601	C-P-A-W-S-D-T-S-E-C-R-C-A-Q-D	
551	S11	1.745.645	W-S-D-T-S-E-C-R-C-A-Q-D-C-S-R	
552	S12	1.744.711	T-S-E-C-R-C-A-Q-D-C-S-R-R-C-K	

553	S13	1.768.807	C-R-C-A-Q-D-C-S-R-R-C-K-G-K-R	
554	S14	1.703.892	A-Q-D-C-S-R-R-C-K-G-K-R-A-L-L	
555	S15	1.684.959	C-S-R-R-C-K-G-K-R-A-L-L-V-P-V	
556	S16	1.705.966	R-C-K-G-K-R-A-L-L-V-P-V-E-T-H	
557	S17	1.701.030	G-K-R-A-L-L-V-P-V-E-T-H-R-L-L	
558	S18	1.732.977	A-L-L-V-P-V-E-T-H-R-L-L-F-P-E	
559	S19	1.862.993	V-P-V-E-T-H-R-L-L-F-P-E-Q-W-L	
560	S20	1.930.947	E-T-H-R-L-L-F-P-E-Q-W-L-T-F-D	
561	S21	1.918.024	R-L-L-F-P-E-Q-W-L-T-F-D-I-Q-I	
562	S22	1.863.941	F-P-E-Q-W-L-T-F-D-I-Q-I-R-T-A	
563	S23	1.863.952	V-P-V-E-T-H-R-L-L-F-P-E-Q-W-N	
564	S24	1.943.942	E-T-H-R-L-L-F-P-E-Q-W-N-F-D-I	
565	S25	1.987.972	R-L-L-F-P-E-Q-W-N-F-D-I-T-Y-F	
566	S26	1.973.957	F-P-E-Q-W-N-F-D-I-T-Y-F-R-V-L	
567	S27	1.969.994	Q-W-N-F-D-I-T-Y-F-R-V-L-Q-Q-I	
568	S28	1.896.076	F-D-I-T-Y-F-R-V-L-Q-Q-I-K-L-L	
569	S29	1.816.086	T-Y-F-R-V-L-Q-Q-I-K-L-L-V-P-V	
570	S30	1.772.056	R-V-L-Q-Q-I-K-L-L-V-P-V-E-T-H	
571	T 1	1.806.941	E-K-E-K-Y-D-P-I-G-F-R-D-V-I-V	
572	T 2	1.718.924	K-Y-D-P-I-G-F-R-D-V-I-V-Q-G-L	
573	T 3	1.613.867	P-I-G-F-R-D-V-I-V-Q-G-L-T-E-A	
574	T 4	1.605.789	F-R-D-V-I-V-Q-G-L-T-E-A-G-S-D	
575	T 5	1.557.778	V-I-V-Q-G-L-T-E-A-G-S-D-L-E-Q	
576	T 6	1.572.763	Q-G-L-T-E-A-G-S-D-L-E-Q-V-A-R	
577	T 7	1.649.779	T-E-A-G-S-D-L-E-Q-V-A-R-F-L-D	
578	T 8	1.563.742	G-S-D-L-E-Q-V-A-R-F-L-D-S-A-G	
579	T 9	1.632.872	L-E-Q-V-A-R-F-L-D-S-A-G-S-K-L	
580	T10	1.696.879	V-A-R-F-L-D-S-A-G-S-K-L-D-Y-R	
581	T11	1.746.858	F-L-D-S-A-G-S-K-L-D-Y-R-R-Y-G	
582	T12	1.700.837	S-A-G-S-K-L-D-Y-R-R-Y-G-E-S-L	
583	T13	1.860.926	S-K-L-D-Y-R-R-Y-G-E-S-L-F-D-I	
584	T14	1.829.920	D-Y-R-R-Y-G-E-S-L-F-D-I-L-L-A	
585	T15	1.622.856	R-Y-G-E-S-L-F-D-I-L-L-A-G-G-I	
586	T16	1.527.844	E-S-L-F-D-I-L-L-A-G-G-I-L-A-P	
587	T17	1.413.776	F-D-I-L-L-A-G-G-I-L-A-P-G-G-T	
588	T18	1.321.786	L-L-A-G-G-I-L-A-P-G-G-T-L-A-V	
589	T19	1.353.703	G-G-I-L-A-P-G-G-T-L-A-V-D-V-D	
590	T20	1.464.808	L-A-P-G-G-T-L-A-V-D-V-D-P-L-K	
591	T21	1.554.826	G-G-T-L-A-V-D-V-D-P-L-K-N-T-R	
592	T22	1.680.930	L-A-V-D-V-D-P-L-K-N-T-R-I-E-V	
593	T23	1.746.886	D-V-D-P-L-K-N-T-R-I-E-V-C-V-F	
594	T24	1.674.865	P-L-K-N-T-R-I-E-V-C-V-F-A-A-D	
595	T25	1.679.771	N-T-R-I-E-V-C-V-F-A-A-D-D-D-L	

LLPT15

TCTP_LL1

596	T26	1.663.790	I-E-V-C-V-F-A-A-D-D-D-L-E-I-L
597	T27	1.727.797	C-V-F-A-A-D-D-D-L-E-I-L-K-N-Y
598	T28	1.676.815	A-A-D-D-D-L-E-I-L-K-N-Y-A-Q-V
599	T29	1.761.940	D-D-L-E-I-L-K-N-Y-A-Q-V-I-T-K

8.2. APÊNDICE 2: Lista de toxinas e os peptídeos correspondentes a cada spot da membrana de *Micrurus spp.*

Número	Posição	Peso Molecular	Sequência	Toxina
1	A 1	1.944.922	K-T-C-Y-T-Y-Y-S-L-F-W-K-T-I-E	LEMNISCATUS 3FTx
2	A 2	1.821.817	Y-Y-S-L-F-W-K-T-I-E-T-C-P-D-G	
3	A 3	1.778.765	W-K-T-I-E-T-C-P-D-G-H-N-L-C-Y	
4	A 4	1.859.791	T-C-P-D-G-H-N-L-C-Y-K-R-W-H-M	
5	A 5	1.908.961	H-N-L-C-Y-K-R-W-H-M-L-V-P-G-R	
6	A 6	1.913.010	K-R-W-H-M-L-V-P-G-R-Y-D-I-S-R	
7	A 7	1.603.803	L-V-P-G-R-Y-D-I-S-R-G-C-A-P-T	
8	A 8	1.594.701	Y-D-I-S-R-G-C-A-P-T-C-P-I-A-E	
9	A 9	1.538.675	G-C-A-P-T-C-P-I-A-E-N-H-D-V-I	
10	A10	1.642.668	C-P-I-A-E-N-H-D-V-I-E-C-C-P-T	
11	A11	1.688.648	N-H-D-V-I-E-C-C-P-T-D-N-C-N-L	
12	A12	1.644.727	L-I-C-Y-V-S-M-E-G-A-K-M-T-C-P	
13	A13	1.594.704	S-M-E-G-A-K-M-T-C-P-E-G-K-N-L	
14	A14	1.713.778	K-M-T-C-P-E-G-K-N-L-C-E-K-Y-A	
15	A15	1.786.824	E-G-K-N-L-C-E-K-Y-A-V-S-Y-F-H	
16	A16	1.816.766	C-E-K-Y-A-V-S-Y-F-H-T-G-S-Y-Y	
17	A17	1.943.819	V-S-Y-F-H-T-G-S-Y-Y-F-R-W-E-C	
18	A18	1.853.703	T-G-S-Y-Y-F-R-W-E-C-S-S-E-C-H	
19	A19	1.786.708	F-R-W-E-C-S-S-E-C-H-G-G-I-Y-N	
20	A20	1.558.574	S-S-E-C-H-G-G-I-Y-N-V-C-C-S-T	
21	A21	1.597.621	G-G-I-Y-N-V-C-C-S-T-D-L-C-N-H	
22	A22	1.575.673	V-C-C-S-T-D-L-C-N-H-I-P-K-S-G	
23	A23	1.787.870	R-K-C-Y-V-G-T-R-D-Y-K-P-V-T-C	
24	A24	1.606.730	G-T-R-D-Y-K-P-V-T-C-P-A-G-E-N	
25	A25	1.607.758	K-P-V-T-C-P-A-G-E-N-I-C-Y-T-I	
26	A26	1.613.787	P-A-G-E-N-I-C-Y-T-I-A-H-V-A-R	
27	A27	1.738.875	I-C-Y-T-I-A-H-V-A-R-P-S-Y-F-V	
28	A28	1.703.846	A-H-V-A-R-P-S-Y-F-V-E-R-G-C-I	
29	A29	1.729.748	P-S-Y-F-V-E-R-G-C-I-S-S-C-P-W	
30	A30	1.739.645	E-R-G-C-I-S-S-C-P-W-F-Y-S-C-C	
31	B 1	1.742.597	S-S-C-P-W-F-Y-S-C-C-E-T-D-L-C	
32	B 2	1.768.809	R-I-C-Y-N-D-H-G-Y-I-G-K-T-T-E	

