

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

Kelton Gonçalves Miranda

TRANSCRIPTOMA DAS GLÂNDULAS DE VENENO DO ESCORPIÃO PERUANO
***HADRUIDES LUNATUS*: uma busca por componentes relacionados à síndrome do**
envenenamento

Belo Horizonte

2023

Kelton Gonçalves Miranda

**TRANSCRIPTOMA DAS GLÂNDULAS DE VENENO DO ESCORPIÃO PERUANO
HADRUIOIDES LUNATUS: uma busca por componentes relacionados à síndrome do
envenenamento**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtegui

Belo Horizonte

2023

043

Miranda, Kelton Gonçalves.

Transcriptoma das glândulas de veneno do escorpião peruano *Hadrurus lunatus*: uma busca por componentes relacionados à síndrome do envenenamento [manuscrito] / Kelton Gonçalves Miranda. – 2023.

90 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtegui.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Venenos de Escorpião. 3. Neurotoxinas. 4. Peptídeos. 5. Toxicidade. I. Olórtegui, Carlos Delfin Chávez. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575



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

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO	347/2023 entrada
Kelton Gonçalves Miranda	1º/2022 CPF: 121.900.686-65

Às quatorze horas do dia **06 de setembro de 2023**, reuniu-se a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Transcriptoma das glândulas de veneno do escorpião peruano Hadruroides lunatus: uma busca por componentes relacionados à síndrome do envenenamento**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Carlos Delfin Chávez Olórtegui**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Carlos Delfin Chávez Olórtegui	UFMG	455.731.316-72	APROVADO
Clara Guerra Duarte	FUNED	061.826.016-12	APROVADO
Maria Raquel Santos Carvalho	UFMG	349.651.730-15	APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **APROVADO**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato 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, 06 de setembro de 2023.

Carlos Delfin Chávez Olórtegui-UFMG

Clara Guerra Duarte- FUNED

Maria Raquel Santos Carvalho-UFMG



Documento assinado eletronicamente por **Maria Raquel Santos Carvalho, Membro**, em 06/09/2023, às 16:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Delfin Chavez Olortegui, Professor do Magistério Superior**, em 06/09/2023, às 16:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Clara Guerra Duarte, Usuário Externo**, em 06/09/2023, às 17:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2603008** e o código CRC **287DDEB2**.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Chávez, pela orientação e por todos os ensinamentos;

Aos membros da banca avaliadora, pela atenção e pelo compartilhamento de experiências;

A todos os membros do Programa de Pós-Graduação em Genética da UFMG, pela atenção e por todas as trocas de conhecimentos;

Aos membros do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas (Labimq), pelo excelente convívio e pela troca de experiências;

À Dra. Izabela Mamede, à Me. Raniele Moreira e aos membros do Serviço de Toxinologia Molecular da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), pelos ensinamentos e pelo auxílio nos experimentos;

À CAPES, pela concessão da bolsa;

À minha família e aos meus amigos, por me acompanharem durante mais essa etapa.

RESUMO

Hadruidoidea lunatus (Scorpiones, Caraboctonidae) é o escorpião que mais causa acidentes no Peru. Poucos estudos relataram os efeitos do envenenamento causado por essa espécie e pouco se sabe sobre a diversidade de componentes produzidos em suas glândulas de veneno, o que dificulta a compreensão da dinâmica desse escorpionismo (i.e., acidente causado pela picada de escorpião). Utilizando análise transcriptômica, nós identificamos 145 componentes das glândulas de veneno de *H. lunatus* que podem estar associados à síndrome do envenenamento. Esses componentes foram agrupados em seis famílias: neurotoxinas (n = 15), peptídeos La1-like (n = 2), peptídeos lineares citotóxicos (n = 35), peptídeos *scorpine-like* (n = 3), *venom proteins* (n = 51) e enzimas (n = 39). Nós também inferimos o nível de transcrição (FPKM) de cada um desses componentes. A família dos peptídeos lineares citotóxicos – peptídeos tóxicos e sem ponte dissulfeto – foi a que registrou maior nível de transcrição (> 56% do transcriptoma analisado). Já a família das neurotoxinas, grupo mais abundante e mais expresso no veneno de escorpiões da família Buthidae, foi representada por apenas cinco putativas KTxs e dez peptídeos *toxin-like* pouco transcritos em *H. lunatus*. A abundância de componentes inseridos nos grupos dos peptídeos lineares citotóxicos e das neurotoxinas parece representar as maiores diferenças entre a composição dos venenos de escorpiões butídeos (i.e., da família Buthidae) e não butídeos. Os três componentes aqui classificados como *scorpine-like* apresentaram os dois domínios estruturais esperados para esse grupo (N- e C- terminal) e são putativos antimicrobianos e bloqueadores de canais K⁺. Os peptídeos genericamente classificados como *venom proteins*, assim denominados pela falta de caracterização desses componentes até o presente momento, apresentou diversidade de sequências e porcentagem de transcrição relevantes (51 sequências e cerca de 19% do nível de transcrição). No grupo das enzimas de *H. lunatus*, identificamos dezenas de componentes que podem atuar sinergicamente no envenenamento, e não registramos atividade da enzima L-aminoácido oxidase (LAAO) usando 20 µg do veneno total de *H. lunatus*. Nossos resultados demonstram que vários componentes identificados apresentam *motifs* e padrões de conservação esperados para os respectivos grupos. Quando avaliados conjuntamente com os resultados de novos estudos sobre o tema, nossos achados fornecerão uma melhor compreensão das atividades biológicas e de toda a dinâmica do escorpionismo causado por *H. lunatus*.

Palavras-chave: Escorpionismo; Glândulas de Veneno; Neurotoxinas; Peptídeos; Toxicidade.

ABSTRACT

Hadruiroides lunatus (Scorpiones, Caraboctonidae) is the scorpion that causes the most accidents in Peru. Few studies have reported the effects of the envenomation caused by this species, and little is known about the diversity of components found in its venom glands, making it difficult to understand the dynamics of this scorpionism (i.e., accident caused by a scorpion sting). Using transcriptomic analysis, we identified 145 components of *H. lunatus* venom glands that may be associated with the envenomation syndrome. These components were grouped into six families: neurotoxins (n = 15), La1-like peptides (n = 2), cytotoxic linear peptides (n = 35), scorpine-like peptides (n = 3), venom proteins (n = 51) and enzymes (n = 39). We also inferred the transcription level (FPKM) of each of these components. The family of cytotoxic linear peptides – toxic peptides without disulfide bridges – was the one that recorded the highest level of transcription (> 56% of the analyzed transcriptome). The neurotoxin family, the most abundant and expressed group in the venom of Buthidae scorpions, was represented by only five putative KTx and ten toxin-like peptides that are poorly transcribed in *H. lunatus*. The abundance of components included in the groups of cytotoxic linear peptides and neurotoxins seems to represent the major differences between the composition of buthid scorpion venoms (i.e., from the family Buthidae) and non-buthid scorpion venoms. The three components classified here as scorpine-like presented the two expected structural domains for this group (N- and C-terminal) and are putative antimicrobials and K⁺ channel blockers. The peptides generically classified as venom proteins, so called due to the lack of characterization of these components to date, showed a diversity of sequences and a relevant percentage of transcription (51 sequences and about 19% of the transcription level). In the group of *H. lunatus* enzymes, we identified dozens of components that can act synergistically in the envenomation, and we did not register the activity of the enzyme L-amino acid oxidase (LAO) using 20 µg of whole *H. lunatus* venom. Our results show that several of the identified components display motifs and expected conservation patterns for the respective groups. Taken together with the results of new studies on the subject, our findings will provide a better understanding of the biological activities and overall dynamics of scorpionism caused by *H. lunatus*.

Keywords: Neurotoxins; Peptides; Scorpionism; Toxicity; Venom Glands.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Escorpiões	10
1.2. Escorpionismo e saúde pública	11
1.3. <i>Hadruidoidea lunatus</i> (L. Koch, 1867).....	13
1.4. Identificação de componentes do veneno por transcriptômica e bioinformática.....	14
2. OBJETIVO GERAL	16
2.1. Objetivos específicos	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Coleta de amostras e extração do RNA total	16
3.2. Construção e sequenciamento da biblioteca	17
3.3. Análise bioinformática.....	17
3.4. Cálculo do nível de transcrição (FPKM)	18
3.5. SDS-PAGE	18
3.6. Atividade de L-aminoácido oxidase (LAAO).....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Sequenciamento e visão geral do transcriptoma.....	19
4.2. Estimativa do nível de transcrição	24
4.3. Perfil do veneno total de <i>Hadruidoidea lunatus</i>	27
4.4. Neurotoxinas	29
4.5. Peptídeos La1-like.....	34
4.6. Peptídeos lineares citotóxicos	35
4.7. Peptídeos <i>scorpine-like</i>	38
4.8. <i>Venom proteins</i>	40
4.9. Enzimas.....	40
CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICES	61
APÊNDICE A – Putativas neurotoxinas de <i>Hadruidoidea lunatus</i>	61
APÊNDICE B – Putativos peptídeos La1-like de <i>Hadruidoidea lunatus</i>	64
APÊNDICE C – Putativos peptídeos lineares citotóxicos de <i>Hadruidoidea lunatus</i>	65
APÊNDICE D – Putativos peptídeos <i>scorpine-like</i> de <i>Hadruidoidea lunatus</i>	70
APÊNDICE E – Putativas <i>venom proteins</i> de <i>Hadruidoidea lunatus</i>	71

APÊNDICE F – Putativas enzimas de <i>Hadrroides lunatus</i>	79
APÊNDICE G – Artigos publicados durante o mestrado	88

1. INTRODUÇÃO

1.1. Escorpiões

Os escorpiões (Arachnida, Scorpiones) constituem umas das ordens de artrópodes mais antigas e morfologicamente conservadas (Lourenço, 2018a). Os primeiros representantes dessa ordem foram organismos aquáticos que surgiram durante o período Siluriano (444–416 milhões de anos atrás) e o primeiro escorpião terrestre é datado como pertencente ao Devoniano Superior ou ao Carbonífero Inferior (i.e., cerca de 359 milhões de anos atrás) (Lourenço, 2015).

Esse grupo é atualmente representado por 22 famílias e cerca de 2.760 espécies em todo o mundo, com exceção da Antártida (Rein, 2023). Os escorpiões costumam ser encontrados em regiões tropicais e subtropicais, e registros de várias espécies apontam para uma adaptação ao ambiente antrópico (Chippaux & Goyffon, 2008; Guerra-Duarte et al., 2023).

Morfologicamente, o corpo dos escorpiões é dividido em duas partes: prossoma (ou cefalotórax) e opistossoma (ou abdome) (**Figura 1**). No prossoma estão presentes: a) dorsalmente, uma carapaça e um par de olhos medianos; b) ventralmente, um esterno e as coxas das pernas (Mullen & Sissom, 2019). Além disso, nessa parte estão presentes alguns apêndices característicos, como um par de quelíceras e um par de pedipalpos. No opistossoma estão presentes, dentre outros caracteres, um par de péctens ventral – com função quimiorreceptora e mecanorreceptora – e o telson, último segmento posterior, o qual apresenta uma vesícula com duas glândulas de veneno e um acúleo inoculador (Mullen & Sissom, 2019; Simone & Meijden, 2021).

Quanto à reprodução, os escorpiões são vivíparos que podem se reproduzir sexuadamente ou via partenogênese, i.e., através do desenvolvimento de ovos não fertilizados (Lourenço, 2018b). Esse último fenômeno, apesar de raro, é evidenciado principalmente em escorpiões do gênero *Tityus* (família Buthidae). A partenogênese é uma estratégia reprodutiva complexa, já que pode produzir a) ninhadas só de fêmeas; b) ninhadas só de machos, como registrado unicamente na espécie *Tityus metuendus*; ou c) ninhadas de machos e fêmeas, conforme registrado exclusivamente na espécie *Tityus neblina* (Lourenço, 2008; Lourenço, 2018b).

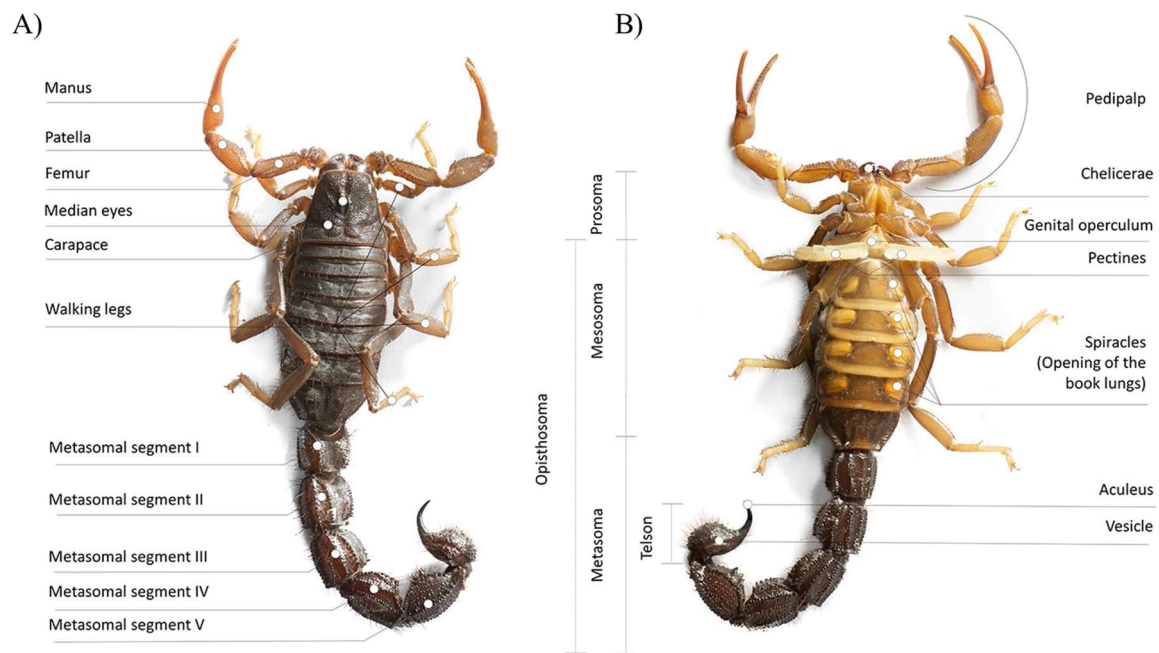


Figura 1. Anatomia externa dos escorpiões, representada em um indivíduo da espécie *Parabuthus transvaalicus* (família Buthidae). **A)** Visão dorsal. **B)** Visão ventral. Fonte: adaptado de Simone & Meijden (2021).

Os escorpiões são aracnídeos predadores. Eles se alimentam principalmente de insetos, aranhas e outros aracnídeos (Williams, 1987), mas a sua frequência de predação é considerada baixa. Estudos indicam que algumas espécies precisam se alimentar uma única vez a cada duas semanas para a manutenção da sua biomassa, enquanto outras podem ficar até 10 semanas sem alimentação (Williams, 1987). Num estudo com o escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* foi registrado que alguns indivíduos suportam até 87 dias sem água e até 400 dias sem alimentação – inclusive, com espécimes se reproduzindo, via partenogênese, após mais de 200 dias de privação alimentar (Pimenta et al., 2019).

Esse conjunto de características e comportamentos, somado à longevidade média de 3 a 7 anos da maioria dos representantes dessa antiga ordem (Mullen & Sissom, 2019), demonstra o quão adaptado está esse grupo de organismos aos seus variados habitats atuais.

1.2. Escorpionismo e saúde pública

O veneno secretado pelos escorpiões é uma mistura complexa de componentes (e.g., sais, peptídeos, enzimas, dentre outros), produzida por um par de glândulas localizadas no telson (Gomes et al., 2010; Mullen & Sissom, 2019). Entende-se como escorpionismo o envenenamento causado pela picada de escorpiões e seus demais efeitos no organismo.

O escorpionismo representa um problema de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais, com estimativas anuais sugerindo mais de 1 milhão de acidentes e mais de 3.000 mortes (Chippaux & Goyffon, 2008; Santos et al., 2016). Merece destaque o fato de que homens adultos são as principais vítimas do escorpionismo em humanos, mas os acidentes com maiores níveis de severidade e letalidade são aqueles que vitimam crianças (Chippaux & Goyffon, 2008; Guerra-Duarte et al., 2023).

Apesar do alto número de espécies de escorpiões existentes, poucas espécies são responsáveis pelos acidentes mais severos e/ou letais. Lourenço (2018a) sugere que menos de 50 espécies, em todo o mundo, merecem atenção especial por esse motivo – a maioria delas pertencente à família Buthidae, com poucas exceções a espécies das famílias Hemiscorpiidae e Scorpionidae.

Na maioria dos casos, a dor local e intensa é o único sintoma do escorpionismo (Chippaux & Goyffon, 2008; Isbister & Bawaskar, 2014). Contudo, os acidentes escorpiônicos podem ocasionar manifestações sistêmicas, caracterizadas principalmente por quadros de excitação neurotóxica provocados pela atividade das neurotoxinas presentes no veneno, sobretudo as toxinas com atividades em canais iônicos de sódio (Cid-Urbe et al., 2020). Esses quadros, por sua vez, podem causar ou ser seguidos por síndrome do desconforto respiratório, edema pulmonar, disfunção cardíaca, dentre outras manifestações severas, a depender da espécie causadora do acidente (Isbister & Bawaskar, 2014; Santos et al., 2016).

Juntamente com as neurotoxinas, outros componentes das glândulas de veneno de escorpiões podem contribuir para o surgimento dessas manifestações sistêmicas, como, por exemplo, as metaloproteases (Carmo et al., 2014), hialuronidases (Oliveira-Mendes et al., 2019), fosfolipases (Valdivia et al., 1992) e alguns peptídeos sem ponte dissulfeto (Verano-Braga et al., 2008).