33	B 3	1.624.656	D-H-G-Y-I-G-K-T-T-E-T-C-E-D-G
34	B 4	1.632.690	G-K-T-T-E-T-C-E-D-G-I-T-I-C-Y
35	B 5	1.801.765	T-C-E-D-G-I-T-I-C-Y-Q-Q-S-W-R
36	B 6	1.886.862	I-T-I-C-Y-Q-Q-S-W-R-D-F-R-G-D
37	B 7	1.904.924	Q-Q-S-W-R-D-F-R-G-D-R-I-E-R-G
38	B 8	1.694.714	D-F-R-G-D-R-I-E-R-G-C-G-C-P-D
39	B 9	1.659.807	R-I-E-R-G-C-G-C-P-D-E-K-K-G-I
40	B10	1.624.697	C-G-C-P-D-E-K-K-G-I-E-L-K-C-C
41	B11	1.712.761	E-K-K-G-I-E-L-K-C-C-N-C-D-K-C
42	B12	1.631.652	L-T-C-K-T-C-P-F-N-T-C-A-D-S-E
43	B13	1.542.568	C-P-F-N-T-C-A-D-S-E-T-C-P-V-G
44	B14	1.601.641	C-A-D-S-E-T-C-P-V-G-K-N-I-C-Y
45	B15	1.808.870	T-C-P-V-G-K-N-I-C-Y-Q-R-K-W-N
46	B16	1.893.916	K-N-I-C-Y-Q-R-K-W-N-E-N-N-G-K
47	B17	1.855.965	Q-R-K-W-N-E-N-N-G-K-K-I-E-R-G
48	B18	1.633.755	E-N-N-G-K-K-I-E-R-G-C-V-A-N-C
49	B19	1.574.743	K-I-E-R-G-C-V-A-N-C-P-E-L-G-S
50	B20	1.544.649	C-V-A-N-C-P-E-L-G-S-H-D-T-S-L
51	B21	1.685.787	P-E-L-G-S-H-D-T-S-L-L-C-C-R-R
52	B22	1.685.704	M-E-C-Y-R-C-G-V-S-G-C-H-L-K-T
53	B23	1.480.600	C-G-V-S-G-C-H-L-K-T-T-C-S-A-D
54	B24	1.747.726	C-H-L-K-T-T-C-S-A-D-E-K-F-C-Y
55	B25	1.868.812	T-C-S-A-D-E-K-F-C-Y-K-W-F-N-K
56	B26	2.031.077	E-K-F-C-Y-K-W-F-N-K-I-T-R-I-R
57	B27	1.855.977	K-W-F-N-K-I-T-R-I-R-T-Y-G-C-A
58	B28	1.715.786	I-T-R-I-R-T-Y-G-C-A-E-T-C-T-E
59	B29	1.693.613	T-Y-G-C-A-E-T-C-T-E-E-N-S-W-T
60	B30	1.721.644	E-T-C-T-E-E-N-S-W-T-A-S-V-Y-C
61	C 1	1.690.686	E-N-S-W-T-A-S-V-Y-C-C-T-T-N-L
62	C 2	1.789.896	S-I-P-P-E-P-L-N-L-Y-Q-F-K-N-M
63	C 3	1.795.864	P-L-N-L-Y-Q-F-K-N-M-I-Q-C-A-N
64	C 4	1.853.855	Q-F-K-N-M-I-Q-C-A-N-N-T-R-T-W
65	C 5	1.918.857	I-Q-C-A-N-N-T-R-T-W-W-H-F-G-W
66	C 6	1.978.792	N-T-R-T-W-W-H-F-G-W-Y-G-C-Y-C
67	C 7	1.734.671	W-H-F-G-W-Y-G-C-Y-C-G-R-G-G-S
68	C 8	1.490.581	Y-G-C-Y-C-G-R-G-G-S-G-T-P-V-D
69	C 9	1.517.678	G-R-G-G-S-G-T-P-V-D-E-L-D-R-C
70	C10	1.685.703	G-T-P-V-D-E-L-D-R-C-C-Q-V-H-D
71	C11	1.840.670	E-L-D-R-C-C-Q-V-H-D-N-C-Y-D-E
72	C12	1.787.761	C-Q-V-H-D-N-C-Y-D-E-A-K-K-V-H
73	C13	1.833.818	N-C-Y-D-E-A-K-K-V-H-K-C-H-P-Y
74	C14	1.949.888	K-C-A-N-N-T-R-P-W-W-H-F-I-D-Y
75	C15	1.902.786	T-R-P-W-W-H-F-I-D-Y-G-C-Y-C-G

LEMNISCATUS Pla2

76	C16	1.581.591	H-F-I-D-Y-G-C-Y-C-G-F-G-G-S-G
77	C17	1.474.575	G-C-Y-C-G-F-G-G-S-G-K-P-V-D-E
78	C18	1.581.680	F-G-G-S-G-K-P-V-D-E-L-D-R-C-C
79	C19	1.783.823	K-P-V-D-E-L-D-R-C-C-Q-V-H-D-K
80	C20	1.782.701	L-D-R-C-C-Q-V-H-D-K-C-Y-D-D-A
81	C21	1.809.836	Q-V-H-D-K-C-Y-D-D-A-K-R-L-Y-G
82	C22	1.921.817	C-Y-D-D-A-K-R-L-Y-G-C-W-P-F-W
83	C23	2.007.996	K-R-L-Y-G-C-W-P-F-W-T-L-Y-I-Y
84	C24	1.871.794	C-W-P-F-W-T-L-Y-I-Y-C-A-S-G
85	C25	1.701.731	T-L-Y-I-Y-Y-C-A-S-G-Y-P-S-C-V
86	C26	1.595.664	Y-C-A-S-G-Y-P-S-C-V-G-N-F-T-K
87	C27	1.685.852	Y-P-S-C-V-G-N-F-T-K-C-K-K-I-V
88	C28	1.673.746	G-N-F-T-K-C-K-K-I-V-C-E-C-D-S
89	C29	1.630.690	C-K-K-I-V-C-E-C-D-S-K-A-A-M-C
90	C30	1.617.630	C-E-C-D-S-K-A-A-M-C-F-A-R-S-P
91	D 1	1.771.781	K-A-A-M-C-F-A-R-S-P-Y-N-N-W-N
92	D 2	1.918.795	F-A-R-S-P-Y-N-N-W-N-Y-D-M-N-Q
93	D 3	1.882.729	Y-N-N-W-N-Y-D-M-N-Q-Q-Y-C-K
94	D 4	1.834.977	S-I-A-P-Q-P-L-T-R-Y-Q-F-K-R-M
95	D 5	1.868.928	P-L-T-R-Y-Q-F-K-R-M-I-E-C-A-N
96	D 6	1.864.908	Q-F-K-R-M-I-E-C-A-N-N-I-R-G-W
97	D 7	1.914.825	I-E-C-A-N-N-I-R-G-W-W-D-Y-F-E
98	D 8	1.973.775	N-I-R-G-W-W-D-Y-F-E-Y-G-C-Y-C
99	D 9	1.849.660	W-D-Y-F-E-Y-G-C-Y-C-D-S-R-G-S
100	D10	1.578.597	Y-G-C-Y-C-D-S-R-G-S-G-T-P-V-D
101	D11	1.605.694	D-S-R-G-S-G-T-P-V-D-E-L-D-R-C
102	D12	1.840.707	E-L-D-R-C-C-Q-V-H-D-K-C-Y-D-D
103	D13	1.855.823	C-Q-V-H-D-K-C-Y-D-D-A-K-R-L-Y
104	D14	1.863.833	K-C-Y-D-D-A-K-R-L-Y-G-C-W-P-F
105	D15	1.915.970	A-K-R-L-Y-G-C-W-P-F-W-T-L-Y-I
106	D16	1.624.883	A-T-S-S-V-P-P-R-P-L-N-L-I-N-F
107	D17	1.836.008	P-P-R-P-L-N-L-I-N-F-Q-R-M-I-Q
108	D18	1.837.918	N-L-I-N-F-Q-R-M-I-Q-C-T-T-T-R
109	D19	1.851.872	Q-R-M-I-Q-C-T-T-T-R-R-S-A-W-D
110	D20	1.777.773	C-T-T-T-R-R-S-A-W-D-F-T-N-Y-G
111	D21	1.712.660	R-S-A-W-D-F-T-N-Y-G-C-Y-C-G-A
112	D22	1.456.528	F-T-N-Y-G-C-Y-C-G-A-G-G-S-G-T
113	D23	1.427.559	C-Y-C-G-A-G-G-S-G-T-P-V-D-E-L
114	D24	1.535.660	G-G-S-G-T-P-V-D-E-L-D-R-C-C-K
115	D25	1.745.706	P-V-D-E-L-D-R-C-C-K-V-H-D-D-C
116	D26	1.683.633	D-R-C-C-K-V-H-D-D-C-Y-G-A-A-E
117	D27	1.765.719	V-H-D-D-C-Y-G-A-A-E-K-Y-H-R-C
118	D28	1.722.840	Y-G-A-A-E-K-Y-H-R-C-S-P-K-L-T

119	D29	1.796.913	K-Y-H-R-C-S-P-K-L-T-L-Y-T-S-T
120	D30	1.530.713	S-P-K-L-T-L-Y-T-S-T-C-S-S-G-S
121	E 1	1.550.648	L-Y-T-S-T-C-S-S-G-S-V-T-C-K-D
122	E 2	1.488.590	C-S-S-G-S-V-T-C-K-D-N-G-T-K-C
123	E 3	1.615.741	V-T-C-K-D-N-G-T-K-C-K-A-F-V-C
124	E 4	1.658.722	N-G-T-K-C-K-A-F-V-C-N-C-D-R-T
125	E 5	1.660.741	K-A-F-V-C-N-C-D-R-T-A-A-L-C-F
126	E 6	1.656.739	N-C-D-R-T-A-A-L-C-F-G-R-A-P-Y
127	E 7	1.611.837	M-I-Q-C-T-I-I-P-P-G-S-S-P-L-R
128	E 8	1.662.814	I-I-P-P-G-S-S-P-L-R-D-Y-A-D-Y
129	E 9	1.668.644	S-S-P-L-R-D-Y-A-D-Y-G-C-Y-C-G
130	E10	1.542.539	D-Y-A-D-Y-G-C-Y-C-G-R-G-G-S-G
131	E11	1.456.560	G-C-Y-C-G-R-G-G-S-G-T-P-V-D-E
132	E12	1.563.666	R-G-G-S-G-T-P-V-D-E-L-D-R-C-C
133	E13	1.743.745	T-P-V-D-E-L-D-R-C-C-K-V-H-D-D
134	E14	1.667.674	L-D-R-C-C-K-V-H-D-D-C-Y-G-A-A
135	E15	1.790.805	K-V-H-D-D-C-Y-G-A-A-E-K-Y-H-R
136	E16	1.724.802	C-Y-G-A-A-E-K-Y-H-R-C-S-P-K-L
137	E17	1.824.908	E-K-Y-H-R-C-S-P-K-L-T-L-Y-T-S
138	E18	1.617.727	C-S-P-K-L-T-L-Y-T-S-T-C-S-S-Q
139	E19	1.534.671	T-L-Y-T-S-T-C-S-S-Q-T-G-S-V-T
140	E20	1.486.592	T-C-S-S-Q-T-G-S-V-T-C-K-D-N-G
141	E21	1.511.696	T-G-S-V-T-C-K-D-N-G-T-K-C-K-A
142	E22	1.632.677	C-K-D-N-G-T-K-C-K-A-F-V-C-N-C
143	E23	1.629.731	T-K-C-K-A-F-V-C-N-C-D-R-T-A-A
144	E24	1.674.732	F-V-C-N-C-D-R-T-A-A-L-C-F-G-R
145	E25	1.681.825	D-R-T-A-A-L-C-F-G-R-A-P-Y-N-K
146	E26	1.751.830	L-C-F-G-R-A-P-Y-N-K-N-N-E-N-I
147	E27	1.759.795	A-P-Y-N-K-N-N-E-N-I-N-P-N-R-C
148	E28	1.936.791	N-T-R-P-W-W-N-F-I-D-Y-G-C-Y-C
149	E29	1.744.654	W-N-F-I-D-Y-G-C-Y-C-G-Y-G-A-N
150	E30	1.618.596	Y-G-C-Y-C-G-Y-G-A-N-Y-T-A-V-D
151	F 1	1.645.693	G-Y-G-A-N-Y-T-A-V-D-E-L-D-R-C
152	F 2	1.799.750	Y-T-A-V-D-E-L-D-R-C-C-Q-T-H-F
153	F 3	1.845.712	E-L-D-R-C-C-Q-T-H-F-N-C-Y-S-Q
154	F 4	1.757.649	C-Q-T-H-F-N-C-Y-S-Q-A-M-D-N-P
155	F 5	1.626.637	N-C-Y-S-Q-A-M-D-N-P-A-C-T-P-I
156	F 6	1.606.690	A-M-D-N-P-A-C-T-P-I-L-D-S-P-Y
157	F 7	1.670.811	A-C-T-P-I-L-D-S-P-Y-I-K-T-Y-S
158	F 8	1.768.776	L-D-S-P-Y-I-K-T-Y-S-Y-T-C-S-E
159	F 9	1.654.711	I-K-T-Y-S-Y-T-C-S-E-G-S-L-T-C
160	F10	1.577.550	Y-T-C-S-E-G-S-L-T-C-N-G-D-N-D
161	F11	1.437.575	G-S-L-T-C-N-G-D-N-D-V-C-G-A-L

162	F12	1.510.538	N-G-D-N-D-V-C-G-A-L-V-C-N-C-D
163	F13	1.451.610	V-C-G-A-L-V-C-N-C-D-L-S-A-A-N
164	F14	1.457.563	V-C-N-C-D-L-S-A-A-N-C-F-A-G-A
165	F15	1.538.696	L-S-A-A-N-C-F-A-G-A-P-F-I-E-E
166	F16	1.719.680	C-F-A-G-A-P-F-I-E-E-N-Y-N-M-D
167	F17	1.883.771	P-F-I-E-E-N-Y-N-M-D-P-E-R-C-Q
168	F18	1.821.912	L-N-Q-F-R-L-M-I-K-C-T-N-D-Q-V
169	F19	1.797.832	L-M-I-K-C-T-N-D-Q-V-W-S-D-F-V
170	F20	1.810.703	T-N-D-Q-V-W-S-D-F-V-D-Y-G-C-Y
171	F21	1.811.717	W-S-D-F-V-D-Y-G-C-Y-C-I-A-R-D
172	F22	1.689.738	D-Y-G-C-Y-C-I-A-R-D-S-K-T-P-V
173	F23	1.702.820	C-I-A-R-D-S-K-T-P-V-D-D-L-D-R
174	F24	1.677.734	S-K-T-P-V-D-D-L-D-R-C-C-Q-A-Q
175	F25	1.802.691	D-D-L-D-R-C-C-Q-A-Q-K-Q-C-Y-D
176	F26	1.744.711	C-C-Q-A-Q-K-Q-C-Y-D-E-A-E-K-V
177	F27	1.733.775	K-Q-C-Y-D-E-A-E-K-V-H-G-C-K-P
178	F28	1.749.847	E-A-E-K-V-H-G-C-K-P-L-V-M-F-Y
179	F29	1.815.815	H-G-C-K-P-L-V-M-F-Y-S-F-E-C-R
180	F30	1.842.821	L-V-M-F-Y-S-F-E-C-R-Y-L-A-S-D
181	G 1	1.664.670	S-F-E-C-R-Y-L-A-S-D-L-D-C-S-G
182	G 2	1.602.654	Y-L-A-S-D-L-D-C-S-G-N-N-T-K-C
183	G 3	1.672.701	L-D-C-S-G-N-N-T-K-C-R-N-F-V-C
184	G 4	1.786.755	N-N-T-K-C-R-N-F-V-C-N-C-D-R-T
185	G 5	1727.78	R-N-F-V-C-N-C-D-R-T-A-T-L-C-I
186	G 6	1.627.759	N-C-D-R-T-A-T-L-C-I-L-A-A-T-Y
187	G 7	1.673.820	A-T-L-C-I-L-A-A-T-Y-N-R-N-N-H
188	G 8	1.712.848	L-A-A-T-Y-N-R-N-N-H-K-I-D-P-S
189	G 9	1.820.840	L-I-C-Y-S-Q-M-Y-N-E-I-I-K-T-C
190	G10	1.771.765	Q-M-Y-N-E-I-I-K-T-C-E-N-G-E-T
191	G11	1.688.764	I-I-K-T-C-E-N-G-E-T-T-C-Y-S-K
192	G12	1.825.758	E-N-G-E-T-T-C-Y-S-K-T-W-R-D-H
193	G13	1.878.916	T-C-Y-S-K-T-W-R-D-H-R-G-T-R-L
194	G14	1.770.859	T-W-R-D-H-R-G-T-R-L-E-K-G-C-G
195	G15	1.599.823	R-G-T-R-L-E-K-G-C-G-C-P-P-V-K
196	G16	1.637.750	E-K-G-C-G-C-P-P-V-K-Y-D-M-I-V
197	G17	1.726.817	C-P-P-V-K-Y-D-M-I-V-K-C-C-K-T
198	G18	1.747.740	Y-D-M-I-V-K-C-C-K-T-D-R-C-G-N
199	G19	1.739.775	M-I-C-Y-N-Q-Q-S-T-E-P-P-T-T-K
200	G20	1.592.688	Q-Q-S-T-E-P-P-T-T-K-T-C-S-E-G
201	G21	1.669.769	P-P-T-T-K-T-C-S-E-G-Q-C-Y-K-K
202	G22	1.771.718	T-C-S-E-G-Q-C-Y-K-K-T-W-S-D-H
203	G23	1.834.904	Q-C-Y-K-K-T-W-S-D-H-R-G-T-I-I
204	G24	1.700.794	T-W-S-D-H-R-G-T-I-I-E-R-G-C-A