Para o tratamento da dor local, é indicado o uso de analgésicos ou de anestésicos locais, dependendo da severidade (Isbister & Bawaskar, 2014). Já para o tratamento das manifestações sistêmicas provocadas por escorpionismo, é recomendado o uso de antivenenos (ou soros terapêuticos), os quais neutralizam as neurotoxinas e outros componentes, impedindo-os de atuarem nos seus respectivos alvos (Isbister & Bawaskar, 2014; Borges et al., 2020). Entretanto apenas três soros terapêuticos são disponibilizados atualmente nas Américas, todos eles anti-*Tityus* spp.: anti-*T. serrulatus* no Brasil, anti-*T. carrilloi* na Argentina e anti-*T. discrepans* na Venezuela (Borges et al., 2020).

1.3. *Hadruioides lunatus* (L. Koch, 1867)

Hadruioides lunatus é a espécie de escorpião que causa o maior número de acidentes no Peru (Ministerio de Salud del Peru, 2005). Comumente conhecido como "escorpión de los pedregales", é o mais abundante na Costa Central peruana, sendo encontrado principalmente em áreas montanhosas e pedregosas no deserto costeiro do Pacífico (**Figura 2**) (Zavaleta et al., 1981; Ochoa & Prendini, 2010).

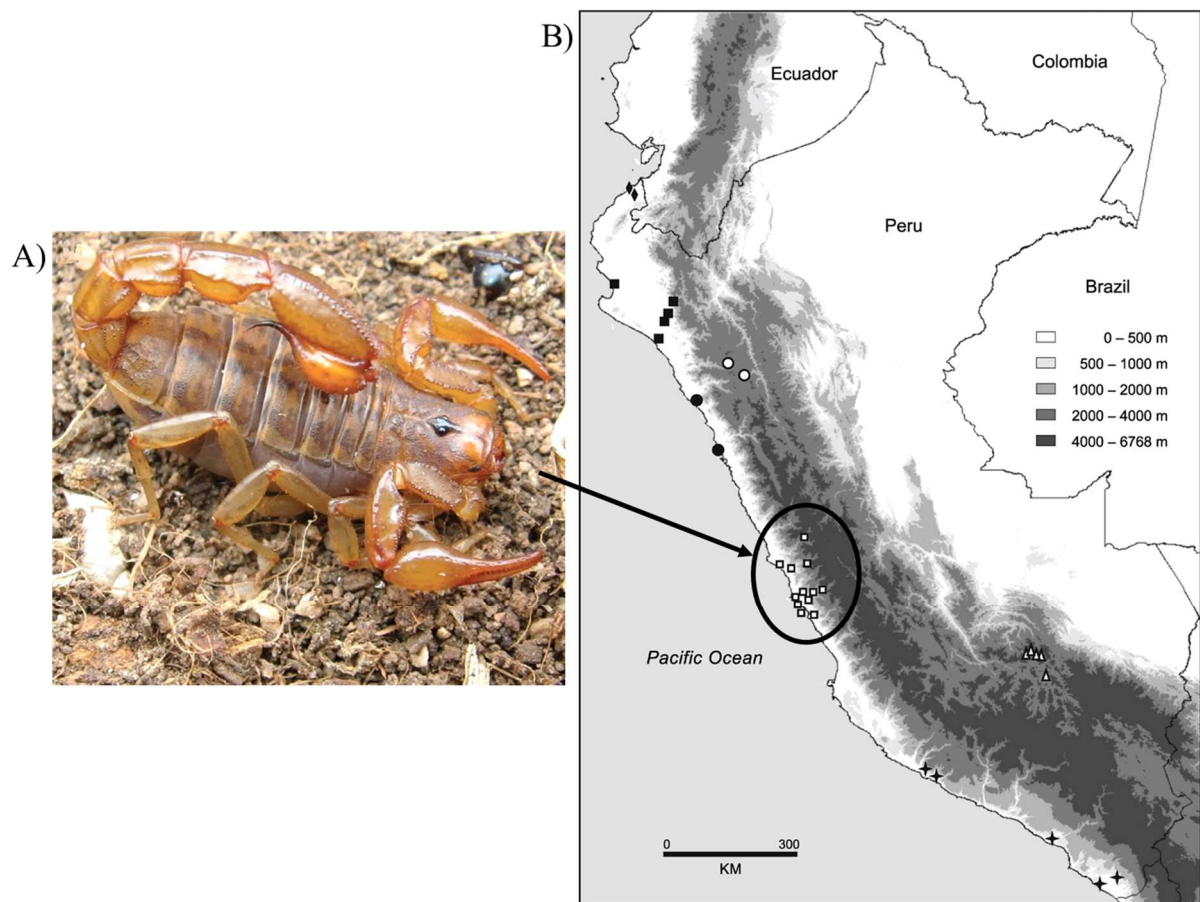


Figura 2. Distribuição do escorpião *Hadruioides lunatus* (família Caraboctonidae) no Peru. **A)** Fotografia de uma fêmea de *H. lunatus*. **B)** Mapa da distribuição de espécies do gênero *Hadruioides* Pocock, 1893 no Peru. Os quadrados brancos em destaque indicam os locais de ocorrência de *H. lunatus*, na Costa Central peruana (província de Lima). Fonte: adaptado de Ochoa & Prendini (2010).

Poucos estudos registraram os efeitos causados pelo escorpionismo por *H. lunatus*. Como exemplo, Quiroz (1967) registrou que a picada de *H. lunatus* pode produzir dor intensa, edema e formação de escara, enquanto Zavaleta e colaboradores (1981) demonstraram que o veneno dessa espécie causa baixa letalidade em camundongos e induz uma queda na pressão arterial de cães. Além disso, Escobar et al. (2002) purificaram parcialmente três toxinas

produzidas por esse escorpião, denominadas H11, H12 e H13, as quais apresentaram atividade tóxica em insetos, crustáceos e camundongos, respectivamente.

Resultados do nosso grupo confirmaram a baixa letalidade do veneno total de *H. lunatus* em camundongos, o qual apresentou uma dose letal mediana (DL_{50} ; quantidade de veneno capaz de levar à morte 50% dos indivíduos testados), via intraperitoneal, de 21,55 mg/kg (Costal-Oliveira et al., 2012). Esses autores também observaram o surgimento de efeitos como agitação, excitabilidade, salivação, convulsão e paralisia (i.e., manifestações sistêmicas), após o envenenamento de camundongos, e demonstraram uma alta atividade das fosfolipases presentes no veneno total (0,125 μ g de veneno foi capaz de formar um halo hemolítico de 1 cm de diâmetro), enzimas que podem exercer efeitos tóxicos e inflamatórios (Lambeau & Lazdunski, 1999; Vergara et al., 2014). Além disso, em outros estudos do nosso grupo, foi demonstrado que o envenenamento por *H. lunatus* pode alterar os padrões hematológicos e imunológicos e causar danos cardiorrespiratórios (Costal-Oliveira et al., 2015; Costal-Oliveira et al., 2017).

Apesar dessas manifestações clínicas observadas, pouco se sabe sobre a diversidade de componentes produzida nas glândulas de veneno de *H. lunatus*. Atualmente, nenhuma informação sobre a composição do veneno de espécies do gênero *Hadruidoidea* é encontrada nas bases de dados do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; Sayers et al., 2023) e poucos registros são encontrados para a família Caraboctonidae. Essa falta de conhecimento dificulta o entendimento da dinâmica do escorpionismo causado por essas espécies.

1.4. Identificação de componentes do veneno por transcriptômica e bioinformática

Uma das principais técnicas usadas para identificar componentes das glândulas de veneno é a transcriptômica. Essa técnica é geralmente aplicada de forma isolada (Ma et al., 2009; Tan et al., 2017; Kalapothakis et al., 2021; Kalapothakis et al., 2023) ou de forma conjunta com a proteômica para a descrição ampla de novos componentes (Rokyta & Ward, 2017; De Oliveira et al., 2018; Diniz et al., 2018; Hofmann et al., 2018).

Entende-se por transcriptômica a técnica de estudo do conjunto de transcritos (i.e., RNA) de uma determinada célula, tecido ou organismo. Além da importância dessa técnica na identificação de componentes, ela também se revela útil na avaliação de perfis de expressão gênica, na identificação de *single-nucleotide polymorphism* (SNP) e *splicing* alternativo, dentre outras aplicações (Mutz et al., 2013). No entanto, assim como qualquer outra técnica, a transcriptômica apresenta limitações. É reconhecido que uma análise transcriptômica apresenta, por exemplo, dificuldades para identificar isoformas corretamente e para inferir as atividades

biológicas dos putativos componentes a partir da presença e/ou abundância de transcritos (Evans, 2015; Mouchbahani-Constance & Sharif-Naeini, 2021). Porém essa não é uma regra absoluta, e estudos recentes têm demonstrado uma corroboração entre os achados transcriptômicos e imunoquímicos (Kalapothakis et al., 2023; Kalapothakis et al., *em submissão*).

Com o avanço do sequenciamento de nova geração (NGS), uma estratégia rápida e de alto rendimento, cada vez mais estudos utilizam esse método para a realização de transcriptomas (Mutz et al., 2013; Mouchbahani-Constance & Sharif-Naeini, 2021). Geralmente, um NGS de glândulas de veneno produz dezenas de milhões de fragmentos de cDNA de alta qualidade (denominados *reads*) (Mouchbahani-Constance & Sharif-Naeini, 2021). As *reads* produzidas (i.e., os resultados brutos de um sequenciamento) devem ser tratadas e podem ser montadas – originando os chamados *contigs* – de diferentes formas. Para o tratamento das *reads* brutas, é comum que sejam eliminadas as *reads* menores (processo denominado filtragem) e que sejam usadas apenas as *reads* com alta qualidade (processo denominado trimagem por *Q score*) (Kalapothakis et al., 2021; Kalapothakis et al., 2023). Já para a montagem das sequências, duas estratégias são importantes: a montagem baseada em referência e a montagem *de novo*. Sugestivamente, a primeira estratégia requer a utilização de uma ou mais sequências como referência para o alinhamento (ou mapeamento) das *reads* tratadas. Por outro lado, a segunda estratégia não utiliza referências, mas requer maior poder computacional para a montagem automática de sequências (Martin & Wang, 2011). Dessa forma, é importante que ambas as estratégias sejam empregadas para a identificação completa e correta de componentes, uma vez que ambas apresentam limitações metodológicas.

Assim, usando análise transcriptômica e bioinformática, este trabalho visou identificar novos componentes bioativos das glândulas de veneno do escorpião *H. lunatus* e comparar a ação putativa desses componentes com os efeitos previamente registrados do envenenamento causado por essa espécie. Com base nas manifestações clínicas reportadas e nos transcriptomas das espécies *H. gertshi* e *H. spadix* (únicos escorpiões da família Caraboctonidae com informações disponibilizadas no NCBI), levantamos a hipótese de que as glândulas de veneno de *H. lunatus* apresentariam, principalmente: I) baixa diversidade e baixo nível de transcrição de toxinas de canais de sódio (NaTx), os componentes mais letais dos venenos de escorpiões (Cid-Uribe et al., 2020); II) alta diversidade e baixa transcrição de toxinas de canais de potássio (KTx); e III) alto nível de transcrição de fosfolipases do tipo A2 (PLA2).

2. OBJETIVO GERAL

Identificar, através de análise transcriptômica e bioinformática, componentes das glândulas de veneno de *Hadruroides lunatus* que podem estar relacionados ao escorpionismo causado pela espécie, juntamente com seus respectivos níveis transcricionais, e inferir as possíveis atividades biológicas de cada componente identificado.

2.1. Objetivos específicos

I) Identificar componentes/sequências das glândulas de veneno através de sequenciamento NGS e bioinformática;

II) Avaliar a similaridade das sequências de *H. lunatus* com sequências depositadas no NCBI e/ou publicadas;

III) Calcular o nível de transcrição de cada componente;

IV) Inferir as prováveis atividades biológicas de cada componente identificado, através da análise da estrutura primária das sequências.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta de amostras e extração do RNA total

Seis espécimes de *H. lunatus* foram coletados na região de Atocongo (Lima, Peru) e utilizados para a extração do RNA total das glândulas de veneno. Três deles tiveram seu veneno ordenhado três dias antes da extração do RNA e três não foram ordenhados previamente. A ordenha ocorreu por estimulação elétrica do telson (Oukkache et al., 2013), aplicando-se uma tensão de 12 volts e utilizando tampão fosfato-salino (PBS 1X) como condutor. O estímulo elétrico foi aplicado em metade dos indivíduos para permitir a identificação da maior diversidade possível de componentes das glândulas de veneno, isso porque diferentes abordagens encontradas na literatura sugerem que o tempo entre a ordenha do veneno e a extração do RNA total pode interferir no resultado qualitativo e/ou quantitativo de um transcriptoma. A fins de exemplo, a composição das glândulas de escorpiões já foi avaliada sem ordenha prévia (Morgenstern et al., 2011), três dias após a ordenha (Guatimosim et al., 1999) e cinco dias após a ordenha (Romero-Gutierrez et al., 2017). Os venenos ordenhados foram diluídos em água ultrapura e armazenados a -20 °C para uso posterior. Para a extração e a purificação do RNA total, as glândulas de veneno de todos os seis espécimes foram extraídas e maceradas em 500 µL de reagente TRI (Sigma) (Chomczynski & Sacchi, 1987), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade e a pureza do RNA total foram avaliadas por

NanoDrop (Thermo Scientific) e eletroforese em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídio.

3.2. Construção e sequenciamento da biblioteca

Para a montagem da biblioteca de cDNA, utilizamos o TruSeq RNA Sample Set Kit (v2) e o TruSeq RNA Library Preparation Kit (v2, Set A) com 1 µg de RNA total do mix de todas as glândulas de veneno, conforme protocolo do fabricante. Para normalização para 10 pM, a biblioteca foi quantificada usando o kit de quantificação de biblioteca KAPA (Illumina®). O sequenciamento foi realizado em um sequenciador automatizado MiSeq (Illumina®), usando um kit de reagentes MiSeq v3 de 600 ciclos para estratégia *paired-end* (i.e., *output* 2 x 300) de acordo com as instruções do fabricante.

3.3. Análise bioinformática

O método de montagem dos *contigs* foi realizado conforme descrito por Kalapothakis et al. (2021). Usamos o programa Geneious Prime 2022.0.2 (<https://www.geneious.com>) para filtrar e trinar as *reads* brutas. Aplicamos filtragem ≥ 50 pb, para remover as sequências de adaptadores, e uma trimagem com qualidade *Q score* ≥ 30 (i.e., precisão de bases de 99,9%). Para a identificação de componentes, adotamos duas estratégias: primeiro, realizamos uma montagem *de novo* (i.e., sem referência) usando as *reads* filtradas e trimadas. Seleccionamos os primeiros 1.000 *contigs* e realizamos uma busca manual nas bases de dados BlastX (nucleotídeo para proteína) (Camacho et al., 2009) para encontrar correspondências com sequências homólogas relacionadas ao envenenamento, como, por exemplo, neurotoxinas, fosfolipases, hialuronidases, metaloproteases, dentre outras. Dessa forma, nós desconsideramos dos nossos resultados as sequências de genes mitocondriais, de componentes estruturais celulares, etc. Em segundo lugar, nós seleccionamos sequências de nucleotídeos de componentes relacionados ao envenenamento de *Hadrurus gertschi* e *Hadrurus spadix*, também escorpiões caraboctonídeos (i.e., pertencentes à família Caraboctonidae), e *Tityus serrulatus*, um butídeo (i.e., pertencente à família Buthidae) bem estudado, dos bancos de dados do NCBI. Essas sequências foram então compiladas em um banco de dados em arquivo FASTA, que foi usado para a estratégia de mapeamento com referência, usando as *reads* filtradas e trimadas, com a intenção de identificar sequências não encontradas pela montagem *de novo*. Para aumentar a segurança desses resultados, os *contigs* formados nessa segunda estratégia (mapeamento com referência) foram posteriormente confirmados por meio de montagens *de novo*. Usamos a ferramenta ExPASy Translate (Artimo et al., 2012) para cortar as sequências precursoras finais de nucleotídeos e

aminoácidos a serem posteriormente depositadas no GenBank (i.e., para que cada sequência iniciasse com o correto *start codon* e terminasse no devido *stop codon*). Todas as sequências foram inicialmente classificadas e nomeadas de acordo com as correspondências mais próximas (mais similares) encontradas em todos os bancos de dados BlastP (proteína para proteína). As mudanças de nomenclatura e classificação de sequências serão discutidas nas suas respectivas seções. As características esperadas para as estruturas primárias de cada família de componentes (e.g., tamanho, quantidade de resíduos de cisteínas, conservação de *motifs*, etc.) foram avaliadas através de dados da literatura e de ferramentas como o NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e o InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

3.4. Cálculo do nível de transcrição (FPKM)

Devido à estratégia de sequenciamento *paired-end*, nós estimamos o nível de transcrição de cada sequência de *H. lunatus* através do cálculo de fragmentos por quilobase por milhão (FPKM) (Van Verk et al., 2013). O arquivo FASTA com todas as sequências de nucleotídeos identificadas neste trabalho foi usado como referência para o alinhamento de todas as *reads*, usando o STAR (Dobin et al., 2013). As contagens brutas foram calculadas usando featureCounts (Liao et al., 2014) e convertidas para FPKM usando edgeR (Robinson et al., 2010), de acordo com o número total de *reads* mapeadas em sequenciamento *paired-end*. Assim, a estimativa do nível de transcrição de todas as sequências encontradas neste trabalho foi baseada nos valores de FPKM, os quais foram estimados a partir das contagens brutas das *reads* do transcriptoma alinhadas ao arquivo FASTA de referência. Dessa forma, o nível de transcrição refere-se somente à fração do transcriptoma analisado, ou seja, a fração dos componentes identificados por este trabalho.

3.5. SDS-PAGE

Realizamos uma eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para visualizar os perfis dos venenos totais de *H. lunatus* e de um representante da família Buthidae (*T. serrulatus*). O veneno de *T. serrulatus* foi gentilmente doado pelo Serviço de Toxinologia Molecular, da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Ambos os venenos foram extraídos por estimulação elétrica do telson (Oukkache et al., 2013), diluídos em água ultrapura e armazenados a -20 °C. Usamos o kit *DC Protein Assay* (Bio-Rad) para quantificar os venenos. Nós preparamos um gel de separação a 16% e um gel de empilhamento a 4% e corremos 30 µg de cada veneno, em condições redutoras e não redutoras. Para ambas as condições, as amostras foram aquecidas a 95 °C durante 5 min, imediatamente antes da

aplicação no gel. Usamos 2-mercaptoetanol para a redução das pontes dissulfeto (Ye et al., 2002; Adebowale & Lawal, 2003) e utilizamos como marcador de proteínas o *Precision Plus Protein Standard*, de 10–250 kD (Bio-Rad). O gel foi corado com azul de Coomassie G-250 (Sigma).