SURINAMENSIS 3FTx

205	G25	1.615.818	R-G-T-I-I-E-R-G-C-A-C-P-N-V-K
206	G26	1.569.801	E-R-G-C-A-C-P-N-V-K-P-G-V-K-I
207	G27	1.520.704	C-P-N-V-K-P-G-V-K-I-S-C-C-S-S
208	G28	2.005.881	K-T-C-Y-T-Y-Y-S-W-F-W-K-T-T-E
209	G29	1.882.776	Y-Y-S-W-F-W-K-T-T-E-T-C-P-D-G
210	G30	1.757.728	W-K-T-T-E-T-C-P-D-G-Q-N-L-C-Y
211	H 1	1.850.790	T-C-P-D-G-Q-N-L-C-Y-K-R-W-H-M
212	H 2	1.885.945	Q-N-L-C-Y-K-R-W-H-M-V-V-P-G-R
213	H 3	1.959.030	K-R-W-H-M-V-V-P-G-R-Y-D-I-F-R
214	H 4	1.623.808	V-V-P-G-R-Y-D-I-F-R-G-C-A-A-T
215	H 5	1.628.722	Y-D-I-F-R-G-C-A-A-T-C-P-I-A-E
216	H 6	1.486.607	G-C-A-A-T-C-P-I-A-E-N-H-D-S-V
217	H 7	1.617.647	C-P-I-A-E-N-H-D-S-V-E-C-C-A-K
218	H 8	1.664.587	N-H-D-S-V-E-C-C-A-K-D-N-C-N-N
219	H 9	1.630.668	L-T-C-K-T-C-P-F-N-T-C-A-N-S-E
220	H10	1.513.553	C-P-F-N-T-C-A-N-S-E-T-C-P-A-G
221	H11	1.572.626	C-A-N-S-E-T-C-P-A-G-K-N-I-C-Y
222	H12	1.767.833	T-C-P-A-G-K-N-I-C-Y-Q-K-K-W-E
223	H13	1.946.931	K-N-I-C-Y-Q-K-K-W-E-E-H-R-G-E
224	H14	2.036.067	Q-K-K-W-E-E-H-R-G-E-R-I-E-R-R
225	H15	1.826.863	E-H-R-G-E-R-I-E-R-R-C-V-A-N-C
226	H16	1.700.882	R-I-E-R-R-C-V-A-N-C-P-K-L-G-S
227	H17	1.547.733	C-V-A-N-C-P-K-L-G-S-N-D-K-S-L
228	H18	1.688.870	P-K-L-G-S-N-D-K-S-L-L-C-C-R-R
229	H19	1.506.652	C-G-V-S-G-C-H-L-K-T-T-C-L-A-D
230	H20	1.773.778	C-H-L-K-T-T-C-L-A-D-E-K-F-C-Y
231	H21	1.884.854	T-C-L-A-D-E-K-F-C-Y-K-W-H-N-K
232	H22	2.012.034	E-K-F-C-Y-K-W-H-N-K-I-T-F-I-R
233	H23	1.810.930	K-W-H-N-K-I-T-F-I-R-T-H-G-C-A
234	H24	1.679.801	I-T-F-I-R-T-H-G-C-A-K-T-C-T-E
235	H25	1.666.660	T-H-G-C-A-K-T-C-T-E-E-N-S-W-T
236	H26	1.846.823	K-T-C-T-E-E-N-S-W-T-K-R-V-Y-C
237	H27	1.816.813	E-N-S-W-T-K-R-V-Y-C-C-T-T-N-L
238	H28	1.730.903	S-I-S-P-Q-A-L-N-L-N-Q-F-R-L-M
239	H29	1.777.922	A-L-N-L-N-Q-F-R-L-M-I-K-C-T-N
240	H30	1.894.907	Q-F-R-L-M-I-K-C-T-N-N-D-Q-V-W
241	I 1	1.782.777	I-K-C-T-N-N-D-Q-V-W-S-D-F-V-D
242	I 2	1.812.665	N-D-Q-V-W-S-D-F-V-D-Y-G-C-Y-C
243	I 3	1.712.670	S-D-F-V-D-Y-G-C-Y-C-I-A-R-D-S
244	I 4	1.689.738	Y-G-C-Y-C-I-A-R-D-S-K-T-P-V-D
245	I 5	1.702.820	I-A-R-D-S-K-T-P-V-D-D-L-D-R-C
246	I 6	1.718.797	K-T-P-V-D-D-L-D-R-C-C-Q-A-Q-K
247	I 7	1.816.707	D-L-D-R-C-C-Q-A-Q-K-Q-C-Y-D-E

SURINAMENSIS Pla2

248	I 8	1.778.761	C-Q-A-Q-K-Q-C-Y-D-E-A-E-K-V-H
249	I 9	1.718.765	Q-C-Y-D-E-A-E-K-V-H-G-C-K-P-L
250	I10	1.691.823	S-I-A-P-Q-P-L-N-L-Y-Q-F-G-N-M
251	I11	1.757.783	P-L-N-L-Y-Q-F-G-N-M-I-N-C-T-M
252	I12	1.596.645	Q-F-G-N-M-I-N-C-T-M-M-P-P-G-G
253	I13	1.544.693	I-N-C-T-M-M-P-P-G-G-S-P-L-L-D
254	I14	1.551.680	M-P-P-G-G-S-P-L-L-D-Y-A-D-Y-G
255	I15	1.625.627	S-P-L-L-D-Y-A-D-Y-G-C-Y-C-G-S
256	I16	1.528.560	Y-A-D-Y-G-C-Y-C-G-S-R-G-G-G-T
257	I17	1.498.607	C-Y-C-G-S-R-G-G-G-T-P-V-D-D-L
258	I18	1.590.677	R-G-G-G-T-P-V-D-D-L-D-R-C-C-Q
259	I19	1.702.639	P-V-D-D-L-D-R-C-C-Q-A-H-D-N-C
260	I20	1.753.650	D-R-C-C-Q-A-H-D-N-C-Y-N-E-A-I
261	I21	1.729.719	A-H-D-N-C-Y-N-E-A-I-K-V-H-N-C
262	I22	1.784.757	Y-N-E-A-I-K-V-H-N-C-C-P-Y-M-T
263	I23	1.895.793	K-V-H-N-C-C-P-Y-M-T-F-Y-I-Y-D
264	I24	1.760.714	C-P-Y-M-T-F-Y-I-Y-D-C-T-G-G-K
265	I25	1.667.758	F-Y-I-Y-D-C-T-G-G-K-L-T-C-K-G
266	I26	1.540.741	C-T-G-G-K-L-T-C-K-G-N-K-T-K-C
267	I27	1.624.762	L-T-C-K-G-N-K-T-K-C-Q-E-A-V-C
268	I28	1.709.754	N-K-T-K-C-Q-E-A-V-C-N-C-D-R-V
269	I29	1.641.659	Q-E-A-V-C-N-C-D-R-V-A-A-N-C-F
270	I30	1.584.670	N-C-D-R-V-A-A-N-C-F-A-A-A-P-Y
271	J 1	1.672.731	A-A-N-C-F-A-A-A-P-Y-N-Q-R-N-Y
272	J 2	1.638.848	M-I-Q-C-T-I-I-P-P-G-S-N-P-L-R
273	J 3	1.689.825	I-I-P-P-G-S-N-P-L-R-D-Y-A-D-Y
274	J 4	1.695.655	S-N-P-L-R-D-Y-A-D-Y-G-C-Y-C-G
275	J 5	1.442.544	G-C-Y-C-G-R-G-G-S-G-T-P-V-D-D
276	J 6	1.549.650	R-G-G-S-G-T-P-V-D-D-L-D-R-C-C
277	J 7	1.728.709	T-P-V-D-D-L-D-R-C-C-Q-V-H-D-N
278	J 8	1.724.659	L-D-R-C-C-Q-V-H-D-N-C-Y-G-E-A
279	J 9	1.698.731	Q-V-H-D-N-C-Y-G-E-A-A-K-V-H-E
280	J10	1.717.785	C-Y-G-E-A-A-K-V-H-E-C-W-P-L-L
281	J11	1.821.901	A-K-V-H-E-C-W-P-L-L-T-L-Y-S-Y
282	J12	1.861.827	C-W-P-L-L-T-L-Y-S-Y-E-C-S-E-R
283	J13	1.822.848	T-L-Y-S-Y-E-C-S-E-R-K-L-T-C-K
284	J14	1.767.813	E-C-S-E-R-K-L-T-C-K-D-N-N-T-K
285	J15	1.755.854	K-L-T-C-K-D-N-N-T-K-C-K-D-F-V
286	J16	1.744.747	D-N-N-T-K-C-K-D-F-V-C-K-C-D-L
287	J17	1.660.661	C-K-D-F-V-C-K-C-D-L-E-A-A-N-C
288	J18	1.582.683	C-K-C-D-L-E-A-A-N-C-F-A-K-A-P
289	J19	1.550.820	M-N-P-A-H-L-L-V-L-A-A-V-C-I-S
290	J20	1.469.878	L-L-V-L-A-A-V-C-I-S-L-L-G-V-S

291	J21	1.496.816	A-V-C-I-S-L-L-G-V-S-T-I-P-P-Q	
292	J22	1.594.922	L-L-G-V-S-T-I-P-P-Q-P-L-T-I-F	
293	J23	1.732.875	T-I-P-P-Q-P-L-T-I-F-Q-F-S-N-M	
294	J24	1.754.862	P-L-T-I-F-Q-F-S-N-M-I-Q-C-T-I	
295	J25	1.634.769	Q-F-S-N-M-I-Q-C-T-I-I-P-P-G-S	
296	J26	1.600.842	I-Q-C-T-I-I-P-P-G-S-I-P-L-Y-S	
297	J27	1.640.798	I-P-P-G-S-I-P-L-Y-S-Y-T-N-Y-G	
298	J28	1.771.759	I-P-L-Y-S-Y-T-N-Y-G-C-Y-C-G-R	
299	J29	1.557.587	Y-T-N-Y-G-C-Y-C-G-R-G-G-S-G-T	
300	J30	1.512.623	C-Y-C-G-R-G-G-S-G-T-P-V-D-E-L	
301	K 1	1.535.623	G-G-S-G-T-P-V-D-E-L-D-R-C-C-Q	
302	K 2	1.744.686	P-V-D-E-L-D-R-C-C-Q-V-H-D-N-C	
303	K 3	1.740.618	D-R-C-C-Q-V-H-D-N-C-Y-G-E-A-E	
304	K 4	1.680.640	V-H-D-N-C-Y-G-E-A-E-T-V-Q-N-C	
305	K 5	1.737.792	Y-G-E-A-E-T-V-Q-N-C-W-P-K-L-T	
306	K 6	1.829.855	T-V-Q-N-C-W-P-K-L-T-L-Y-S-Y-D	
307	K 7	1.801.896	W-P-K-L-T-L-Y-S-Y-D-C-T-K-G-K	
308	K 8	1.651.748	L-Y-S-Y-D-C-T-K-G-K-L-T-C-T-G	
309	K 9	1.571.700	C-T-K-G-K-L-T-C-T-G-D-N-T-K-C	
310	K10	1.646.699	L-T-C-T-G-D-N-T-K-C-K-D-F-V-C	
311	K11	1.758.738	D-N-T-K-C-K-D-F-V-C-N-C-D-R-V	
312	K12	1.703.711	K-D-F-V-C-N-C-D-R-V-A-A-N-C-F	
313	K13	1.641.728	N-C-D-R-V-A-A-N-C-F-A-K-A-P-Y	
314	K14	1.701.819	A-A-N-C-F-A-K-A-P-Y-N-K-K-N-Y	
315	K15	1.748.874	A-K-A-P-Y-N-K-K-N-Y-N-I-D-P-N	
316	K16	1.765.955	S-I-A-P-Q-P-L-T-I-H-Q-F-R-K-M	
317	K17	1.829.917	P-L-T-I-H-Q-F-R-K-M-I-E-C-T-N	
318	K18	1.922.913	Q-F-R-K-M-I-E-C-T-N-N-T-R-P-W	
319	K19	1.865.804	I-E-C-T-N-N-T-R-P-W-W-N-F-A-D	
320	K20	1.894.744	N-T-R-P-W-W-N-F-A-D-Y-G-C-Y-C	
321	K21	1.718.602	W-N-F-A-D-Y-G-C-Y-C-S-Y-G-G-N	
322	K22	1.558.559	Y-G-C-Y-C-S-Y-G-G-N-S-T-A-V-D	
323	K23	1.584.673	S-Y-G-G-N-S-T-A-V-D-Q-L-D-R-C	
324	K24	1.738.729	S-T-A-V-D-Q-L-D-R-C-C-Q-T-H-Y	
325	K25	1.860.723	Q-L-D-R-C-C-Q-T-H-Y-N-C-Y-S-Q	
326	K26	1.770.698	C-Q-T-H-Y-N-C-Y-S-Q-A-K-D-N-P	
327	K27	1.650.738	N-C-Y-S-Q-A-K-D-N-P-A-C-K-P-I	
328	K28	1.646.811	L-V-C-Y-T-N-V-L-E-P-P-G-T-L-E	
329	K29	1.598.702	N-V-L-E-P-P-G-T-L-E-T-C-P-D-D	
330	K30	1.624.700	P-G-T-L-E-T-C-P-D-D-F-T-C-V-K	
331	L 1	1.684.711	T-C-P-D-D-F-T-C-V-K-K-W-E-G-G	
332	L 2	1.722.888	F-T-C-V-K-K-W-E-G-G-G-R-R-V-T	
333	L 3	1.762.821	K-W-E-G-G-G-R-R-V-T-Q-Y-C-S-H	CORALLINUS 3FTX