3.6. Atividade de L-aminoácido oxidase (LAAO)

Para avaliarmos a atividade da enzima L-aminoácido oxidase (LAAO) a partir do veneno total de *H. lunatus*, nós realizamos um ensaio baseado na atividade de desaminação oxidativa da L-leucina, com liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Costal-Oliveira et al., 2019; Curti et al., 2019).

Para cada amostra, nós preparamos uma solução contendo tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5), L-Leucina 5 mM (substrato), peroxidase 5 U/mL e o-fenilenodiamina 2 mM, em volume final de 90 µL. A essa solução, nós adicionamos 10 µg e 20 µg do veneno total de *H. lunatus*, em volume final de 10 µL com água ultrapura. As amostras finais, em volume final de 100 µL, foram então aplicadas a uma microplaca e incubadas a 37 °C por 1 h. O controle negativo era composto por 90 µL de solução e 10 µL de água ultrapura e o controle positivo era composto por 90 µL de solução e 10 µL contendo 2 µg do veneno de *Bothrops atrox* (Serpentes, Viperidae). Após a incubação, as reações foram interrompidas com a adição de 50 µL de ácido sulfúrico 2 M em cada poço. A absorbância do produto gerado em cada reação foi determinada a 490 nm, usando um leitor de microplacas iMark (Bio-Rad). Para essa avaliação enzimática, nós conduzimos três ensaios independentes, em duplicata. Consideramos como uma unidade de atividade de LAAO a quantidade de veneno a produzir um µmol de H₂O₂ por minuto (Bregge-Silva et al., 2012).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sequenciamento e visão geral do transcriptoma

Nós obtivemos 42.362.248 *reads* brutas com o sequenciamento da biblioteca de cDNA das glândulas de veneno de *H. lunatus*. Após filtragem e trimagem das *reads* brutas, obtivemos 28.317.446 sequências.

Nossa dupla estratégia de busca de componentes de *H. lunatus* retornou um total de 145 sequências precursoras (**Figura 3A**). Nós agrupamos esses componentes em seis grupos principais: neurotoxinas (n = 15), peptídeos La1-like (n = 2), peptídeos lineares citotóxicos (n = 35), peptídeos *scorpine-like* (n = 3), *venom proteins* (n = 51) e enzimas (n = 39). As

sequências precursoras de aminoácidos de todos os componentes desses seis grupos e suas correspondências mais próximas retornadas pelos bancos de dados do BlastP são mostradas nos **Apêndices A–F**, respectivamente. O grupo das neurotoxinas é composto por 10 peptídeos *toxin-like* e cinco toxinas de canais de potássio (KTxs). O grupo dos peptídeos *La1-like* é formado por duas prováveis isoformas com 98% de similaridade entre si. O grupo dos peptídeos lineares citotóxicos (peptídeos sem ponte dissulfeto; ver seção 4.6) é formado por 19 sequências classificadas genericamente como peptídeos lineares citotóxicos (CYLIPs) e 16 peptídeos sem ponte dissulfeto (NDBPs). O grupo dos peptídeos *scorpine-like* é composto por três sequências, as quais podem apresentar dupla atividade biológica (ver seção 4.7). As sequências do grupo *venom proteins* (n = 51) são inteiramente e genericamente aqui classificadas como “*venom proteins*”, uma vez que não há descrição das funções biológicas dessas proteínas, até este momento. Por fim, o grupo das enzimas é composto por 21 fosfolipases, sete dissulfeto isomerases, três peptidases M2, duas enzimas conversoras de angiotensina (ACEs), duas hialuronidases, duas enzimas de amidação, uma L-aminoácido oxidase (LAAO) e um inibidor de protease.

No grupo das enzimas, identificamos uma fosfolipase A1, uma B e uma *C-like*; as outras 18 sequências correspondem a fosfolipases do tipo A2 (PLA2s). Sobre as sete enzimas dissulfeto isomerase, identificamos aqui as sequências homólogas a A3–A6, TMX3 e a duas dissulfeto isomerase-*like* (assim denominadas devido à alta similaridade com sequências previamente depositadas; ver seção 4.9). Finalmente, as duas enzimas de amidação encontradas foram a *peptidylglycine α -amidating monooxygenase* (PAM) e a *peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase* (PHM).

A lista de espécies que tiveram sequências com maior correspondência (i.e., *match*) com as 145 sequências de *H. lunatus* é mostrada na **Tabela 1**. Sequências do escorpião caraboctonídeo *H. spadix* foram as que apresentaram maior similaridade com as sequências de *H. lunatus*, de acordo com as informações disponíveis no BlastP. *Hadrurus spadix* foi a espécie com melhor *match* em 51 das 145 sequências de *H. lunatus*, porém essa maior similaridade é registrada apenas para os grupos *scorpine-like*, *venom proteins* e enzimas. As sequências de neurotoxinas, peptídeos *La1-like* e peptídeos lineares citotóxicos não tiveram como *match* principal sequências dessa espécie. Algumas das possíveis explicações para isso são discutidas nos tópicos correspondentes abaixo.

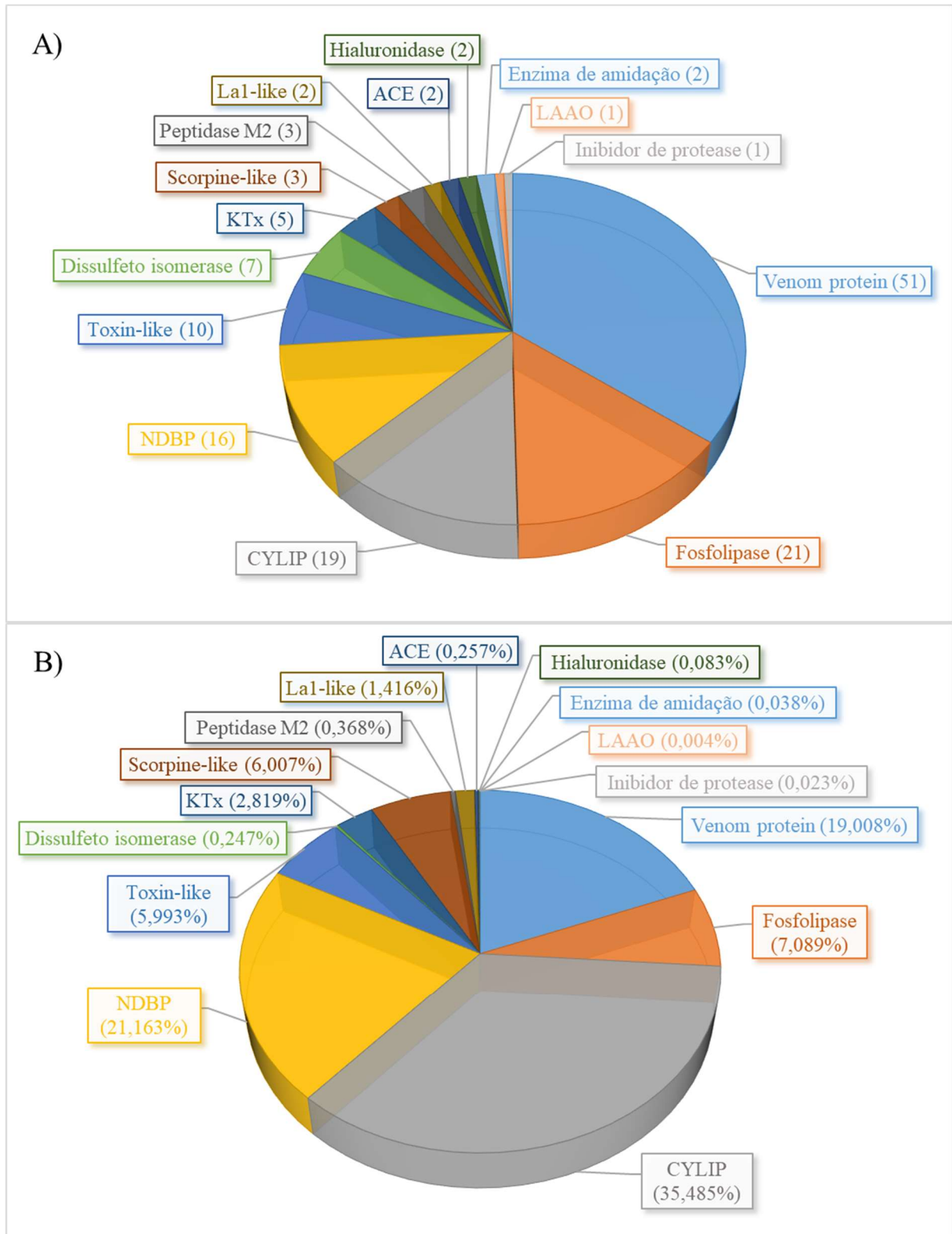


Figura 3. Diversidade de componentes identificados no transcriptoma das glândulas de veneno do escorpião carabotônido *Hadruroides lunatus*. **A)** Número de sequências identificadas ($n = 145$) por subgrupo de componentes. **B)** Porcentagem do nível de transcrição (FPKM) de cada subgrupo de componentes, em relação à fração do transcriptoma analisado (ou seja, dos 145 componentes).

Tabela 1. Espécies com sequências mais similares aos componentes de *Hadruroides lunatus*, por grupo de componentes. As buscas por similaridade foram feitas usando as sequências precursoras de aminoácidos em todas as bases de dados do BlastP. Os *matches* duplos são aqueles em que duas sequências já depositadas apresentam porcentagens de identidade e similaridade muito próximas entre si, não sendo possível escolher uma delas como o principal *match* com uma referida sequência de *H. lunatus*.

Neurotoxinas (n = 15, com três <i>matches</i> duplos)	
[Apêndice A]	
<i>Superstitionia donensis</i>	7
<i>Urodacus manicatus</i>	6
<i>Hormurus waigiensis</i>	4
<i>Hadrurus gertschi</i>	1
Peptídeos La1-like (n = 2)	
[Apêndice B]	
<i>Superstitionia donensis</i>	2
Peptídeos lineares citotóxicos (n = 35, com cinco <i>matches</i> duplos)	
[Apêndice C]	
<i>Cercophonius squama</i>	19
<i>Superstitionia donensis</i>	10
<i>Megacormus gertschi</i>	6
<i>Vaejovis smithi</i>	4
<i>Vaejovis punctatus</i>	1
Peptídeos scorpine-like (n = 3)	
[Apêndice D]	
<i>Hadrurus spadix</i>	3
Venom proteins (n = 51, com cinco <i>matches</i> duplos)	
[Apêndice E]	
<i>Hadrurus spadix</i>	34
<i>Pandinus cavimanus</i>	7
<i>Superstitionia donensis</i>	6
<i>Hadogenes troglodytes</i>	4
<i>Centruroides sculpturatus</i>	3
<i>Didymocentrus krausi</i>	1
<i>Opisthacanthus cayaporum</i>	1
Enzimas (n = 39, com nove <i>matches</i> duplos)	
[Apêndice F]	
<i>Hadrurus spadix</i>	14
<i>Hadrurus gertschi</i>	8
<i>Superstitionia donensis</i>	8
<i>Centruroides sculpturatus</i>	5
<i>Hemiscorpius lepturus</i>	5
<i>Megacormus gertschi</i>	4
<i>Araneus ventricosus</i>	1
<i>Centruroides hentzi</i>	1
<i>Limulus polyphemus</i>	1
<i>Parasteatoda tepidariorum</i>	1

O transcriptoma das glândulas de veneno de *H. lunatus* apresenta semelhanças e diferenças com aquele realizado para *H. spadix*. Uma síntese desses resultados é apresentada na **Tabela 2**. As discussões sobre as semelhanças e diferenças encontradas para cada grupo de componentes serão feitas nos tópicos correspondentes abaixo (seções 4.4 a 4.9).

Tabela 2. Comparação da diversidade de componentes identificados neste trabalho com a diversidade de componentes identificados no transcriptoma das glândulas de veneno e/ou proteoma do veneno do escorpião caraboctonídeo *Hadrurus spadix*. Essa comparação não apresenta todos os grupos de componentes encontrados, apenas aqueles relacionados aos efeitos do envenenamento. Os dados de *H. spadix* são provenientes tanto das informações do artigo de Rokyta & Ward (2017) quanto do depósito no GenBank (acesso: GFAH00000000). *O grupo NDBP nos nossos resultados pode indicar ou o número de componentes com essa exata denominação (n = 16) ou o grupo inteiro dos peptídeos lineares citotóxicos (n = 35), já que ambos não apresentam pontes dissulfeto.

Componente	<i>Hadruroides</i>	<i>Hadrurus</i>
	<i>lunatus</i>	<i>spadix</i>
	n	n
<i>Venom protein</i>	51	66
Fosfolipase A2	18	6
<i>Toxin-like</i>	10	0
NDBP*	16 (ou 35*)	11
KTx	5	32
Peptídeo <i>scorpine-like</i>	3	4
Peptidase M2	3	4
Hialuronidase	2	1
<i>La1-like</i>	2	3
Enzima conversora de angiotensina	2	1
L-aminoácido oxidase	1	1
Fosfolipase A1	1	1
Fosfolipase B	1	1
Fosfolipase C	1	1
CaTx	0	1
Peptídeo potencializador de bradicinina	0	1
NaTx	0	0

Devido à escassez de informações sobre a diversidade de componentes do veneno de espécies filogeneticamente próximas a *H. lunatus*, observamos que alguns dos *matches* encontrados foram com espécies de grupos taxonômicos distantes, como no caso das aranhas *Araneus ventricosus* e *Parasteatoda tepidariorum* e do límulo *Limulus polyphemus*. Os *matches* com essas três espécies filogeneticamente distantes ocorreram para duas enzimas, H1_disulfideisomerase_A5 e H1_ACE1 (essa última apresentou duplo *match*, ver **Apêndice F**), enzimas que

podem apresentar maior conservação entre esses táxons devido à função vital que exercem (Coates, 2003; Wilkinson & Gilbert, 2004). Isso também indica o quão negligenciadas são essas famílias de componentes na atualidade e sugere que essas podem ser importantes alvos para novos estudos.

4.2. Estimativa do nível de transcrição

Realizamos uma estimativa do nível de transcrição (FPKM) de cada componente identificado neste trabalho (**Tabela 3**). As porcentagens de transcrição inferidas para cada grupo de sequências são mostradas na **Figura 3B**.

Tabela 3. Nível transcricional, inferido por fragmentos por quilobase por milhão (FPKM), dos 145 componentes identificados nas glândulas de veneno de *Hadruioides lunatus*. As porcentagens de transcrição foram calculadas com base na fração do transcriptoma analisado, ou seja, dos 145 componentes possivelmente relacionados à síndrome do envenenamento. (CYLIP = *cytotoxic linear peptide*; Hyal = *hyaluronidase*; NDBP = *non-disulfide-bridge peptide*; PAM = *peptidylglycine α -amidating monooxygenase*; PHM = *peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase*; PLA1 = *phospholipase A1*; PLA2 = *phospholipase A2*; PLB = *phospholipase B*; PLC = *phospholipase C*; Tx = *toxin-like*; VP = *venom protein*).

Componente	FPKM	Transcrição (%)
HI_NDBP-8	204522,1217	8,5212
HI_CYLIP12	143786,448	5,9907
HI_NDBP-9	114062,3096	4,7523
HI_CYLIP15	111550,2069	4,6476
HI_Scorpine-like_3	93118,00043	3,8797
HI_CYLIP13	90769,6515	3,7818
HI_CYLIP11	83755,88072	3,4896
HI_CYLIP1	82963,45069	3,4566
HI_CYLIP9	73199,28449	3,0498
HI_NDBP-10	72249,5575	3,0102
HI_VP49	56152,28883	2,3395
HI_Tx2	52787,51099	2,1993
HI_Tx1	51764,30962	2,1567
HI_CYLIP10	47136,71029	1,9639
HI_CYLIP3	43345,30494	1,8059
HI_VP31	40257,28939	1,6773
HI_PLA2_5	35739,49464	1,4890
HI_VP47	34811,05735	1,4504
HI_VP44	34522,78895	1,4384
HI_VP46	32915,26832	1,3714
HI_VP32	32727,13683	1,3635
HI_VP45	32198,44244	1,3415
HI_CYLIP16	30315,91473	1,2631
HI_CYLIP2	29105,83898	1,2127
HI_VP34	29065,19853	1,2110
HI_VP48	28495,53693	1,1872
HI_Scorpine-like_1	27663,02483	1,1525
HI_CYLIP14	27392,20702	1,1413
HI_VP37	26854,676	1,1189
HI_VP42	24700,21591	1,0291