334	L 4	1.660.782	G-R-R-V-T-Q-Y-C-S-H-A-C-A-I-P
335	L 5	1.688.685	Q-Y-C-S-H-A-C-A-I-P-A-S-Y-E-F
336	L 6	1.640.667	A-C-A-I-P-A-S-Y-E-F-V-H-C-C-Q
337	L 7	1.746.669	A-S-Y-E-F-V-H-C-C-Q-T-D-K-C-N
338	L 8	1.748.888	L-F-C-D-N-S-N-V-P-S-I-R-T-R-K
339	L 9	1.770.989	S-N-V-P-S-I-R-T-R-K-R-C-L-K-N
340	L10	1.922.071	I-R-T-R-K-R-C-L-K-N-Q-K-L-C-Y
341	L11	1.921.962	R-C-L-K-N-Q-K-L-C-Y-K-M-T-F-F
342	L12	1.766.841	Q-K-L-C-Y-K-M-T-F-F-T-P-G-F-G
343	L13	1.787.896	K-M-T-F-F-T-P-G-F-G-W-T-Q-I-K
344	L14	1.699.851	T-P-G-F-G-W-T-Q-I-K-G-C-I-H-R
345	L15	1.757.823	W-T-Q-I-K-G-C-I-H-R-C-P-E-S-T
346	L16	1.732.755	G-C-I-H-R-C-P-E-S-T-P-N-E-K-Y
347	L17	1.688.637	C-P-E-S-T-P-N-E-K-Y-Q-C-C-S-T
348	L18	1.772.786	L-I-C-Y-N-T-M-M-Q-K-V-T-C-P-E
349	L19	1.697.750	T-M-M-Q-K-V-T-C-P-E-G-K-D-K-C
350	L20	1.668.774	V-T-C-P-E-G-K-D-K-C-E-K-Y-A-V
351	L21	1.679.838	G-K-D-K-C-E-K-Y-A-V-P-V-M-R-G
352	L22	1.820.917	E-K-Y-A-V-P-V-M-R-G-K-F-Y-F-S
353	L23	1.812.822	P-V-M-R-G-K-F-Y-F-S-Y-Q-C-T-S
354	L24	1.826.765	K-F-Y-F-S-Y-Q-C-T-S-K-C-H-E-G
355	L25	1.705.642	Y-Q-C-T-S-K-C-H-E-G-A-Y-D-V-C
356	L26	1.642.632	K-C-H-E-G-A-Y-D-V-C-C-S-T-D-L
357	L27	1.607.616	A-Y-D-V-C-C-S-T-D-L-C-N-K-S-S
358	L28	1.734.811	L-Q-C-Y-V-G-R-D-G-F-K-F-V-T-C
359	L29	1.654.730	G-R-D-G-F-K-F-V-T-C-P-E-G-E-N
360	L30	1.727.717	K-F-V-T-C-P-E-G-E-N-H-C-Y-T-T
361	M 1	1.661.736	P-E-G-E-N-H-C-Y-T-T-A-I-T-A-R
362	M 2	1.708.850	H-C-Y-T-T-A-I-T-A-R-P-T-Y-V-I
363	M 3	1.631.907	A-I-T-A-R-P-T-Y-V-I-V-R-G-C-I
364	M 4	1.669.785	P-T-Y-V-I-V-R-G-C-I-S-S-C-S-W
365	M 5	1.766.783	V-R-G-C-I-S-S-C-S-W-Y-Y-I-K-C
366	M 6	1.786.725	S-S-C-S-W-Y-Y-I-K-C-C-T-T-D-K
367	M 7	1.731.844	R-K-C-R-I-G-K-D-G-F-Y-S-V-T-C
368	M 8	1.676.724	G-K-D-G-F-Y-S-V-T-C-T-E-K-E-N
369	M 9	1.767.741	Y-S-V-T-C-T-E-K-E-N-L-C-F-T-M
370	M10	1.762.791	T-E-K-E-N-L-C-F-T-M-F-S-A-R-S
371	M11	1.713.847	L-C-F-T-M-F-S-A-R-S-P-T-Q-I-I
372	M12	1.634.809	F-S-A-R-S-P-T-Q-I-I-E-R-G-C-A
373	M13	1.537.675	P-T-Q-I-I-E-R-G-C-A-S-S-C-S-S
374	M14	1.666.657	E-R-G-C-A-S-S-C-S-S-R-Y-M-K-C
375	M15	1.643.594	S-S-C-S-S-R-Y-M-K-C-C-S-T-D-S
376	M16	1.637.834	T-K-C-L-T-K-F-S-P-G-L-Q-T-S-Q

377	M17	1.520.718	K-F-S-P-G-L-Q-T-S-Q-T-C-P-A-G
378	M18	1.623.764	L-Q-T-S-Q-T-C-P-A-G-Q-K-I-C-F
379	M19	1.764.942	T-C-P-A-G-Q-K-I-C-F-K-K-W-K-K
380	M20	1.836.033	Q-K-I-C-F-K-K-W-K-K-G-E-K-V-S
381	M21	1.702.955	K-K-W-K-K-G-E-K-V-S-R-G-C-A-V
382	M22	1.530.754	G-E-K-V-S-R-G-C-A-V-T-C-P-K-P
383	M23	1.631.801	R-G-C-A-V-T-C-P-K-P-K-K-D-E-T
384	M24	1.693.773	T-C-P-K-P-K-K-D-E-T-I-Q-C-C-T
385	M25	1.740.748	K-K-D-E-T-I-Q-C-C-T-K-N-N-C-N
386	M26	1.708.809	I-V-C-Y-K-R-H-A-S-D-S-Q-T-T-T
387	M27	1.575.720	R-H-A-S-D-S-Q-T-T-T-C-L-S-G-I
388	M28	1.644.810	S-Q-T-T-T-C-L-S-G-I-C-Y-K-K-I
389	M29	1.614.811	C-L-S-G-I-C-Y-K-K-I-T-R-G-S-S
390	M30	1.711.839	C-Y-K-K-I-T-R-G-S-S-R-P-E-M-G
391	N 1	1.564.643	T-R-G-S-S-R-P-E-M-G-C-G-C-P-Q
392	N 2	1.562.664	R-P-E-M-G-C-G-C-P-Q-S-S-R-G-V
393	N 3	1.540.614	C-G-C-P-Q-S-S-R-G-V-K-V-D-C-C
394	N 4	1.685.736	S-S-R-G-V-K-V-D-C-C-M-R-D-K-C
395	N 5	1.742.757	L-E-C-K-I-C-N-F-K-T-C-P-T-D-E
396	N 6	1.736.732	C-N-F-K-T-C-P-T-D-E-L-R-H-C-A
397	N 7	1.630.697	C-P-T-D-E-L-R-H-C-A-S-G-E-T-I
398	N 8	1.727.801	L-R-H-C-A-S-G-E-T-I-C-Y-K-T-F
399	N 9	1.841.841	S-G-E-T-I-C-Y-K-T-F-W-N-T-H-R
400	N10	1.908.931	C-Y-K-T-F-W-N-T-H-R-G-L-R-I-D
401	N11	1.724.853	W-N-T-H-R-G-L-R-I-D-R-G-C-A-A
402	N12	1.531.749	G-L-R-I-D-R-G-C-A-A-T-C-P-T-V
403	N13	1.472.712	R-G-C-A-A-T-C-P-T-V-K-P-G-V-N
404	N14	1.574.787	T-C-P-T-V-K-P-G-V-N-I-I-C-C-K
405	N15	1.620.731	K-P-G-V-N-I-I-C-C-K-T-D-N-C-N
406	N16	1.591.679	D-S-R-G-S-G-T-P-V-D-D-L-D-R-C
407	N17	1.643.656	G-T-P-V-D-D-L-D-R-C-C-Q-A-H-D
408	N18	1.797.639	D-L-D-R-C-C-Q-A-H-D-N-C-Y-N-E
409	N19	1.743.735	C-Q-A-H-D-N-C-Y-N-E-A-I-K-V-H
410	N20	1.769.721	N-C-Y-N-E-A-I-K-V-H-N-C-C-P-Y
411	N21	1.801.824	A-I-K-V-H-N-C-C-P-Y-M-T-F-Y-I
412	N22	1.792.649	N-C-C-P-Y-M-T-F-Y-I-Y-D-C-T-G
413	N23	1.714.729	M-T-F-Y-I-Y-D-C-T-G-G-K-L-T-C
414	N24	1.587.727	Y-D-C-T-G-G-K-L-T-C-K-G-N-K-T
415	N25	1.607.801	G-K-L-T-C-K-G-N-K-T-K-C-Q-E-A
416	N26	1.639.701	K-G-N-K-T-K-C-Q-E-A-V-C-N-C-D
417	N27	1.622.685	K-C-Q-E-A-V-C-N-C-D-R-V-A-A-N
418	N28	1.526.632	V-C-N-C-D-R-V-A-A-N-C-F-A-A-A
419	N29	1.650.794	R-V-A-A-N-C-F-A-A-A-P-Y-N-Q-R

CORALLINUS Pla2

420	N30	1.704.739	C-F-A-A-A-P-Y-N-Q-R-N-Y-K-G-C
421	O 1	1.755.767	T-K-R-S-V-L-A-F-M-D-Y-G-C-Y-C
422	O 2	1.529.551	L-A-F-M-D-Y-G-C-Y-C-G-S-G-G-S
423	O 3	1.421.512	Y-G-C-Y-C-G-S-G-G-S-G-T-P-V-D
424	O 4	1.434.593	G-S-G-G-S-G-T-P-V-D-D-L-D-R-C
425	O 5	1.671.723	G-T-P-V-D-D-L-D-R-C-C-K-V-H-D
426	O 6	1.769.670	D-L-D-R-C-C-K-V-H-D-D-C-Y-G-E
427	O 7	1.747.682	C-K-V-H-D-D-C-Y-G-E-A-E-K-D-H
428	O 8	1.736.681	D-C-Y-G-E-A-E-K-D-H-G-C-W-P-K
429	O 9	1.819.824	A-E-K-D-H-G-C-W-P-K-W-T-L-Y-S
430	O10	1.884.774	G-C-W-P-K-W-T-L-Y-S-Y-Y-C-S-E
431	O11	1.815.737	W-T-L-Y-S-Y-Y-C-S-E-G-Q-L-T-C
432	O12	1.738.670	Y-Y-C-S-E-G-Q-L-T-C-K-D-N-D-T
433	O13	1.714.754	G-Q-L-T-C-K-D-N-D-T-K-C-K-D-F
434	O14	1.746.690	K-D-N-D-T-K-C-K-D-F-V-C-N-C-D
435	O15	1.685.758	K-C-K-D-F-V-C-N-C-D-R-T-A-A-L
436	O16	1.584.710	V-C-N-C-D-R-T-A-A-L-C-F-A-K-A
437	O17	1.666.850	R-T-A-A-L-C-F-A-K-A-P-Y-N-N-K
438	O18	1.773.803	C-F-A-K-A-P-Y-N-N-K-N-Y-N-I-D
439	O19	1.865.873	P-Y-N-N-K-N-Y-N-I-D-P-K-R-C-Q
440	O20	1.780.966	S-V-P-P-R-P-L-N-L-I-N-F-Q-R-M
441	O21	1.790.906	P-L-N-L-I-N-F-Q-R-M-I-Q-C-T-T
442	O22	1.896.909	N-F-Q-R-M-I-Q-C-T-T-R-R-S-A-W
443	O23	1.860.847	I-Q-C-T-T-R-R-S-A-W-D-F-T-N-Y
444	O24	1.797.724	R-R-S-A-W-D-F-T-N-Y-G-C-Y-C-G
445	O25	1.470.507	D-F-T-N-Y-G-C-Y-C-G-A-G-G-S-G
446	O26	1.371.496	G-C-Y-C-G-A-G-G-S-G-T-P-V-D-E
447	O27	1.478.602	A-G-G-S-G-T-P-V-D-E-L-D-R-C-C
448	O28	1.707.837	A-E-K-V-H-G-C-K-P-L-V-M-F-Y-S
449	O29	1.841.819	G-C-K-P-L-V-M-F-Y-S-F-E-C-R-Y
450	O30	1.842.821	V-M-F-Y-S-F-E-C-R-Y-L-A-S-D-L
451	P 1	1.691.681	F-E-C-R-Y-L-A-S-D-L-D-C-S-G-N
452	P 2	1.595.692	L-A-S-D-L-D-C-S-G-N-N-T-K-C-R
453	P 3	1.673.660	D-C-S-G-N-N-T-K-C-R-N-F-V-C-N
454	P 4	1.743.749	N-T-K-C-R-N-F-V-C-N-C-D-R-T-A
455	P 5	1.684.762	N-F-V-C-N-C-D-R-T-A-T-L-C-I-L
456	P 6	1.627.759	C-D-R-T-A-T-L-C-I-L-A-A-T-Y-N
457	P 7	1.730.878	T-L-C-I-L-A-A-T-Y-N-R-N-N-H-K
458	P 8	1.755.865	A-A-T-Y-N-R-N-N-H-K-I-D-P-S-R
459	P 9	1.745.613	W-N-F-A-D-Y-G-C-Y-C-N-Y-G-G-N
460	P10	1.585.570	Y-G-C-Y-C-N-Y-G-G-N-S-T-A-V-D
461	P11	1.611.684	N-Y-G-G-N-S-T-A-V-D-Q-L-D-R-C
462	P12	1.703.787	A-K-D-N-P-A-C-K-P-I-W-D-S-P-Y

463	P13	1.742.823	A-C-K-P-I-W-D-S-P-Y-V-K-S-Y-S
464	P14	1.741.718	W-D-S-P-Y-V-K-S-Y-S-Y-T-C-S-G
465	P15	1.581.669	V-K-S-Y-S-Y-T-C-S-G-G-N-L-T-C
466	P16	1.546.592	Y-T-C-S-G-G-N-L-T-C-K-G-D-N-D
467	P17	1.542.597	G-N-L-T-C-K-G-D-N-D-E-C-G-A-F
468	P18	1.588.548	K-G-D-N-D-E-C-G-A-F-V-C-N-C-D
469	P19	1.557.626	E-C-G-A-F-V-C-N-C-D-R-S-A-A-I
470	P20	1.499.621	V-C-N-C-D-R-S-A-A-I-C-F-A-G-A
471	P21	1.596.724	R-S-A-A-I-C-F-A-G-A-P-Y-N-E-Q
472	P22	1.625.703	C-F-A-G-A-P-Y-N-E-Q-N-K-G-L-D
473	P23	1.647.723	G-T-P-V-D-D-L-D-R-C-C-Q-A-Q-K
474	P24	1.729.831	R-I-C-D-D-S-N-I-P-S-E-R-T-P-K
475	P25	1.628.794	S-N-I-P-S-E-R-T-P-K-R-C-Q-G-G
476	P26	1.786.813	E-R-T-P-K-R-C-Q-G-G-Y-N-I-C-Y
477	P27	1.774.817	R-C-Q-G-G-Y-N-I-C-Y-K-I-N-F-P
478	P28	1.820.833	Y-N-I-C-Y-K-I-N-F-P-T-P-G-Y-E
479	P29	1.759.976	K-I-N-F-P-T-P-G-Y-E-L-L-Q-I-K
480	P30	1.618.839	T-P-G-Y-E-L-L-Q-I-K-G-C-A-A-R
481	Q 1	1.583.817	L-L-Q-I-K-G-C-A-A-R-C-P-T-N-P
482	Q 2	1.587.765	G-C-A-A-R-C-P-T-N-P-R-F-P-K-A
483	Q 3	1.636.705	C-P-T-N-P-R-F-P-K-A-E-C-C-A-T
484	Q 4	1.639.795	L-I-C-Y-V-T-R-D-G-K-T-A-T-C-P
485	Q 5	1.561.723	T-R-D-G-K-T-A-T-C-P-P-G-Q-K-C
486	Q 6	1.594.737	T-A-T-C-P-P-G-Q-K-C-E-K-Y-A-V
487	Q 7	1.604.751	P-G-Q-K-C-E-K-Y-A-V-S-A-S-H-T
488	Q 8	1.755.801	E-K-Y-A-V-S-A-S-H-T-G-H-W-F-H
489	Q 9	1.848.790	S-A-S-H-T-G-H-W-F-H-R-W-H-C-T
490	Q10	1.922.773	G-H-W-F-H-R-W-H-C-T-S-T-C-H-E
491	Q11	1.788.735	R-W-H-C-T-S-T-C-H-E-G-P-Y-N-V
492	Q12	1.614.564	S-T-C-H-E-G-P-Y-N-V-C-C-S-T-D
493	Q13	1.676.750	L-I-C-Y-V-S-E-Y-G-A-K-M-T-C-P
494	Q14	1.613.732	S-E-Y-G-A-K-M-T-C-P-E-G-K-T-L
495	Q15	1.700.783	K-M-T-C-P-E-G-K-T-L-C-E-K-Y-A
496	Q16	1.708.842	E-G-K-T-L-C-E-K-Y-A-V-P-L-M-Q
497	Q17	1.831.832	C-E-K-Y-A-V-P-L-M-Q-G-H-F-Y-F
498	Q18	1.854.859	V-P-L-M-Q-G-H-F-Y-F-A-W-R-C-T
499	Q19	1.776.775	G-H-F-Y-F-A-W-R-C-T-S-T-C-K-A
500	Q20	1.643.744	A-W-R-C-T-S-T-C-K-A-G-A-Y-N-I
501	Q21	1.535.594	S-T-C-K-A-G-A-Y-N-I-C-C-S-T-D
502	Q22	1.616.689	G-A-Y-N-I-C-C-S-T-D-L-C-N-K-I
503	Q23	1.783.973	L-K-C-Y-V-G-R-K-P-Y-K-L-I-T-C
504	Q24	1.675.897	G-R-K-P-Y-K-L-I-T-C-P-E-G-S-K
505	Q25	1.576.821	K-L-I-T-C-P-E-G-S-K-K-C-A-T-V