HI_NDBP-11	23890,94258	0,9954
HI_Scorpine-like_2	22524,42223	0,9385
HI_NDBP-1	22219,31017	0,9257
HI_VP33	21398,02595	0,8915
HI_KTx3	21332,28683	0,8888
HI_PLA2_3	21152,1042	0,8813
HI_KTx5	21082,56931	0,8784
HI_La1-like_1	20078,55165	0,8365
HI_PLA2_4	19869,57677	0,8278
HI_PLA2_13	19815,60371	0,8256
HI_CYLIP17	19138,41418	0,7974
HI_PLA2_2	17927,33265	0,7469
HI_NDBP-14	17918,49038	0,7466
HI_PLA2_1	16572,21529	0,6905
HI_CYLIP6	14693,3845	0,6122
HI_CYLIP7	14081,8619	0,5867
HI_CYLIP4	13893,3307	0,5788
HI_La1-like_2	13700,62776	0,5708
HI_Tx3	13133,57526	0,5472
HI_Tx6	11705,89702	0,4877
HI_NDBP-2	11544,92451	0,4810
HI_CYLIP5	10143,83589	0,4226
HI_KTx1	10010,99447	0,4171
HI_VP50	9916,084724	0,4131
HI_KTx4	9029,987018	0,3762
HI_NDBP-3	8841,312841	0,3684
HI_CYLIP8	8159,994148	0,3400
HI_NDBP-12	7094,703645	0,2956
HI_VP43	6942,411162	0,2892
HI_PLA2_6	6215,107656	0,2589
HI_KTx2	5798,966209	0,2416
HI_PLA2_15	5691,170153	0,2371
HI_NDBP-16	5553,170177	0,2314
HI_PLA2_7	5154,426571	0,2148
HI_VP36	4953,248629	0,2064
HI_VP7	4880,612914	0,2033
HI_NDBP-4	4842,752044	0,2018
HI_Tx7	4652,891289	0,1939
HI_NDBP-15	4341,170288	0,1809
HI_NDBP-7	4154,824224	0,1731
HI_PLA2_9	4150,326767	0,1729
HI_PLA2_10	4129,0932	0,1720
HI_PLA2_11	3906,770263	0,1628
HI_Tx10	3623,756737	0,1510
HI_VP38	3609,756866	0,1504
HI_PLA2_12	3548,17427	0,1478
HI_PLA2_8	3463,377814	0,1443
HI_Peptidase_M2_1	3460,081008	0,1442
HI_ACE1	3285,472167	0,1369
HI_Tx4	3181,509723	0,1326
HI_VP35	3176,888092	0,1324
HI_ACE2	2848,966776	0,1187
HI_CYLIP18	2745,340439	0,1144
HI_Peptidase_M2_3	2719,374516	0,1133
HI_NDBP-13	2675,653648	0,1115
HI_Peptidase_M2_2	2596,484167	0,1082
HI_disulfide-isomerase-like_1	2235,399139	0,0931
HI_NDBP-6	2117,176596	0,0882
HI_disulfide-isomerase-like_2	1772,05866	0,0738
HI_VP22	1637,322435	0,0682
HI_VP27	1632,19161	0,0680
HI_VP51	1629,928004	0,0679
HI_VP15	1533,439328	0,0639
HI_VP26	1524,250675	0,0635
HI_VP28	1387,53977	0,0578
HI_Tx5	1376,947479	0,0574
HI_VP23	1359,67291	0,0566

HI_VP24	1277,25461	0,0532
HI_disulfide-isomerase_A3	1242,966239	0,0518
HI_VP21	1187,089194	0,0495
HI_Hyal2	1057,458633	0,0441
HI_NDBP-5	1050,222498	0,0438
HI_VP29	962,5928022	0,0401
HI_VP39	936,7514152	0,0390
HI_Hyal1	918,2948832	0,0383
HI_PHM	896,7268567	0,0374
HI_VP16	894,3841328	0,0373
HI_VP9	828,8636781	0,0345
HI_VP8	775,3937885	0,0323
HI_VP25	762,7077791	0,0318
HI_PLA2_14	762,4133274	0,0318
HI_VP11	606,1028355	0,0253
HI_Protease_inhibitor	554,2005722	0,0231
HI_VP4	553,1055464	0,0230
HI_PLA2_16	539,6136877	0,0225
HI_Tx8	539,3437683	0,0225
HI_VP40	530,7053755	0,0221
HI_VP41	487,4381911	0,0203
HI_VP18	480,5159839	0,0200
HI_VP1	470,304528	0,0196
HI_VP10	465,0088452	0,0194
HI_VP2	456,4336575	0,0190
HI_VP5	453,4332759	0,0189
HI_disulfide-isomerase_A6	443,3625929	0,0185
HI_CYLIP19	413,4453346	0,0172
HI_VP30	409,5040725	0,0171
HI_VP19	408,2246121	0,0170
HI_Tx9	406,9702316	0,0170
HI_VP13	404,35221	0,0168
HI_VP3	394,9039969	0,0165
HI_VP12	389,4128002	0,0162
HI_VP6	366,1318734	0,0153
HI_PLC	292,2211352	0,0122
HI_VP17	285,6415978	0,0119
HI_VP14	219,7750513	0,0092
HI_VP20	186,1840666	0,0078
HI_LAAO	100,8231334	0,0042
HI_disulfide-isomerase_TMX3	81,47715405	0,0034
HI_PLA1	80,32389285	0,0033
HI_disulfide-isomerase_A5	74,91014877	0,0031
HI_PLA2_17	56,79878123	0,0024
HI_PLA2_18	50,65079406	0,0021
HI_disulfide-isomerase_A4	40,19617115	0,0017
HI_PAM	13,6877104	0,0006
HI_PLB	11,60896604	0,0005

Esses resultados se assemelham àqueles encontrados para vários escorpiões não butídeos, uma vez que o veneno de *H. lunatus* se mostrou escasso em toxinas de canais iônicos (e.g., KTx) e rico em peptídeos sem ponte dissulfeto, tanto em diversidade de sequências quanto em porcentagem de transcrição (Ma et al., 2009; Luna-Ramírez et al., 2015; Quintero-Hernández et al., 2015; Santibáñez-López et al., 2016).

As sequências classificadas como CYLIPs (n = 19), inseridas no grupo de mesma denominação, foram as que apresentaram maior nível de transcrição (35,4%). A segunda família de sequências mais transcrita foi a dos NDBPs (21,1% e n=16), a qual compõe o mesmo grupo dos CYLIPs. Essa família inclui a sequência com maior nível de transcrição, HI_NDBP-

8, com 8,5% da fração analisada. Assim, o grupo dos peptídeos lineares citotóxicos apresentou mais da metade do nível de transcrição analisado (56,5%).

O grupo das *venom proteins* chamou atenção pela desproporção entre sua diversidade de sequências (n = 51; o maior grupo) e sua relativa baixa taxa de transcrição (cerca de 19%). O mesmo ocorre com o grupo das fosfolipases, que é representado por 21 sequências e cerca de 7% do nível de transcrição (porcentagem quase que inteiramente atribuída às 18 sequências de PLA2s). Entretanto, a família das fosfolipases merece atenção pelo fato de ser formada por enzimas aparentemente altamente ativas das glândulas de veneno. Um exemplo disso foi registrado para o veneno total do escorpião *Tityus melici* (Kalapothakis et al., *em submissão*), que mostrou atividade de PLA2 *in vitro*, através da formação de halos hemolíticos, mesmo apresentando nível de transcrição basal (< 0,2% do transcriptoma analisado). Dessa forma, acreditamos que o nível de transcrição dessas enzimas de *H. lunatus* é correspondente à alta atividade de PLA2s registrada para a espécie, que se mostrou capaz de formar halos hemolíticos de 1 cm de diâmetro com 0,125 µg de veneno (Costal-Oliveira et al., 2012).

Para o grupo das neurotoxinas (KTxs e peptídeos *toxin-like*), registramos cerca de 9% do nível de transcrição da fração analisada (KTx = 2,8%; *toxin-like* = 6%). O grupo dos peptídeos *scorpine-like* apresentou uma porcentagem de transcrição de cerca de 6%, embora seja composto por apenas três sequências. Por fim, as duas sequências de putativos peptídeos *La1-like* representaram aproximadamente 1,5% da fração analisada e as duas hialuronidases apresentaram um nível de transcrição basal, de apenas 0,08%.

Maiores detalhes sobre os níveis de transcrição serão discutidos nos respectivos tópicos de cada um dos seis grupos de componentes identificados (seções 4.4 a 4.9).

4.3. Perfil do veneno total de *Hadruroides lunatus*

Nós avaliamos o perfil de 30 µg do veneno total de *H. lunatus* e o comparamos com o perfil de 30 µg do veneno de *T. serrulatus* usando SDS-PAGE 16% (**Figura 4**). Para ambos os venenos, observamos maior abundância de proteínas de baixa massa molecular (< 15 kD), embora pareça existir uma diferença nessa faixa, com *T. serrulatus* apresentando uma concentração maior de peptídeos/proteínas entre cerca de 10 a 13 kD se comparado com *H. lunatus*, que apresenta uma faixa de concentração mais estendida, em torno de 10 a 15 kD. Além disso, é possível observar que o veneno de *H. lunatus* apresenta maior diversidade de proteínas entre 15 kD e 25 kD e também acima de 50 kD.

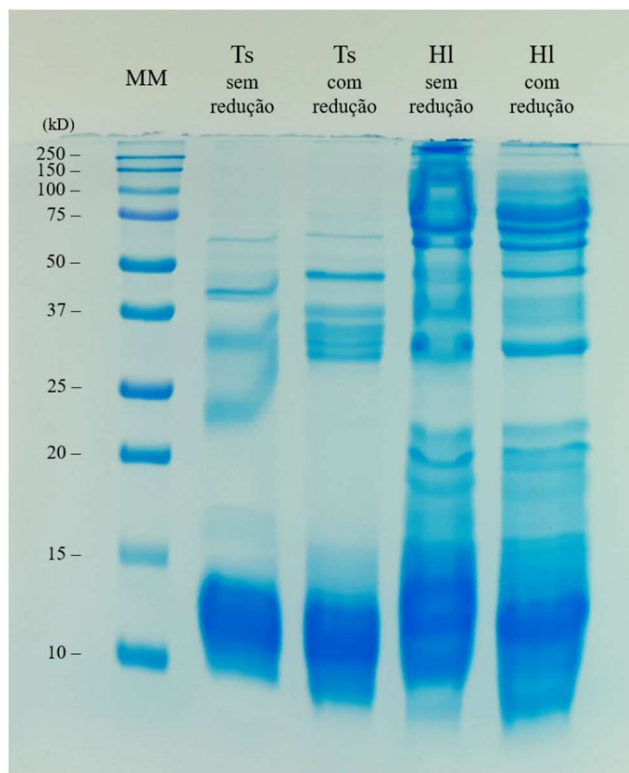


Figura 4. SDS-PAGE (16%) de 30 μ g dos venenos totais de *Hadruioides lunatus* (HI) e *Tityus serrulatus* (Ts), diluídos em água ultrapura. Os venenos foram aplicados em condições redutoras e não redutoras, conforme indicado na figura. Um marcador de massa molecular (MM) de 10 a 250 kD foi usado na canaleta à esquerda. O gel foi corado com azul de Coomassie.

O perfil do veneno total de *H. lunatus* corrobora os achados da transcriptômica, já que essa faixa abaixo de 15 kD abrange as massas moleculares esperadas para a maioria dos grupos de componentes avaliados neste estudo, como as neurotoxinas (Cid-Uribe et al., 2020; Kalapothakis et al., 2023), os peptídeos lineares citotóxicos (Dai et al., 2002; Harrison et al., 2014), os peptídeos La1-like (Martinez et al., 2017) e os peptídeos *scorpine-like* (Feng et al., 2013; El-Bitar et al., 2020). Ainda nessa faixa de massa molecular, e chegando até cerca de 17 kD – uma das regiões de massa molecular que mais diferencia os perfis proteicos de *T. serrulatus* e *H. lunatus* –, podemos inferir a presença das fosfolipases de *H. lunatus* (Incamnoi et al., 2013; Costal-Oliveira et al., 2017). Nós também identificamos uma banda em torno de 45 kD, que pode corresponder às hialuronidases (Costal-Oliveira et al., 2012), enzimas pouco transcritas no veneno de *H. lunatus*. Finalmente, neste trabalho nós não pudemos inferir as massas moleculares das proteínas nomeadas como *venom proteins*, mas acreditamos que, dado o nível relevante de transcrição dessa família de componentes (~19%) e o tamanho das suas sequências precursoras de aminoácidos (entre 73 e 427 resíduos de aminoácidos), várias dessas

proteínas podem ser visualizadas na faixa de massas entre 10 e 25 kD e também nas bandas intensas localizadas entre 30 e 50 kD do veneno de *H. lunatus*.

4.4. Neurotoxinas

As neurotoxinas são peptídeos de baixa massa molecular (< 10 kD) e responsáveis pela maioria dos efeitos tóxicos do escorpionismo, principalmente dos envenenamentos causados por butídeos (Cid-Uribe et al., 2020). Isso se deve à ação desses componentes em canais iônicos, principalmente para Na⁺ e K⁺, ativando ou inativando a condução de sinais elétricos em células excitáveis – como os neurônios –, o que estimula a excitação do sistema nervoso autônomo e a liberação de neurotransmissores, podendo provocar manifestações simpáticas e parassimpáticas (Catterall, 1995; Vasconcelos et al., 2005; Pucca et al., 2015; Cid-Uribe et al., 2020).

Dos 145 componentes identificados aqui, apenas 15 foram classificados neste grupo (10 peptídeos *toxin-like* e cinco KTxs; **Apêndice A**). Tanto a diversidade de toxinas quanto o nível de transcrição desse grupo (cerca de 9%) são baixos quando comparados com o identificado em escorpiões da família Buthidae, como *T. serrulatus* (n = 41 e FPKM = 91%; Kalapothakis et al., 2021), *T. cisandinus* (n = 60 e FPKM = 94%; Kalapothakis et al., 2023) e *T. obscurus* (De Oliveira et al., 2018).

Já foi registrado que o veneno de *H. lunatus* tem baixa letalidade em mamíferos, com uma DL₅₀ intraperitoneal de 21,55 mg/kg – o que o classificou como um veneno “moderadamente tóxico” (Costal-Oliveira et al., 2012). A título de comparação, Nishikawa et al. (1994) identificou a DL₅₀ intraperitoneal do veneno de vários escorpiões butídeos, e observou um veneno “altamente tóxico” para *T. stigmurus* (0,77 mg/kg), *T. bahiensis* (1,06 mg/kg), *T. serrulatus* (1,16 mg/kg) e *T. costatus* (1,59 mg/kg). Os nossos achados ajudam a explicar essa baixa DL₅₀, principalmente pelo baixo nível de transcrição encontrado para as putativas neurotoxinas, em comparação com *Tityus* spp.

A baixa letalidade do veneno de *H. lunatus* parece estar relacionada não apenas à baixa diversidade e taxa de transcrição dos putativos componentes neurotóxicos, mas também à ausência de toxinas de canais iônicos de sódio (i.e., NaTx), neurotoxinas abundantes em escorpiões butídeos e responsáveis pela maior letalidade dos venenos (Vasconcelos et al., 2005; Cid-Uribe et al., 2020; Kalapothakis et al., 2021; Kalapothakis et al., 2023). Nos outros dois estudos nos quais se avaliaram a composição do veneno de espécies da família Caraboctonidae – *H. gertschi* (Schwartz et al., 2007) e *H. spadix* (Rokyta & Ward, 2017) –, também não foi possível identificar nenhuma NaTx, o que reforça o padrão de baixa diversidade ou mesmo de ausência de NaTx para escorpiões não pertencentes à família Buthidae (Ma et al., 2012; Cid-

Uribe et al., 2020). Da mesma forma, como descrito na seção 3.3, usamos todas as sequências de *H. spadix* depositadas no NCBI como referência para montagem, incluindo uma putativa toxina de canal de cálcio (CaTx), porém não identificamos nenhum componente homólogo ou pertencente a essa categoria em *H. lunatus* (Tabela 2). Outros componentes tóxicos e altamente transcritos nos venenos de butídeos, como as hipotensinas e os peptídeos ativadores de lipólise (LVP) (ver Kalapothakis et al., 2023), também não foram identificados até o momento nas glândulas de veneno de caraboctonídeos.

Nós observamos que as cinco toxinas de canais de potássio encontradas neste trabalho (HI_KTx1 a HI_KTx5) têm entre 61 e 79 aminoácidos nas suas sequências precursoras. Além disso, elas apresentaram a estrutura *cysteine-stabilized* α/β (*motif* CS α/β) (Figura 5). Esse *motif* é caracterizado pela presença de seis resíduos de cisteína, os quais formam três pontes dissulfeto responsáveis pela estabilização e formação de uma α -hélice (N-terminal) e uma folha- β dupla-fita (De la Vega & Possani, 2004; Zhu et al., 2005). Neste trabalho, nós também identificamos as sequências de sete enzimas dissulfeto isomerase (ver seção 4.9), que atuam como chaperonas e conduzem modificações pós-traducionais como formação e correção das pontes dissulfeto (Noiva, 1999; Safavi-Hemami et al., 2016).

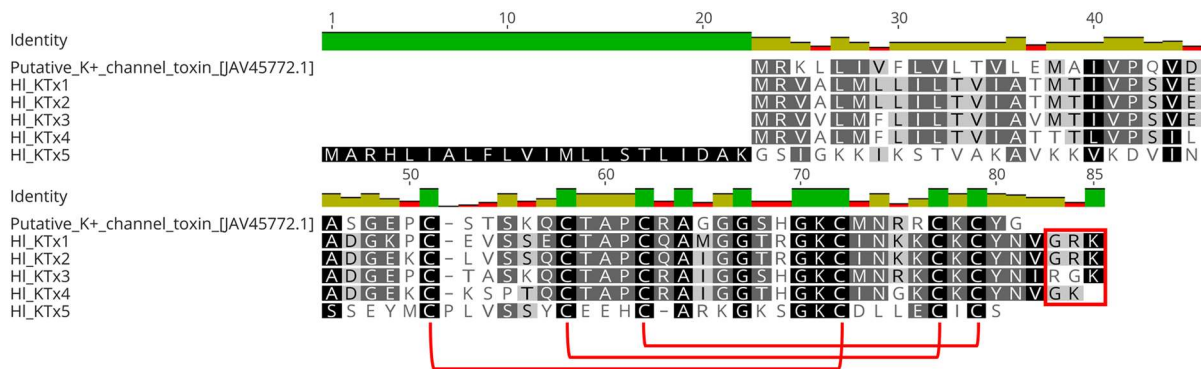


Figura 5. Alinhamento das cinco putativas toxinas de canais de potássio (KTxs) encontradas no transcriptoma das glândulas de veneno de *Hadruroides lunatus* com a sequência JAV45772.1, de *Superstitionia donensis* (Scorpiones, Superstitionidae). Os colchetes vermelhos indicam a ligação dos seis resíduos de cisteína para a formação de três pontes dissulfeto (C₁-C₄/ C₂-C₅/ C₃-C₆). O retângulo vermelho indica os resíduos característicos de amidação C-terminal (GR e GK). O alinhamento foi feito usando o programa Geneious Prime.

Essas cinco KTxs apresentam o padrão de cisteínas esperado, definido aqui por CX₅-₆CX₃CX₈₋₉CX₄CX₁C, no qual X representa qualquer aminoácido (Legros et al., 1998; Zhu et al., 2005; Diego-García et al., 2008). Além disso, as sequências HI_KTx1 a HI_KTx4

apresentam os resíduos GR e GK na região C-terminal, indicativos de amidação C-terminal em toxinas (Pimenta et al., 2003). A amidação é uma importante modificação pós-traducional que aumenta a estabilidade e a atividade biológica de várias proteínas, incluindo toxinas. Aqui, nós também identificamos as enzimas HI_PAM e HI_PHM (ver seção 4.9), as quais catalisam o processo de amidação C-terminal em escorpiões (Delgado-Prudencio et al., 2019).

Observamos que a família das KTxs representa uma das maiores diferenças entre os transcriptomas dos caraboctonídeos *H. lunatus* e *H. spadix* (**Tabela 2**). Rokyta & Ward (2017) identificaram 32 putativas KTxs de *H. spadix*, sendo 31 α -KTxs e uma β -KTx. Dessas 32 sequências, 30 possuem oito resíduos de cisteína (i.e., formam quatro pontes dissulfeto), característica não encontrada em nenhuma das putativas KTxs de *H. lunatus*. Curiosamente, apesar da maior proximidade filogenética entre essas espécies, nenhum dos *matches* retornados para o grupo das toxinas foi com *H. spadix* e houve apenas um *match* com *H. gertschi*. Uma das possíveis explicações para essa diferença em abundância e essa baixa conservação estrutural de toxinas entre espécies da mesma família pode ser o uso de diferentes estratégias de identificação e classificação de sequências. Outra hipótese é a existência de processos de seleção diferenciada do repertório de toxinas dessas três espécies. Isso pode ter ocorrido devido a diferentes adaptações de defesa desenvolvidas na área de cerca de 6.000 km que compreende as distribuições dessas espécies nas Américas: enquanto *H. lunatus* habita o Peru, *H. gertschi* ocorre no México (Quijano-Ravell et al., 2011) e *H. spadix* ocorre na América do Norte (Edmunds & Sibly, 2010).

Ainda sobre as putativas toxinas de *H. lunatus*, registramos que as sequências HI_Tx1 a HI_Tx7 apresentam um *fold* raro em toxinas de escorpiões, denominado *disulfide-directed β -hairpin* (DDH) (Smith et al., 2011; **Figura 6**). Esse *fold* é caracterizado pela formação de duas pontes dissulfeto (estruturadas por quatro resíduos de cisteína) e duas folhas- β de duas fitas. Esse foi o quarto *fold* estrutural registrado para peptídeos do veneno de escorpiões, descrito após os *motifs* CS α / β , CS α / α e ICK (Shu et al., 2002; Smith et al., 2011).

Essas sete toxinas de *H. lunatus* com *fold* DDH apresentaram praticamente a sequência de aminoácidos consenso CX₅₋₁₉CX₂[G ou P]X₂CX₆₋₁₉C, onde X representa qualquer aminoácido, proposta para peptídeos DDH de eucariotos (Wang et al., 2000). O resíduo de glicina (G) presente nesse consenso foi encontrado apenas em duas dessas sete toxinas de *H. lunatus* e em nenhuma outra sequência da **Figura 6**. Já o resíduo de prolina (P), de cadeia lateral apolar (assim como o resíduo G) e supostamente conservado, foi encontrado apenas na toxina U1-LITX-Lw1a, do escorpião *Hormurus waigiensis* (*Liocheles waigiensis*). Nessa posição, em cinco das sete toxinas de *H. lunatus* – e também na sequência DDH-Uro-1, do escorpião

Urodacus manicatus –, identificamos a presença dos resíduos histidina (H) ou asparagina (N), com cadeias laterais básica e polar, respectivamente. Como há poucos registros desse *fold* em escorpiões, sugerimos que, a partir das sequências da **Figura 6**, a sequência de aminoácidos consenso para esse grupo taxonômico poderia ser atualizada para CX₅CX₅CX₅₋₆C. Novos estudos podem ser feitos para entendermos se os resíduos G ou P do primeiro consenso são realmente importantes para a manutenção estrutural – como sugerido por Wang et al. (2000) – ou se eles guardariam maior importância para estudos filogenéticos, por exemplo. Cabe destacar que as espécies *Hormurus waigiensis*, para a qual foi primeiramente identificado esse *fold* DDH em escorpiões (Smith et al., 2011), e *Urodacus manicatus* pertencem a famílias biológicas diferentes entre si e também entre *H. lunatus*.

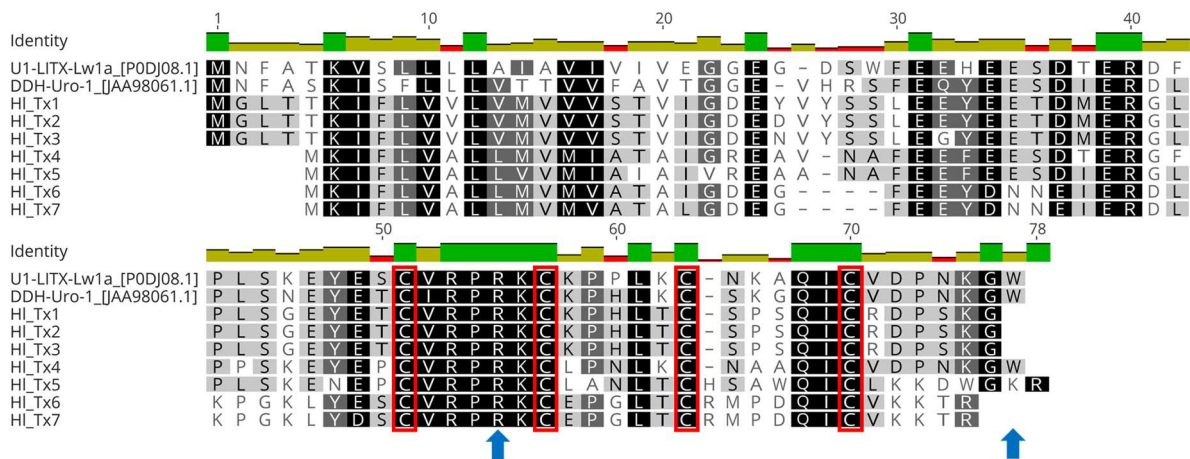


Figura 6. Alinhamento de sete putativas toxinas de *Hadruroides lunatus* com as toxinas U1-LITX-Lw1a e DDH-Uro-1, dos escorpiões *Hormurus waigiensis* (*Liocheles waigiensis*) e *Urodacus manicatus*, respectivamente. Todas as sequências parecem apresentar o *fold* disulfide-directed β -hairpin (DDH). Os retângulos vermelhos indicam os quatro resíduos conservados de cisteína, os quais podem formar duas pontes dissulfeto (C₁-C₃ / C₂-C₄). As setas azuis indicam resíduos de arginina (R) e triptofano (W), importantes para as atividades biológicas de alguns peptídeos com *fold* DDH (consulte texto). O alinhamento foi feito usando o programa Geneious Prime.

A toxina U1-LITX-Lw1a apresenta ampla atividade inseticida e também é uma potente ativadora dos canais receptores de rianodina (RyRs) de mamíferos, responsáveis pela liberação de cálcio intracelular (Smith et al., 2011; Smith et al., 2013). Os canais RyRs são os maiores canais iônicos conhecidos e se encontram predominantemente nas células musculares esqueléticas e cardíacas, permitindo os processos de excitação e contração muscular (Kimlicka & Van Petegem, 2011). Dentre essas sete putativas toxinas de *H. lunatus*, a sequência HI_Tx4 foi a mais próxima à toxina U1-LITX-Lw1a (72% de similaridade) e a única com um resíduo

C-terminal de triptofano (W) (**Figura 6**). Esse resíduo C-terminal já se mostrou fundamental para a indução da abertura completa dos canais RyRs, o que pode indicar que ele compõe o farmacóforo desse peptídeo (Smith et al., 2013). Outra característica notável das sequências apresentadas na **Figura 6** é a presença de um resíduo de arginina (R) altamente conservado na posição R⁵⁵ (equivalente à posição R¹⁵ na sequência de aminoácidos madura). Horita et al. (2011) demonstraram que esse resíduo R¹⁵ é importante para a atividade inseticida da toxina LaIT1 do escorpião *Liocheles australasiae*, provavelmente por se ligar diretamente ao alvo. Ensaios devem ser realizados para verificar se essas atividades biológicas, tanto inseticidas quanto ativadoras de canais RyRs, são exercidas por alguma dessas sete putativas toxinas de *H. lunatus* com *fold* DDH.

Por fim, as putativas toxinas Hl_Tx8 a Hl_Tx10 apresentam 12 resíduos de cisteína (excluindo o peptídeo sinal) e 129 aminoácidos em suas sequências precursoras. Seus principais *matches* no BlastP são uma putativa NaTx do escorpião *Superstitionia donensis* (30,7% a 34,6% de similaridade) (**Apêndice A**). A baixa similaridade encontrada entre essas sequências pode indicar a existência de componentes negligenciados ou pouco encontrados nas glândulas de veneno de escorpiões. Além disso, não há registro de NaTx de escorpiões de tamanho similar e estruturada por 12 resíduos de cisteína (i.e., formando seis pontes dissulfeto) – o esperado é que essa família presente entre 58–76 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto (Possani et al., 1999; Stevens et al., 2011). Curiosamente, essas três sequências de *H. lunatus* compartilham um padrão de conservação de cisteínas definido por CX₈₋₉CX₃CX₉CX₄₋₇CX₁C (X = qualquer aminoácido), esperado para toxinas com atividade em canais de potássio (KTxs) (Legros et al., 1998; Zhu et al., 2005; Diego-García et al., 2008), porém esse padrão é duplicado em cada uma dessas sequências (**Figura 7**). Dessa forma, nós classificamos esses três componentes como putativos peptídeos *toxin-like* em vez de putativas NaTxs ou KTxs de *H. lunatus*. Devido a essa característica distinta que apresenta, essa família de sequências merece maiores investigações funcionais para entendermos suas atividades biológicas dentro e fora das glândulas de veneno.

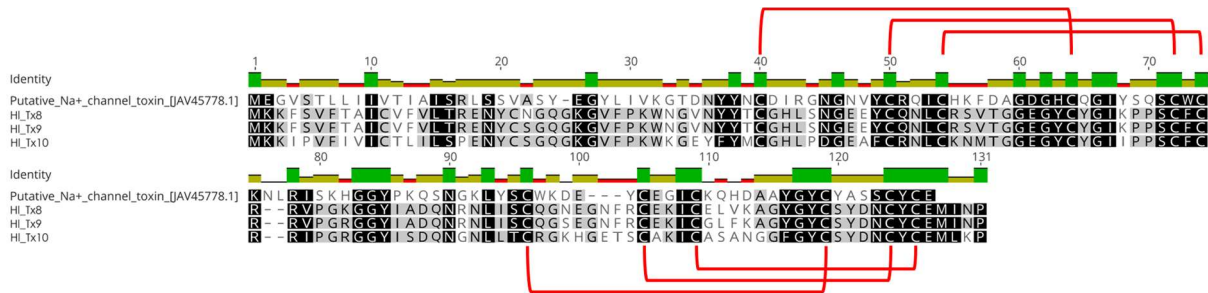


Figura 7. Alinhamento das putativas toxinas Hl_Tx8, Hl_Tx9 e Hl_Tx10 de *Hadruroides lunatus* com a sequência JAV45778.1, de *Superstitionia donensis* (Scorpiones, Superstitionidae). Os colchetes vermelhos indicam possíveis formações de seis pontes dissulfeto, formadas a partir dos 12 resíduos de cisteína encontrados fora dos peptídeos sinais. Como o padrão encontrado para esses resíduos de cisteína é idêntico ao registrado para diversas toxinas de canais de potássio (KTxs), é possível que essas três sequências de *H. lunatus* tenham função semelhante. O alinhamento foi feito usando o programa Geneious Prime.

4.5. Peptídeos La1-like

A família La1-like foi primeiramente descrita para o escorpião *Liocheles australasiae* e parece ser onipresente no veneno de escorpiões, apesar de as suas atividades biológicas e funções no veneno permanecerem pouco conhecidas (Miyashita et al., 2007; Santibáñez-López et al., 2016).

Nós identificamos dois putativos peptídeos dessa família de componentes. As sequências Hl_La1-like_1 e Hl_La1-like_2 são prováveis isoformas com 99 aminoácidos em suas sequências precursoras e 98% de similaridade entre si. Essas sequências compartilham 67% de similaridade com um putativo peptídeo La1-like de *Superstitionia donensis* (Scorpiones, Superstitionidae) (**Apêndice B**). Os peptídeos La1-like de escorpiões geralmente contêm oito resíduos de cisteína e podem apresentar o domínio “FPDCC” próximo à região C-terminal, o qual já foi registrado para escorpiões de seis famílias (Quintero-Hernández et al., 2015; Santibáñez-López et al., 2016; acesso InterPro: PF15430). Essas características estruturais são totalmente conservadas nas sequências Hl_La1-like_1 e Hl_La1-like_2 e, também, em dois putativos peptídeos La1-like de *H. spadix* (**Figura 8**).

Pelo nosso conhecimento, apenas uma atividade biológica foi demonstrada para um peptídeo La1-like, isolado da espécie *Scorpio maurus palmatus*. Martinez et al. (2017) registraram que esse peptídeo, nomeado *spermaurin*, foi capaz de aumentar a motilidade e a fertilização do esperma em vários mamíferos, incluindo humanos. As duas sequências de *H. lunatus* apresentam 56–57% de similaridade com a *spermaurin*. Estudos devem ser conduzidos

para avaliar as funções dessas duas sequências de *H. lunatus* e para avaliar as atividades biológicas dessa família de componentes.

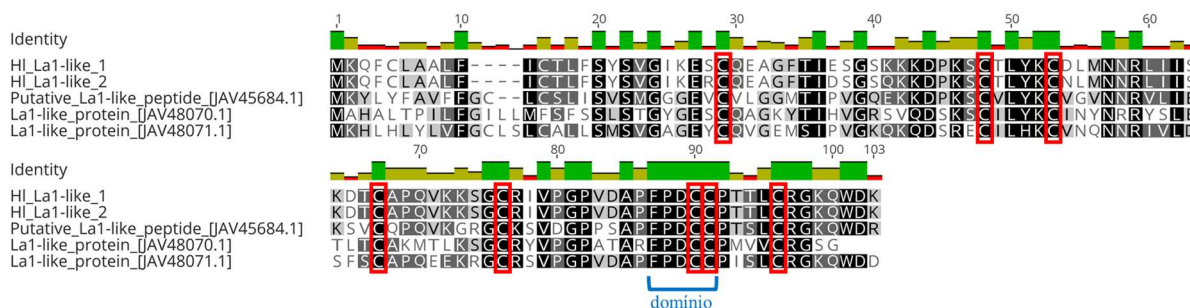


Figura 8. Alinhamento dos putativos peptídeos La1-like de *Hadruroides lunatus* com sequências La1-like de *Superstitionia donensis* (JAV45684.1) e *Hadrurus spadix* (JAV48070.1 e JAV48071.1). Os retângulos vermelhos indicam os oito resíduos de cisteína conservados. O colchete azul indica a conservação do domínio FPDCC (InterPro: PF15430), esperado para peptídeos dessa família, em todas as sequências do alinhamento. O alinhamento foi feito usando o programa Geneious Prime.

4.6. Peptídeos lineares citotóxicos

Os peptídeos lineares citotóxicos são assim denominados por serem pequenos peptídeos catiônicos que não contêm pontes dissulfeto e apresentam atividades tóxicas (Zeng et al., 2012; Sunagar et al., 2013). Eles pertencem à grande família dos peptídeos citotóxicos, os quais podem ou não conter pontes dissulfeto e tipicamente atuam nas membranas celulares para alterar a sua permeabilidade, seja através da formação de novos canais iônicos e/ou através da interação com transportadores de íons (Kourie & Shorthouse, 2000).

De acordo com a classificação proposta por Sunagar et al. (2013), esse grupo de peptídeos lineares é formado pelos – genericamente classificados – peptídeos lineares citotóxicos (CYLIPs), peptídeos sem ponte dissulfeto (NDBPs), peptídeos antimicrobianos (AMPs) e peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs). Neste trabalho, nós identificamos 35 putativas sequências dessa família de componentes, com tamanhos entre 65 e 78 resíduos de aminoácidos precursores (Apêndice C), e os classificamos com as denominações de CYLIPs e NDBPs. Isso ocorreu devido a maior similaridade das nossas sequências com sequências depositadas e assim denominadas (i.e., CYLIPs e NDBPs) para outros escorpiões e também devido à escassez de informações que conduzam a uma maior objetividade na classificação/denominação de cada uma dessas subfamílias de componentes das glândulas de veneno. Dessa forma, aqui nós não classificamos componentes nas categorias de AMPs e BPPs.

Diversas atividades biológicas já foram atribuídas aos peptídeos lineares citotóxicos, incluindo ação antibacteriana, antifúngica, hemolítica e sinérgica aos efeitos de neurotoxinas (Dai et al., 2001; Moerman et al., 2002; Sunagar et al., 2013; Almaaytah & Albalas, 2014). Esse grupo de componentes representa uma das maiores diferenças entre o veneno de *H. lunatus* e o veneno de escorpiões butídeos, uma vez que esses últimos apresentam uma fração pouco diversa e pouco expressa de componentes sem pontes dissulfeto (Cid-Urbe et al., 2020). Uma das exceções a esse padrão é a família das hipotensinas, componentes lineares com atividade anti-hipertensiva e, possivelmente, anti-inflamatória, encontrada em nível relevante de transcrição – entre 10% e 16% – no veneno de butídeos (Verano-Braga et al., 2008; Kalapothakis et al., 2021; Kalapothakis et al., 2023). Devido à escassez de caracterizações funcionais de componentes das glândulas de veneno de caraboctonídeos e de outros não butídeos, nós acreditamos que as sequências lineares aqui identificadas são alvos importantes para ensaios futuros que busquem avaliar efeitos farmacológicos semelhantes àqueles promovidos pelas hipotensinas de *Tityus* spp. (ver Verano-Braga et al., 2008).