ALTIROSTRIS 3FTx

506	Q26	1.582.839	P-E-G-S-K-K-C-A-T-V-P-L-P-T-R
507	Q27	1.651.937	K-C-A-T-V-P-L-P-T-R-P-L-P-I-F
508	Q28	1.687.901	P-L-P-T-R-P-L-P-I-F-S-K-G-C-Y
509	Q29	1.598.736	P-L-P-I-F-S-K-G-C-Y-T-S-C-P-S
510	Q30	1.652.689	S-K-G-C-Y-T-S-C-P-S-Q-Y-V-K-C
511	R 1	1.633.668	T-S-C-P-S-Q-Y-V-K-C-C-S-T-D-L
512	R 2	1.616.652	Q-Y-V-K-C-C-S-T-D-L-C-N-G-S-P
513	R 3	1.681.806	V-T-C-H-K-T-D-V-F-T-K-T-C-I-S
514	R 4	1.718.778	T-D-V-F-T-K-T-C-I-S-P-I-C-Y-E
515	R 5	1.655.815	K-T-C-I-S-P-I-C-Y-E-K-I-T-S-A
516	R 6	1.781.928	P-I-C-Y-E-K-I-T-S-A-F-I-I-E-R
517	R 7	1.593.790	K-I-T-S-A-F-I-I-E-R-G-C-G-C-P
518	R 8	1.694.812	F-I-I-E-R-G-C-G-C-P-E-T-S-R-K
519	R 9	1.621.774	G-C-G-C-P-E-T-S-R-K-V-K-V-R-C
520	R10	1.782.879	E-T-S-R-K-V-K-V-R-C-C-M-T-D-K
521	R11	1.748.772	L-I-C-Y-N-D-F-S-H-T-A-H-T-V-E
522	R12	1.695.731	D-F-S-H-T-A-H-T-V-E-H-C-Q-K-G
523	R13	1.689.749	A-H-T-V-E-H-C-Q-K-G-I-T-T-C-Y
524	R14	1.854.858	H-C-Q-K-G-I-T-T-C-Y-M-K-T-W-R
525	R15	1.923.934	I-T-T-C-Y-M-K-T-W-R-V-H-R-E-T
526	R16	1.896.999	M-K-T-W-R-V-H-R-E-T-V-I-E-R-G
527	R17	1.668.771	V-H-R-E-T-V-I-E-R-G-C-G-C-P-N
528	R18	1.526.759	V-I-E-R-G-C-G-C-P-N-V-K-P-G-V
529	R19	1.547.733	C-G-C-P-N-V-K-P-G-V-K-L-K-C-C
530	R20	1.676.878	V-K-P-G-V-K-L-K-C-C-K-T-D-R-C
531	R21	1.945.917	K-T-C-Y-K-Y-Y-S-S-F-W-K-I-T-E
532	R22	1.795.765	Y-Y-S-S-F-W-K-I-T-E-T-C-P-D-G
533	R23	1.769.764	W-K-I-T-E-T-C-P-D-G-Q-N-L-C-Y
534	R24	1.871.929	Q-N-L-C-Y-K-R-W-H-M-L-A-P-G-R
535	R25	1.911.030	K-R-W-H-M-L-A-P-G-R-Y-D-I-L-R
536	R26	1.575.808	L-A-P-G-R-Y-D-I-L-R-G-C-A-A-T
537	R27	1.593.753	Y-D-I-L-R-G-C-A-A-T-C-P-I-A-Q
538	R28	1.499.639	G-C-A-A-T-C-P-I-A-Q-N-H-D-S-I
539	R29	1.630.679	C-P-I-A-Q-N-H-D-S-I-E-C-C-A-K
540	R30	1.695.600	N-H-D-S-I-E-C-C-A-K-D-N-C-N-M
541	S 1	1.742.702	L-L-C-Y-T-H-M-S-N-S-D-E-T-T-E
542	S 2	1.654.555	H-M-S-N-S-D-E-T-T-E-C-C-Q-N-G
543	S 3	1.697.557	D-E-T-T-E-C-C-Q-N-G-M-T-T-C-Y
544	S 4	1.750.682	C-C-Q-N-G-M-T-T-C-Y-N-K-I-W-S
545	S 5	1.821.807	M-T-T-C-Y-N-K-I-W-S-D-F-R-G-T
546	S 6	1.776.916	N-K-I-W-S-D-F-R-G-T-V-I-E-R-G
547	S 7	1.636.770	D-F-R-G-T-V-I-E-R-G-C-G-C-P-K
548	S 8	1.708.828	V-I-E-R-G-C-G-C-P-K-T-E-Y-R-V

549	S 9	1.702.755	C-G-C-P-K-T-E-Y-R-V-K-I-T-C-C	ALTIROSTRIS PLa2
550	S10	1.789.805	T-E-Y-R-V-K-I-T-C-C-Q-T-D-K-C	
551	S11	1.668.750	M-Q-C-Y-K-C-G-V-S-G-C-H-L-K-I	
552	S12	1.550.642	C-G-V-S-G-C-H-L-K-I-T-C-S-E-D	
553	S13	1.817.768	C-H-L-K-I-T-C-S-E-D-E-K-F-C-Y	
554	S14	1.912.834	T-C-S-E-D-E-K-F-C-Y-K-R-Y-N-K	
555	S15	1.994.045	E-K-F-C-Y-K-R-Y-N-K-I-S-F-I-R	
556	S16	1.818.945	K-R-Y-N-K-I-S-F-I-R-T-Y-G-C-A	
557	S17	1.691.790	I-S-F-I-R-T-Y-G-C-A-K-T-C-T-E	
558	S18	1.719.676	T-Y-G-C-A-K-T-C-T-E-E-N-N-W-T	
559	S19	1.747.707	K-T-C-T-E-E-N-N-W-T-A-S-V-Y-C	
560	S20	1.717.697	E-N-N-W-T-A-S-V-Y-C-C-T-T-N-L	
561	S21	1.429.480	Y-A-D-Y-G-C-Y-C-G-S-G-G-G-T	
562	S22	1.399.527	C-Y-C-G-S-G-G-G-T-P-V-D-D-L	
563	S23	1.491.597	G-G-G-G-T-P-V-D-D-L-D-R-C-C-Q	
564	S24	1.712.587	D-R-C-C-Q-A-H-D-N-C-Y-G-E-A-E	
565	S25	1.675.661	A-H-D-N-C-Y-G-E-A-E-T-V-H-K-C	
566	S26	1.780.777	Y-G-E-A-E-T-V-H-K-C-N-P-F-W-T	
567	S27	1.920.839	T-V-H-K-C-N-P-F-W-T-F-Y-S-Y-E	
568	S28	1.856.724	N-P-F-W-T-F-Y-S-Y-E-C-S-E-G-Q	
569	S29	1.799.702	F-Y-S-Y-E-C-S-E-G-Q-L-T-C-R-D	
570	S30	1.657.602	C-S-E-G-Q-L-T-C-R-D-N-D-T-N-C	
571	T 1	1.759.722	L-T-C-R-D-N-D-T-N-C-K-E-F-V-C	
572	T 2	1.745.658	N-D-T-N-C-K-E-F-V-C-N-C-D-L-E	
573	T 3	1.704.684	K-E-F-V-C-N-C-D-L-E-A-A-N-C-F	
574	T 4	1.628.685	N-C-D-L-E-A-A-N-C-F-A-K-A-P-Y	
575	T 5	1.702.755	A-A-N-C-F-A-K-A-P-Y-I-E-E-N-Y	
576	T 6	1.764.857	A-K-A-P-Y-I-E-E-N-Y-N-I-N-L-N	

9. ANEXOS

9.1. ARTIGOS PUBLICADOS

9.1.1. EM PRIMEIRA AUTORIA

- Diversity of astacin-like metalloproteases identified by transcriptomic analysis in Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom and in vitro activity characterization. *BIOCHIMIE*, v. 167, p. 81-92, 2019.

9.1.2. COMO COLABORADORA

- Immunoprotection against lethal effects of *Crotalus durissus* snake venom elicited by synthetic epitopes trapped in liposomes. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, v. 161, p. 299-307, 2020.
- Comparative Evaluation of Rapid Salivary RT-LAMP Assay for Screening of SARS-CoV-2 Infection. *SSRN Electronic Journals: The English & Commonwealth Law Abstracts Journal*, 2021.