O grupo dos peptídeos lineares citotóxicos de *H. lunatus*, formado por componentes com provável atividade antimicrobiana (Almaaytah & Albalas, 2014), apresentou a maior porcentagem do nível transcricional avaliado (56,5%). Isso sugere que o veneno dessa espécie apresenta ampla atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, como já demonstrado para o veneno do filogeneticamente próximo *Hadruioides mauryi* (Escobar et al., 2008). Curiosamente, nenhum dos *matches* retornados para esse grande grupo de componentes foi com sequências dos caraboctonídeos *H. gertschi* e *H. spadix* (**Tabela 1**), embora essas duas espécies tenham uma alta diversidade de sequências e uma taxa de transcrição elevada para esse grupo (Schwartz et al., 2007; Rokyta & Ward, 2017). Uma possível explicação para isso é o fato de existir um grande isolamento geográfico entre essas três espécies (*H. lunatus*, *H. gertschi* e *H. spadix*, ver seção 4.4), que pode ter sido responsável por essa grande diferença na seleção dos componentes lineares dos venenos, em relação aos componentes com pontes dissulfeto (e.g., *scorpine-like*, *venom proteins* e enzimas), os quais demonstraram maiores *matches* entre essas três espécies. Outra hipótese é que esses peptídeos sem pontes dissulfeto podem apresentar menor conservação estrutura/função quando comparados àqueles com pontes dissulfeto (Almaaytah & Albalas, 2014).

Todas as 19 sequências do subgrupo dos peptídeos lineares citotóxicos (i. e., HI_CYLIP1 a HI_CYLIP19) foram retornadas pelo BlastP como mais próximas às sequências CYLIP-Cer-1, CYLIP-Cer-2 e CYLIP-Cer-3 da espécie *Cercophonius squama* (Scorpiones, Bothriuridae) (**Apêndice C**). Quatro sequências (HI_CYLIP5, HI_CYLIP6, HI_CYLIP15 e

HI_CYLIP17) compartilham *match* duplo com as sequências “*Amphipathic peptide CT1*” ou “*Amphipathic peptide CT2*” da espécie *Vaejovis smithi* (Scorpiones, Vaejovidae). Os peptídeos anfipáticos são assim nomeados por terem uma estrutura em α -hélice com duas faces, uma hidrofílica e outra hidrofóbica (Corzo et al., 2001; Ramírez-Carreto et al., 2012). Devido à alta similaridade dessas quatro sequências com os peptídeos de *V. smithi* ($\geq 73\%$; **Figura 9**), é possível que elas exerçam atividades semelhantes, como atividade antimicrobiana de amplo espectro e ação hemolítica sobre eritrócitos humanos (Ramírez-Carreto et al., 2012). Na **Figura 9**, também observamos uma alta conservação dos resíduos GKR em todas as sequências alinhadas, os quais são sítios proteolíticos que demarcam o fim da sequência madura e o início do propeptídeo (Ramírez-Carreto et al., 2012).

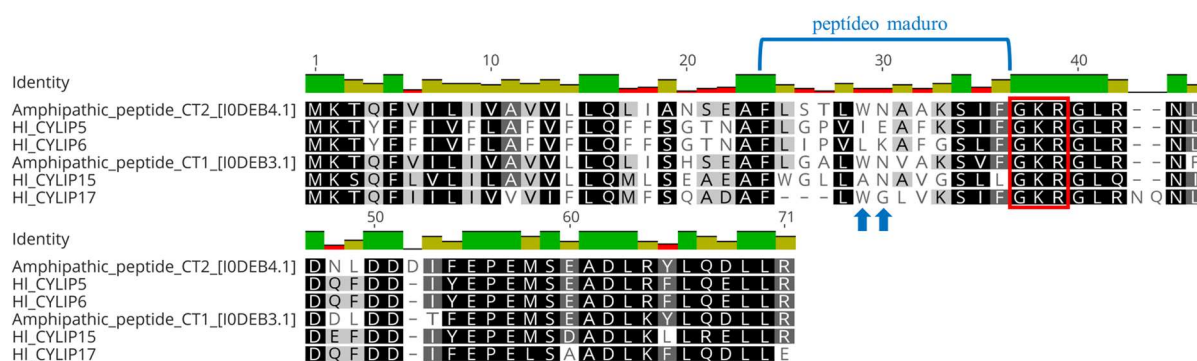


Figura 9. Alinhamento dos putativos peptídeos lineares citotóxicos HI_CYLIP5, HI_CYLIP6, HI_CYLIP15 e HI_CYLIP17 de *Hadruroides lunatus* com os peptídeos anfipáticos CT1 e CT2 do escorpião *Vaejovis smithi*. O retângulo vermelho indica resíduos GKR altamente conservados, sugerindo amidiação. As setas azuis indicam o alinhamento do 6º e do 7º resíduo de aminoácido do peptídeo maduro (consulte texto). O alinhamento foi feito usando o programa Geneious Prime.

Estudos anteriores discutiram a importância de alguns resíduos de aminoácido da sequência madura para as efetivas atividades antimicrobianas e hemolíticas desse grupo de peptídeos. Enquanto o resíduo triptofano (W) já se revelou importante na sexta posição, o resíduo neutro asparagina (N) já se mostrou importante na sétima posição da sequência madura desses peptídeos (Lee et al., 2004; Ramírez-Carreto et al., 2012). Em *H. lunatus*, esses resíduos não foram encontrados juntos em nenhuma das quatro sequências, embora a sequência HI_CYLIP17 apresente W⁶ e a sequência HI_CYLIP15 apresente N⁷ (**Figura 9**). Estudos podem ser realizados para avaliar se esse padrão é relevante para a dinâmica das possíveis atividades antibacterianas e hemolíticas entre as sequências de *H. lunatus*.

Dezesseis sequências de *H. lunatus* foram classificadas como *non-disulfide-bridge peptides* (NDBPs). Os NDBPs de escorpiões são peptídeos de 13–56 resíduos de aminoácidos, geralmente com estrutura em α -hélice, e que vêm recebendo maior atenção nas últimas duas décadas (Sunagar et al., 2013; Almaaytah & Albalas, 2014). O principal motivo para isso é que essa família de componentes tem demonstrado diversas funções e atividades biológicas, atuando como antimicrobiano, anticâncer, hemolítico, anti-inflamatório, dentre outros (Zeng et al., 2005; Almaaytah & Albalas, 2014; Cid-Urbe et al., 2020). As sequências classificadas como NDBPs de *H. lunatus* contêm de 69–78 resíduos de aminoácidos precursores (excluindo o peptídeo sinal, 46–56 resíduos) e não contêm qualquer resíduo de cisteína fora do peptídeo sinal (**Apêndice C**). Para esse grupo não houve *match* com espécies de caraboctonídeos, o que pode ser explicado pelos mesmos motivos discutidos para os CYLIPs, como isolamento geográfico seguido de processos diferenciais de seleção e menor conservação estrutura/função em relação aos peptídeos com pontes dissulfeto (Almaaytah & Albalas, 2014).

Nós sugerimos que mais estudos devem ser conduzidos para entendermos as atividades biológicas exercidas pelos componentes do grupo dos peptídeos lineares citotóxicos, principalmente pelo fato de eles integrarem uma família numerosa e multifuncional de componentes que recebem denominações genéricas (Ramírez-Carretero et al., 2012; Almaaytah & Albalas, 2014). Por mais que a maioria dos estudos realizados até hoje tenham sido focados nos peptídeos estruturados por pontes dissulfeto – os quais estão intimamente relacionados com os maiores efeitos tóxicos e letais do escorpionismo (Cid-Urbe et al., 2020) –, os peptídeos lineares se mostram, cada vez mais, como ferramentas de importância terapêutica e biotecnológica.

4.7. Peptídeos *scorpine-like*

Os peptídeos *scorpine* são um grupo de componentes que pertencem à mesma família das β -toxinas de canais de potássio (β -KTxs) (Ma et al., 2012; Luna-Ramírez et al., 2016). Assim como as β -KTxs, os peptídeos *scorpine* têm três pontes dissulfeto, mas ambos se diferem quanto à estrutura: os peptídeos *scorpine* apresentam dois domínios estruturais, sendo uma α -hélice N-terminal e um *motif* CS- $\alpha\beta$ na região C-terminal (Diego-García et al., 2008; Luna-Ramírez et al., 2016).

Os peptídeos *scorpine* são encontrados exclusivamente no veneno de escorpiões não butídeos, ao passo que as β -KTxs são tipicamente obtidas a partir dos butídeos (Diego-García et al., 2008; Ma et al., 2012). Esses componentes são classificados como peptídeos de cadeia longa e contêm entre 59 e 78 resíduos de aminoácidos em suas sequências maduras (Diego-

García et al., 2007; Diego-García et al., 2008; Feng et al., 2013). Várias atividades têm sido demonstradas para os peptídeos *scorpine*, os quais podem apresentar atividade antimicrobiana, antifúngica, antimalárica, citolítica (em procariotos e eucariotos) e bloqueadora de canais de potássio (Conde et al., 2000; Diego-García et al., 2008; Feng et al., 2013; Luna-Ramírez et al., 2016).

Uma explicação para a ampla atividade biológica exercida por esse grupo é o fato de eles apresentarem dois domínios bem definidos, com uma região N-terminal sem pontes dissulfeto, semelhante a peptídeos antimicrobianos de escorpiões, e uma região C-terminal com seis cisteínas conservadas e estruturadas no padrão esperado para KTx de escorpiões (Luna-Ramírez et al., 2016; ver também seção 4.4). Interessantemente, já foi demonstrado que os domínios estruturais de um peptídeo *scorpine* (N- e C-terminal) precisam atuar em conjunto para que ocorra o bloqueio de canais iônicos do tipo Kv1.3 (Feng et al., 2013).

Neste trabalho, nós identificamos três putativos peptídeos *scorpine-like* no transcriptoma de *H. lunatus* (Apêndice D). Como esperado para esse grupo de componentes, os três apresentam entre 95 e 105 resíduos de aminoácidos precursores (ou 76–86 resíduos, excluindo os peptídeos sinais) e seis resíduos de cisteína na região C-terminal (Figura 10). Para esse grupo, os melhores *matches* retornados pelo BlastP foram com sequências de *H. spadix*, com similaridades variando entre 72% e 83%. A alta similaridade (51%–85%) desses peptídeos com um peptídeo *scorpine-like* de *H. gertschi* também é mostrada na Figura 10. A caracterização funcional desses peptídeos é essencial para entendermos a sua atuação no escorpionismo.

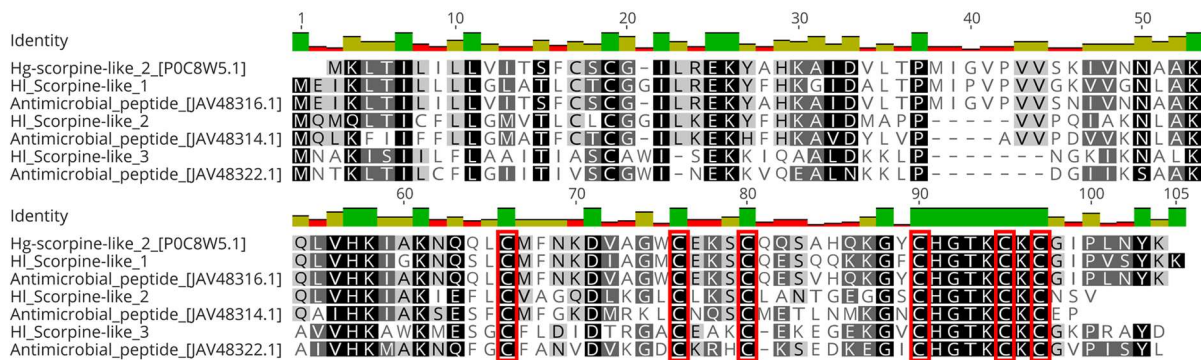


Figura 10. Alinhamento dos putativos peptídeos *scorpine-like* identificados no transcriptoma das glândulas de veneno de *Hadruroides lunatus* com sequências *scorpine-like* dos caraboctonídeos *Hadrurus gertschi* (P0C8W5.1) e *Hadrurus spadix* (JAV48316.1, JAV48314.1 e JAV48322.1). Os retângulos vermelhos destacam os seis resíduos de cisteína conservados na região C-terminal. O alinhamento foi feito usando o programa Geneious Prime.

4.8. *Venom proteins*

Diversas nomenclaturas são utilizadas para se referir a esse grupo de componentes com função desconhecida encontrado nas glândulas de veneno de escorpiões, como “proteínas hipotéticas”, “putativos peptídeos do veneno” e “proteínas não caracterizadas” (Alvarenga et al., 2012; Ma et al., 2012; Batista et al., 2018). Neste trabalho, 51 peptídeos/proteínas foram classificados genericamente como *venom proteins* (**Apêndice E**). Essas sequências apresentam de 73 a 427 resíduos de aminoácidos precursores, o que pode indicar a existência de uma alta diversificação funcional dentro desse grupo. Como exemplo dessa variedade de características estruturais, chamamos a atenção para os dois extremos agrupados nessa mesma classificação: enquanto a sequência HI_VP39 apresenta 73 resíduos de aminoácidos e quatro resíduos de cisteína, as sequências HI_VP1, HI_VP2 e HI_VP3 apresentam 427 aminoácidos e 16 resíduos de cisteína cada.

Sequências de *H. spadix* mostraram maior similaridade (até 96%) e maior número de *matches* (n = 36) com esse grupo. Para *H. spadix*, foram identificadas 66 *venom proteins* usando abordagem transcriptômica e proteômica (Rokyta & Ward, 2017; **Tabela 2**), uma quantidade parecida com aquela identificada para *H. lunatus*. Além disso, a porcentagem de transcrição inferida para essa família de componentes de *H. spadix* variou entre 20–28%, enquanto que, para *H. lunatus*, nós registramos cerca de 19%.

Assim como sugerido por Rokyta & Ward (2017), nós também indicamos aqui que esse grande número de componentes, com função desconhecida e características estruturais variadas, indica um reino inexplorado de componentes das glândulas de veneno. Pelo fato de essas sequências formarem um grupo com alto nível de transcrição (cerca de um quinto do transcriptoma analisado), elas merecem atenção em estudos futuros que busquem entender a dinâmica desses componentes no escorpionismo.

4.9. Enzimas

O veneno dos escorpiões geralmente apresenta várias atividades enzimáticas, como atividades proteolíticas, fosfolipásicas, hialuronidásicas, de amidação, dentre outras (Cid-Uribe et al., 2020). Para *H. lunatus*, nós identificamos 39 sequências precursoras de enzimas que podem atuar sinergicamente no envenenamento (**Apêndice F**).

As metaloproteases de escorpiões são enzimas que podem exercer atividade proteolítica sobre o fibrinogênio, uma glicoproteína circulante no sangue (Carmo et al., 2014). Até o momento, nenhuma enzima da família das metaloproteases foi identificada no veneno de escorpiões caraboctonídeos. Por esse motivo, nós usamos as sequências depositadas de

metaloproteases do escorpião butídeo *T. serrulatus* como referência para mapear as *reads* de *H. lunatus*, mas não identificamos nenhum componente deste grupo. Nossos resultados reforçam essa diferença na composição do veneno dos escorpiões butídeos e não butídeos, uma vez que espécies de butídeos geralmente apresentam um repertório de dezenas de metaloproteases (Cid-Uribe et al., 2020; Kalapothakis et al., 2021; Kalapothakis et al., 2023), enquanto que os não butídeos geralmente apresentam baixa diversidade ou mesmo ausência desses componentes (Schwartz et al., 2007; Rokyta & Ward, 2017; Rojas-Azofeifa et al., 2019; Cid-Uribe et al., 2020).

O grupo das fosfolipases foi o mais representativo dentre as enzimas, com 21 sequências (18 do tipo PLA2 e as restantes do tipo PLA1, PLB e PLC) e 7% do nível de transcrição analisado. As fosfolipases são enzimas encontradas em vários organismos e responsáveis pela hidrólise de fosfolipídios (Soltan-Alinejad et al., 2022). Elas são divididas em cinco classes, de acordo com o sítio de clivagem dos fosfolipídios: A1, A2, B, C e D. No veneno dos escorpiões, a classe PLA2 tem se mostrado a mais abundante e diversa (Cid-Uribe et al., 2020).

Poucas fosfolipases – ou mesmo nenhuma – foram identificadas nas glândulas de veneno de escorpiões butídeos (Rendón-Anaya et al., 2012; De Oliveira et al., 2015; De Oliveira et al., 2018; Kalapothakis et al., 2021; Kalapothakis et al., 2023). A abundância desse grupo de enzimas parece ser uma importante diferenciação não entre os escorpiões butídeos e não butídeos, mas especificamente entre *H. lunatus* e os demais escorpiões. Dentro da família Caraboctonidae, por exemplo, há uma diferença considerável entre a diversidade de fosfolipases de *H. lunatus* e aquela de *H. spadix*, com apenas nove putativas fosfolipases (seis PLA2s e uma PLA1, PLB e PLC) (Rokyta & Ward, 2017), e de *H. gertschi*, com apenas uma PLA2 (Schwartz et al., 2007). Nenhuma fosfolipase de outra classe foi identificada para essa última espécie. Além disso, as sequências PLA1, PLB e PLC de *H. lunatus* tiveram como principal *match* ($\geq 74\%$ de similaridade) as respectivas sequências de *H. spadix* (**Apêndice F**).

Costal-Oliveira et al. (2012) demonstraram que o veneno de *H. lunatus* apresenta forte atividade de PLA2, o que corrobora os resultados desse transcriptoma. Essa família de componentes pode estar diretamente relacionada com alguns efeitos reportados do escorpionismo causado por *H. lunatus*, como surgimento de edemas, escaras, agitação, hemorragia pulmonar, paralisia e alterações cardiorrespiratórias (Quiroz, 1967; Lambeau & Lazdunski, 1999; Cavalcante et al., 2017; Costal-Oliveira et al., 2017). Isso se deve ao fato de que as PLA2s são enzimas multifuncionais, responsáveis por causarem efeitos como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, inflamação e lesão pulmonar (Nisenbom et al., 1986; Furue et al., 1999; Lambeau & Lazdunski, 1999; Vergara et al., 2014). Outras

manifestações do envenenamento de camundongos por *H. lunatus* registradas por Costal-Oliveira et al. (2012), como sudorese, salivação e surgimento de secreções lacrimais/oculares, são geralmente observadas nos envenenamentos por *Tityus* spp. e atribuídas à ação de neurotoxinas (Pardal et al., 2014; Neto et al., 2018; Borges et al., 2020). Devido à maior relevância das fosfolipases, em comparação com as toxinas de canais iônicos (ver seções 4.2 e 4.4), no escorpionismo por *H. lunatus*, nós acreditamos que, possivelmente, essas últimas manifestações ocorrem devido a um efeito sinérgico das fosfolipases, principalmente as PLA2s, com outros componentes do veneno de *H. lunatus* (ver Zhao & Kinnunen, 2003; Pucca et al., 2020).

Ao demonstrarem a atividade cardiotoxica do veneno de *H. lunatus*, Costal-Oliveira et al. (2017), interessantemente, sugeriram que o veneno de *H. lunatus* poderia conter um componente semelhante a Imperatoxin I (IpTxI), uma PLA2 do escorpião *Pandinus imperator* que provoca atividade cardiotoxica por inibição dos RyRs dos músculos cardíacos (Valdivia et al., 1992). De todas as 18 sequências de PLA2s identificadas aqui, as mais próximas a IpTxI foram HI_PLA2_1 a HI_PLA2_5 (similaridade entre 74 e 75%; **Figura 11**), porém estudos devem ser realizados para avaliar as possíveis atividades desses componentes.



Figura 11. Alinhamento de cinco putativas fosfolipases A2 (PLA2s) precursoras de *Hadruidoidea lunatus* com a PLA2/toxina Imperatoxin I de *Pandinus imperator* (Scorpiones, Scorpionidae). As sequências HI_PLA2_1 a HI_PLA2_5 foram as mais próximas a Imperatoxin I (74–75% de similaridade), a qual tem atividade cardiotoxica. Os retângulos vermelhos indicam a conservação de doze resíduos de cisteína. Os resíduos de aminoácidos entre as setas laranjas compõem o provável sítio

de ligação de Ca^{2+} , enquanto os resíduos entre as setas azuis compõem o provável sítio catalítico das PLA2s alinhadas. O alinhamento foi feito usando o programa Geneious Prime.

As fosfolipases secretoras do tipo A2 são estruturadas por seis pontes dissulfeto e costumam apresentar um domínio funcional (domínio PA2c) conservado em animais e plantas (Lee et al., 2005; Gupta & Dash, 2017). Esse domínio é composto por dois *motifs*: um *loop* de ligação de Ca^{2+} (sequência de aminoácidos consenso = YGKYCGxxxxGC; x = qualquer aminoácido), cofator essencial para a atividade das PLA2s, e um sítio catalítico (consenso = DACCxxHDxC) (Lee et al., 2005). Nós notamos que esse *motif* de ligação de Ca^{2+} não ocorre em nenhuma das PLA2s alinhadas na **Figura 11** e em nenhuma outra PLA2 identificada neste trabalho. Porém, em escorpiões, esse *motif* pode apresentar a sequência de aminoácidos consenso GTKWCGxG (Krayem & Gargouri, 2020), o qual se mostrou conservado em todas as 18 PLA2s de *H. lunatus*. Nós notamos também que todas as sequências de PLA2s aqui identificadas apresentam sítio catalítico conservado, evidenciando, no entanto, substituições do resíduo apolar alanina (A). Esses nossos achados sobre o domínio PA2c são consistentes com as assinaturas esperadas para PLA2s, as quais podem não apresentar a conservação do referido resíduo de alanina e do *motif* de ligação de Ca^{2+} (InterPro: PF05826). Em síntese, como as 18 sequências de PLA2s de *H. lunatus* apresentam os *motifs* GTKWCGxG para o *loop* de ligação de Ca^{2+} e DxCCRxHDxC para o sítio catalítico (**Apêndice F**), se diferenciando assim de algumas assinaturas que seriam esperadas na literatura, nós sugerimos que as sequências-consenso do domínio PA2c sejam futuramente mais investigadas e atualizadas, dentro e fora do grupo dos escorpiões.

O veneno de *H. lunatus* também já demonstrou atividade hialuronidásica (Costal-Oliveira et al., 2012). Neste estudo, nós identificamos duas putativas isoformas, denominadas Hl_Hyal1 e Hl_Hyal2, as quais compartilham 86% de similaridade com uma putativa hialuronidase de *Superstitionia donensis* (Scorpiones, Superstitionidae) (**Apêndice F**).

As hialuronidases são amplamente encontradas em eucariotos e procariotos e são principalmente responsáveis pela hidrólise do ácido hialurônico, o que aumenta a permeabilidade dos tecidos (Farr et al., 1997; Cid-Urbe et al., 2020). Por isso, as hialuronidases têm sido usadas terapêuticamente como adjuvantes, auxiliando os processos de absorção e dispersão de drogas injetáveis (Bordon et al., 2015). No escorpionismo, as hialuronidases parecem atuar como um fator de espalhamento dos demais componentes do veneno, difundindo-os do local da picada até a corrente sanguínea e o interior de órgãos, como demonstrado para o butídeo *T. serrulatus* (Oliveira-Mendes et al., 2019; Cid-Urbe et al., 2020).

A existência de processos evolutivos diferenciais entre as hialuronidasas de butídeos e não butídeos já foi sugerida (Salabi & Jafari, 2022), então somente o isolamento e a futura caracterização das sequências HI_Hyal1 e HI_Hyal2 poderão revelar se essas hialuronidasas de *H. lunatus* apresentam as atividades biológicas descritas para aquelas de *T. serrulatus*.

Nós também identificamos sete putativas dissulfeto isomerases (**Apêndice F**). Essas enzimas catalisam modificações pós-traducionais importantes, como a formação e a correção das pontes dissulfeto (Noiva, 1999). Essas modificações são essenciais para a estabilidade e para a manutenção do *folding* correto de diversos componentes das glândulas de veneno, como as neurotoxinas e a maioria dos peptídeos secretados (Noiva, 1999; Safavi-Hemami et al., 2016). A denominação que nós empregamos para essas enzimas (dissulfeto isomerase A3 a A6 e TMX3) foi baseada naquela utilizada para os seus *matches* (principalmente, sequências da espécie *Centruroides sculpturatus*), que, por sua vez, foi baseada na homologia com enzimas humanas. Uma revisão sobre as funções de cada uma dessas famílias enzimáticas humanas pode ser encontrada em Galligan & Petersen (2012).

Além das dissulfeto isomerases, as enzimas de amidação também são conhecidas como responsáveis pelo aumento da atividade tóxica do veneno. Isso se deve ao fato de que essas enzimas realizam a amidação C-terminal de diversos peptídeos, como neurotoxinas e antimicrobianos, permitindo que esses componentes exerçam plenamente as suas atividades biológicas (Coelho et al., 2014; Delgado-Prudencio et al., 2019). Identificamos as enzimas PAM e PHM neste transcriptoma de *H. lunatus*, mas não identificamos uma terceira enzima de amidação existente em escorpiões (*peptidyl- α -hydroxyglycine α -amidating lyase* – PAL), a qual é encontrada em espécies de butídeos (Kalapothakis et al., 2021; Kalapothakis et al., 2023). Duas possíveis explicações para isso podem ser o surgimento de novas forças evolutivas sobre essa enzima de *H. lunatus*, o que gerou grande diferenciação e não permitiu a sua identificação com as nossas estratégias de análise transcriptômica, ou a supressão desse gene em *H. lunatus*. Essa última explicação é evolutivamente possível, uma vez que essas três enzimas atuam em um duplo sistema de amidação C-terminal: ou com as enzimas PHM e PAL catalisando sequencialmente as reações, de forma monofuncional cada uma, ou com a enzima PAM atuando de forma bifuncional (Delgado-Prudencio et al., 2019). Dessa forma, a ausência da enzima PAL pode não representar um grande impedimento para os processos de amidação de peptídeos de *H. lunatus*. Estudos futuros também poderão investigar se existe uma maior especificidade de cada um desses dois sistemas de amidação de acordo com as famílias de componentes do veneno a serem amidados.

Outra família de enzimas identificada foi a das peptidases M2. Essa família, também conhecida como peptidil-dipeptidase A ou enzima conversora de angiotensina (ACE), pertence ao grande grupo das metalopeptidases (Rawlings & Barrett, 1995; Rawlings & Bateman, 2019). A principal função das peptidases M2/ACEs é a clivagem de dipeptídeos C-terminais, principalmente para a conversão de angiotensina I em angiotensina II, um potente vasopressor (Rawlings & Barrett, 1995; Corvol et al., 2004). Estratégias de inibição dessas enzimas têm mostrado importância médica no tratamento de doenças cardiovasculares e hipertensão, uma vez que essa inibição impede a formação de angiotensina II e permite a ativação dos peptídeos bradicinina, agentes vasodilatadores que são inativados por ACEs (Turner & Hooper, 2002; Bomback & Toto, 2009). Como mencionado anteriormente (seção 4.6), nós não identificamos peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs) no transcriptoma de *H. lunatus*, embora esses peptídeos tenham sido encontrados nas glândulas de veneno dos caraboctonídeos *H. gertschi* e *H. spadix*.

De acordo com a nossa classificação das sequências de *H. lunatus*, identificamos três sequências como peptidases M2 e duas sequências como ACEs (**Apêndice F**). Isso ocorreu devido às maiores correspondências das referidas sequências de *H. lunatus* com sequências depositadas no NCBI. São necessários estudos para determinar se tais componentes, tidos como sinônimos, exercem atividades biológicas semelhantes. O número de sequências de *H. lunatus* classificadas na família das peptidases M2 ($n = 3$) foi muito parecido com o que fora identificado para *H. spadix* ($n = 4$; **Tabela 2**). Essas três sequências de *H. lunatus* têm entre 396 e 486 resíduos de aminoácidos precursores e, curiosamente, compartilham de 80% a 85% de similaridade com a mesma peptidase M2 de *H. spadix* (JAV47965.1; **Apêndice F**). Além disso, essas três sequências compartilham similaridade $\geq 98\%$ entre si e baixa similaridade com sequências de ACEs. Já as duas sequências classificadas como ACEs têm entre 489 e 599 resíduos de aminoácidos precursores e compartilham similaridade de 65% com sequências de ACEs das espécies *Araneus ventricosus* e *Parasteatoda tepidariorum* (sequência HI_ACE1; *match* duplo) e de 86% com uma sequência de *H. spadix* (sequência HI_ACE2).

A ocorrência do *motif* H-E-x-x-H ($x =$ qualquer aminoácido), no qual os resíduos de histidina são responsáveis pela ligação de zinco e o ácido glutâmico é o resíduo catalítico, foi descrita para cerca de metade das famílias inseridas no grande grupo das metalopeptidases (Rawlings & Barrett, 1993; Rawlings & Barrett, 1995). Nós observamos a conservação desse *motif* somente nas duas sequências de ACEs; i.e., não observamos em nenhuma das três sequências identificadas como peptidases M2. Por isso, nós reforçamos novamente o motivo de termos empregado diferentes nomenclaturas dentro desse grande grupo de componentes.

Identificamos uma única putativa L-aminoácido oxidase (HI_LAAO) neste transcriptoma, a qual contém 520 resíduos de aminoácidos precursores e compartilha 96% de similaridade com a sequência JAV48068.1 de *H. spadix*. As LAAOs são enzimas que catalisam a desaminação oxidativa de L-aminoácidos, produzindo o α -cetoácido correspondente e liberando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Pollegioni et al., 2013; Curti et al., 2019). Essas enzimas são encontradas em vários organismos, principalmente em serpentes, e são cada vez mais reconhecidas como enzimas multifuncionais, com atividades antimicrobiana, antiparasitária, citotóxica, edematosa e hemorrágica (Souza et al., 1999; Ahn et al., 2000; Stábeli et al., 2004; Ciscotto et al., 2009; Paiva et al., 2011; Lee et al., 2014).

Algumas atividades de LAAOs de serpentes já foram demonstradas, incluindo apoptose e necrose de queratinócitos e células Jurkat, e efeitos antiproliferativos em várias células cancerígenas (Ande et al., 2006; Teixeira et al., 2016; Costal-Oliveira et al., 2019; Nikodijević et al., 2021). As LAAOs de escorpiões são atualmente muito pouco estudadas e conhecidas. Neste trabalho, avaliamos pela primeira vez a atividade de LAAO de um escorpião caraboctonídeo. Determinamos a atividade de LAAO com base na atividade de desaminação oxidativa da L-leucina com liberação de H_2O_2 e demonstramos que 10 μ g e 20 μ g do veneno total de *H. lunatus* não foram capazes de catalisar reações com liberação de H_2O_2 (**Figura 12**).

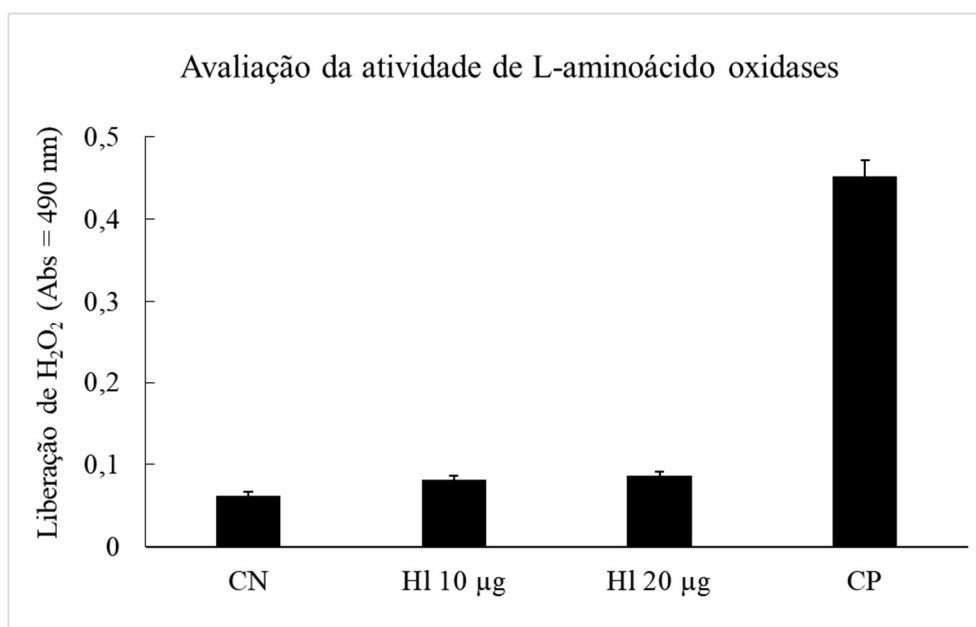


Figura 12. Avaliação da atividade da enzima L-aminoácido oxidase (LAAO) obtida a partir de 10 μ g e 20 μ g do veneno total de *Hadruioides lunatus* (HI). Três experimentos independentes foram realizados em duplicata e o desvio padrão é indicado em cada barra. Controle negativo (CN) = reação sem veneno. Controle positivo (CP) = reação com 2 μ g de veneno da serpente *Bothrops atrox*.

Tem sido demonstrado que venenos de escorpiões podem apresentar (Magalhães et al., 2021) ou não (Estrada-Gómez et al., 2017; Das et al., 2020) atividade de LAAO. Até onde sabemos, a atividade de L-aminoácido oxidases só foi registrada para espécies de escorpiões butídeos (Ahn et al., 2000; Magalhães et al., 2021). Ressaltamos que o viés metodológico pode contribuir para o resultado dessa atividade enzimática, uma vez que estudos anteriores que registraram a atividade de LAAO para escorpiões butídeos foram conduzidos ou usando extrato tamponado de espécimes (Ahn et al., 2020) ou 40 µg de veneno (Magalhães et al., 2021). Além disso, como essa LAAO de *H. lunatus* representou somente 0,004% do nível de transcrição analisado (no veneno de serpentes, a porcentagem de LAAO pode chegar a 25%; ver Izidoro et al., 2014), acreditamos que sua atividade enzimática será registrada em ensaios conduzidos com uma quantidade maior de veneno total ou com a LAAO isolada e purificada.

Finalmente, nós identificamos um putativo inibidor de protease (HI_Protease_inhibitor), para o qual nós não pudemos inferir nenhuma função ou atividade biológica. Esse putativo componente tem 431 resíduos de aminoácidos precursores e compartilha 83% de similaridade com uma sequência de *Megacormus gertschi* (Scorpiones, Euscorpidae).

CONCLUSÕES

A composição das glândulas de veneno de espécies da família Caraboctonidae (Arachnida, Scorpiones) é pouco conhecida. Até o momento, somente duas espécies dessa família, ambas pertencentes ao gênero *Hadrurus*, foram estudadas. O caraboctonídeo *Hadruroides lunatus* é o escorpião que causa o maior número de acidentes no Peru e nenhum estudo buscou avaliar a diversidade de componentes produzida por essa espécie ou gênero. Neste trabalho, nós utilizamos abordagem transcriptômica para identificar 145 componentes das glândulas de veneno de *H. lunatus* e discutimos a importância dessas sequências para o envenenamento. Nossos dados reforçam estudos prévios que indicavam uma grande distinção entre a composição do veneno de escorpiões butídeos (reconhecidamente, os escorpiões de maior importância médica) e não butídeos. Enquanto butídeos possuem um veneno predominantemente neurotóxico, nós registramos que o veneno desse caraboctonídeo é majoritariamente constituído por componentes pouco conhecidos, como os peptídeos lineares citotóxicos e as, genericamente classificadas, “venom proteins”. Assim, evidências de um reino inexplorado de componentes das glândulas de veneno de escorpiões foram aqui discutidas. Finalmente, como nós identificamos uma enzima L-aminoácido oxidase (LAAO) pouco transcrita, realizamos o primeiro ensaio para avaliar a atividade dessa enzima em um

representante da família Caraboctonidae e demonstramos que 20 µg de veneno total não apresentam atividade de LAAO *in vitro*.

Adiciono ao **Apêndice G** os estudos que ajudei a desenvolver desde a minha admissão no Programa de Pós-Graduação em Genética (nível mestrado). Esses artigos fazem parte das linhas de pesquisa em Toxinologia, Evolução e Montagem de Genomas, com foco na identificação e caracterização de novos componentes bioativos de glândulas de veneno e também na montagem de genomas mitocondriais de espécies ameaçadas pelo tráfico de animais silvestres.

REFERÊNCIAS

- Adebowale, K. O., & Lawal, O. S. (2003). Foaming, gelation and electrophoretic characteristics of mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrates. *Food chemistry*, 83(2), 237-246.
- Ahn, M. Y., Ryu, K. S., Lee, Y. W., & Kim, Y. S. (2000). Cytotoxicity and L-amino acid oxidase activity of crude insect drugs. *Archives of Pharmacal Research*, 23, 477-481.
- Almaaytah, A., & Albalas, Q. (2014). Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: a review. *Peptides*, 51, 35-45.
- Alvarenga, É. R., Mendes, T. M., Magalhães, B. F., Siqueira, F. F., Dantas, A. E., Barroca, T. M., ... & Kalapothakis, E. (2012). Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. *Open Journal of Genetics*, 2, 210–220.
- Ande, S. R., Kommoju, P. R., Draxl, S., Murkovic, M., Macheroux, P., Ghisla, S., & Ferrando-May, E. (2006). Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. *Apoptosis*, 11, 1439-1451.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., De Castro, E., ... & Stockinger, H. (2012). ExpASY: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic acids research*, 40(W1), W597-W603.
- Batista, C. V. F., Martins, J. G., Restano-Cassulini, R., Coronas, F. I., Zamudio, F. Z., Procópio, R., & Possani, L. D. (2018). Venom characterization of the Amazonian scorpion *Tityus metuendus*. *Toxicon*, 143, 51-58.
- Bomback, A. S., & Toto, R. (2009). Dual blockade of the renin–angiotensin–aldosterone system: beyond the ACE inhibitor and angiotensin-II receptor blocker combination. *American journal of hypertension*, 22(10), 1032-1040.
- Bordon, K. C., Wiesel, G. A., Amorim, F. G., & Arantes, E. C. (2015). Arthropod venom Hyaluronidases: biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 21, 4-4.

Borges, A., Lomonte, B., Angulo, Y., de Patiño, H. A., Pascale, J. M., Otero, R., ... & Carro-Lopez, J. A. (2020). Venom diversity in the Neotropical scorpion genus *Tityus*: Implications for antivenom design emerging from molecular and immunochemical analyses across endemic areas of scorpionism. *Acta Tropica*, 204, 105346.

Bregge-Silva, C., Nonato, M. C., de Albuquerque, S., Ho, P. L., de Azevedo, I. L. J., Diniz, M. R. V., ... & Arantes, E. C. (2012). Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. *Toxicon*, 60(7), 1263-1276.

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, 10(1), 1-9.

Carmo, A. O., Oliveira-Mendes, B. B. R., Horta, C. C. R., Magalhães, B. F., Dantas, A. E., Chaves, L. M., ... & Kalapothakis, E. (2014). Molecular and functional characterization of metalloproteases, new metalloproteases from the *Tityus serrulatus* venom gland. *Toxicon*, 90, 45-55.

Catterall, W. A. (1995). Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annual review of biochemistry*, 64(1), 493-531.

Cavalcante, W. L., Noronha-Matos, J. B., Timóteo, M. A., Fontes, M. R., Gallacci, M., & Correia-de-Sá, P. (2017). Neuromuscular paralysis by the basic phospholipase A2 subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom needs its acid chaperone to concurrently inhibit acetylcholine release and produce muscle blockage. *Toxicology and applied pharmacology*, 334, 8-17.

Chippaux, J. P., & Goyffon, M. (2008). Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta tropica*, 107(2), 71-79.

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1), 156-159.

Cid-Uribe, J. I., Veytia-Bucheli, J. I., Romero-Gutierrez, T., Ortiz, E., & Possani, L. D. (2020). Scorpion venomomics: a 2019 overview. *Expert review of proteomics*, 17(1), 67-83.

Ciscotto, P., De Avila, R. M., Coelho, E. A. F., Oliveira, J., Diniz, C. G., Farías, L. M., ... & Chávez-Olórtegui, C. (2009). Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*, 53(3), 330-341.

Coates, D. (2003). The angiotensin converting enzyme (ACE). *The international journal of biochemistry & cell biology*, 35(6), 769-773.

Coelho, V. A., Cremonez, C. M., Anjolette, F. A. P., Aguiar, J. F., Varanda, W. A., & Arantes, E. C. (2014). Functional and structural study comparing the C-terminal amidated β -neurotoxin Ts1 with its isoform Ts1-G isolated from *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon*, 83, 15-21.

Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., & Possani, L. D. (2000). Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS letters*, 471(2-3), 165-168.

Corvol, P., Eyries, M., & Soubrier, F. (2004). Peptidyl-dipeptidase A/angiotensin I-converting enzyme. *Handbook of proteolytic enzymes*, 332-346.

Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K. J., He, W., Norton, R. S., & Nakajima, T. (2001). Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochemical journal*, 359(1), 35-45.

Costal-Oliveira, F., Duarte, C. G., De Avila, R. M., Melo, M. M., Bordon, K. D. C. F., Arantes, E. C., ... & Chávez-Olórtegui, C. (2012). General biochemical and immunological characteristics of the venom from Peruvian scorpion *Hadruroides lunatus*. *Toxicon*, 60(5), 934-942.

Costal-Oliveira, F., Guerra-Duarte, C., Castro, K. L. P., Tintaya, B., Bonilla, C., Silva, W., ... & Chávez-Olórtegui, C. (2015). Serological, biochemical and enzymatic alterations in rodents after experimental envenomation with *Hadruroides lunatus* scorpion venom. *Toxicon*, 103, 129-134.

Costal-Oliveira, F., Guerra-Duarte, C., Oliveira, M. S., Castro, K. L. P. D., Lopes-de-Sousa, L., Lara, A., ... & Chávez-Olórtegui, C. (2017). Cardiorespiratory alterations in rodents experimentally envenomed with *Hadruroides lunatus* scorpion venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 23.

Costal-Oliveira, F., Stransky, S., Guerra-Duarte, C., Naves de Souza, D. L., Vivas-Ruiz, D. E., Yarlequé, A., ... & Braga, V. M. (2019). L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom triggers autophagy, apoptosis and necrosis in normal human keratinocytes. *Scientific Reports*, 9(1), 781.

Curti, B., Ronchi, S., & Simonetta, M. P. (2019). D-and L-amino acid oxidases. In *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes* (pp. 69-94). CRC Press.

Dai, L., Yasuda, A., Naoki, H., Corzo, G., Andriantsiferana, M., & Nakajima, T. (2001). IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochemical and biophysical research communications*, 286(4), 820-825.

Dai, L., Corzo, G., Naoki, H., Andriantsiferana, M., & Nakajima, T. (2002). Purification, structure–function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochemical and biophysical research communications*, 293(5), 1514-1522.

Das, B., Patra, A., & Mukherjee, A. K. (2020). Correlation of venom toxinome composition of Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) with clinical manifestations of scorpion stings: failure of commercial antivenom to immune-recognize the abundance of low molecular mass toxins of this venom. *Journal of proteome research*, 19(4), 1847-1856.

De la Vega, R. C. R., & Possani, L. D. (2004). Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon*, 43(8), 865-875.

- De Oliveira, U. C., Candido, D. M., Dorce, V. A. C., & Junqueira-de, I. D. L. M. (2015). The transcriptome recipe for the venom cocktail of *Tityus bahiensis* scorpion. *Toxicon*, 95, 52-61.
- De Oliveira, U. C., Nishiyama Jr, M. Y., Dos Santos, M. B. V., Santos-da-Silva, A. D. P., Chalkidis, H. D. M., Souza-Imberg, A., ... & Junqueira-de-Azevedo, I. D. L. M. (2018). Proteomic endorsed transcriptomic profiles of venom glands from *Tityus obscurus* and *T. serrulatus* scorpions. *PLoS One*, 13(3), e0193739.
- Delgado-Prudencio, G., Possani, L. D., Becerril, B., & Ortiz, E. (2019). The dual α -amidation system in scorpion venom glands. *Toxins*, 11(7), 425.
- Diego-García, E., Schwartz, E. F., D'Suze, G., González, S. A. R., Batista, C. V., García, B. I., ... & Possani, L. D. (2007). Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain β -KTx-like peptides in scorpion venoms: Identification of "orphan" components. *Peptides*, 28(1), 31-37.
- Diego-García, E., Abdel-Mottaleb, Y., Schwartz, E. F., de la Vega, R. R., Tytgat, J., & Possani, L. D. (2008). Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of β -KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 187-200.
- Diniz, M. R., Paiva, A. L., Guerra-Duarte, C., Nishiyama Jr, M. Y., Mudadu, M. A., Oliveira, U. D., ... & Junqueira-de-Azevedo, I. D. L. (2018). An overview of *Phoneutria nigriventer* spider venom using combined transcriptomic and proteomic approaches. *PloS one*, 13(8), e0200628.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., ... & Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15-21.
- Edmunds, M. C., & Sibly, R. M. (2010). Optimal sting use in the feeding behavior of the scorpion *Hadrurus spadix*. *The Journal of Arachnology*, 38(1), 123-125.
- El-Bitar, A. M., Sarhan, M., Abdel-Rahman, M. A., Quintero-Hernandez, V., Aoki-Utsubo, C., Moustafa, M. A., ... & Hotta, H. (2020). Smp76, a scorpine-like peptide isolated from the venom of the scorpion *Scorpio maurus palmatus*, with a potent antiviral activity against hepatitis C virus and dengue virus. *International journal of peptide research and therapeutics*, 26, 811-821.
- Escobar, E., Rivera, C., Tincopa, L., & Rivera, D. (2002). Purificación parcial de las toxinas H11, H12 y H13 del veneno del escorpión *Hadrurides lunatus* KOCH, 1867 (Scorpionida: Vejovidae). *Rev. peru. biol*, 9(1), 3-10.
- Escobar, E., Flores, L., & Rivera, C. (2008). Péptidos antibacterianos de los venenos de *Hadrurides mauryi* y *Centruroides margaritatus*. *Revista peruana de biología*, 15(1), 139-142.
- Estrada-Gómez, S., Gomez-Rave, L., Vargas-Muñoz, L. J., & Van der Meijden, A. (2017). Characterizing the biological and biochemical profile of six different scorpion venoms from the Buthidae and Scorpionidae family. *Toxicon*, 130, 104-115.
- Evans, T. G. (2015). Considerations for the use of transcriptomics in identifying the 'genes that matter' for environmental adaptation. *The Journal of experimental biology*, 218(12), 1925-1935.

Farr, C., Menzel, J., Seeberger, J., & Schweigle, B. (1997). Clinical pharmacology and possible applications of hyaluronidase with reference to Hylase" Dessau". *Wiener Medizinische Wochenschrift* (1946), 147(15), 347-355.

Feng, J., Yu, C., Wang, M., Li, Z., Wu, Y., Cao, Z., ... & Han, S. (2013). Expression and characterization of a novel scorpine-like peptide Ev37, from the scorpion *Euscorpions validus*. *Protein Expression and Purification*, 88(1), 127-133.

Furue, S., Kuwabara, K., Mikawa, K., Nishina, K., Shiga, M., Maekawa, N., ... & Obara, H. (1999). Crucial Role of Group IIA Phospholipase A2 in Oleic Acid-Induced Acute Lung Injury in Rabbits. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 160(4), 1292-1302.

Galligan, J. J., & Petersen, D. R. (2012). The human protein disulfide isomerase gene family. *Human genomics*, 6, 1-15.

Gomes, A., Bhattacharjee, P., Mishra, R., Biswas, A. K., Dasgupta, S. C., Giri, B., ... & Gomes, A. (2010). Anticancer potential of animal venoms and toxins.

Guatimosim, S. C., Prado, V. F., Diniz, C. R., Chávez-Olórtegui, C., & Kalapothakis, E. (1999). Molecular cloning and genomic analysis of TsNTxp: an immunogenic protein from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, 37(3), 507-517.

Gupta, P., & Dash, P. K. (2017). Molecular details of secretory phospholipase A2 from flax (*Linum usitatissimum* L.) provide insight into its structure and function. *Scientific Reports*, 7(1), 11080.

Harrison, P. L., Abdel-Rahman, M. A., Miller, K., & Strong, P. N. (2014). Antimicrobial peptides from scorpion venoms. *Toxicon*, 88, 115-137.

Hofmann, E. P., Rautsaw, R. M., Strickland, J. L., Holding, M. L., Hogan, M. P., Mason, A. J., ... & Parkinson, C. L. (2018). Comparative venom-gland transcriptomics and venom proteomics of four Sidewinder Rattlesnake (*Crotalus cerastes*) lineages reveal little differential expression despite individual variation. *Scientific Reports*, 8(1), 15534.

Horita, S., Matsushita, N., Kawachi, T., Ayabe, R., Miyashita, M., Miyakawa, T., ... & Tanokura, M. (2011). Solution structure of a short-chain insecticidal toxin LaIT1 from the venom of scorpion *Liocheles australasiae*. *Biochemical and biophysical research communications*, 411(4), 738-744.

Incamnoi, P., Patramanon, R., Thammasirirak, S., Chaveerach, A., Uawonggul, N., Sukprasert, S., ... & Daduang, S. (2013). Heteromtoxin (HmTx), a novel heterodimeric phospholipase A2 from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. *Toxicon*, 61, 62-71.

Isbister, G. K., & Bawaskar, H. S. (2014). Scorpion envenomation. *New England Journal of Medicine*, 371(5), 457-463.

Izidoro, L. F. M., Sobrinho, J. C., Mendes, M. M., Costa, T. R., Grabner, A. N., Rodrigues, V. M., ... & Soares, A. M. (2014). Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. *BioMed Research International*, 2014.

- Kalapothakis, Y., Miranda, K., Pereira, A. H., Witt, A. S., Marani, C., Martins, A. P., ... & Kalapothakis, E. (2021). Novel components of *Tityus serrulatus* venom: A transcriptomic approach. *Toxicon*, 189, 91-104.
- Kalapothakis, Y., Miranda, K., Molina, D. A. M., Conceição, I. M. C. A., Larangote, D., den Camp, H. J. O., ... & Borges, A. (2023). An overview of *Tityus cisandinus* scorpion venom: Transcriptome and mass fingerprinting reveal conserved toxin homologs across the Amazon region and novel lipolytic components. *International Journal of Biological Macromolecules*, 225, 1246-1266.
- Kimlicka, L., & Van Petegem, F. (2011). The structural biology of ryanodine receptors. *Science China Life Sciences*, 54, 712-724.
- Kourie, J. I., & Shorthouse, A. A. (2000). Properties of cytotoxic peptide-formed ion channels. *American journal of physiology-Cell physiology*, 278(6), C1063-C1087.
- Krayem, N., & Gargouri, Y. (2020). Scorpion venom phospholipases A2: A minireview. *Toxicon*, 184, 48-54.
- Lambeau, G., & Lazdunski, M. (1999). Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. *Trends in pharmacological sciences*, 20(4), 162-170.
- Lee, K., Shin, S. Y., Kim, K., Lim, S. S., Hahm, K. S., & Kim, Y. (2004). Antibiotic activity and structural analysis of the scorpion-derived antimicrobial peptide IsCT and its analogs. *Biochemical and biophysical research communications*, 323(2), 712-719.
- Lee, H. Y., Bahn, S. C., Shin, J. S., Hwang, I., Back, K., Doelling, J. H., & Ryu, S. B. (2005). Multiple forms of secretory phospholipase A2 in plants. *Progress in Lipid Research*, 44(1), 52-67.
- Lee, M. L., Chung, I., Yee Fung, S., Kanthimathi, M. S., & Hong Tan, N. (2014). Antiproliferative Activity of King Cobra (*Ophiophagus hannah*) Venom l-Amino Acid Oxidase. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 114(4), 336-343.
- Legros, C., Céard, B., Bougis, P. E., & Martin-Eauclaire, M. F. (1998). Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. *FEBS letters*, 431(3), 375-380.
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923-930.
- Lourenço, W. R. (2008). Parthenogenesis in scorpions: some history-new data. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 14, 19-44.
- Lourenço, W. R. (2015) Scorpion diversity and distribution: past and present patterns. In: P Gopalakrishnakone, et al. editors. *Scorpion Venoms, Toxinology*. Springer+Business Media Dordrecht. p. 3–23.

Lourenço, W. R. (2018a). The evolution and distribution of noxious species of scorpions (Arachnida: Scorpiones). *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 24.

Lourenço, W. R. (2018b). Scorpions and life-history strategies: from evolutionary dynamics toward the scorpionism problem. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 24.

Luna-Ramírez, K., Quintero-Hernandez, V., Juarez-Gonzalez, V. R., & Possani, L. D. (2015). Whole transcriptome of the venom gland from *Urodacus yaschenkoi* scorpion. *PloS one*, 10(5), e0127883.

Luna-Ramirez, K. S., Jimenez-Vargas, J. M., & Possani, L. D. (2016). Scorpine-like peptides. *Single Cell Biology*, 5(2), 1000138-1-1000138-3.

Ma, Y., Zhao, R., He, Y., Li, S., Liu, J., Wu, Y., ... & Li, W. (2009). Transcriptome analysis of the venom gland of the scorpion *Scorpiops jendeki*: implication for the evolution of the scorpion venom arsenal. *BMC genomics*, 10(1), 1-15.

Ma, Y., He, Y., Zhao, R., Wu, Y., Li, W., & Cao, Z. (2012). Extreme diversity of scorpion venom peptides and proteins revealed by transcriptomic analysis: implication for proteome evolution of scorpion venom arsenal. *Journal of proteomics*, 75(5), 1563-1576.

Magalhães, A. C. M., de Santana, C. J. C., Melani, R. D., Domont, G. B., Castro, M. S., Fontes, W., ... & Júnior, O. R. P. (2021). Exploring the biological activities and proteome of Brazilian scorpion *Rhopalurus agamemnon* venom. *Journal of Proteomics*, 237, 104119.

Martin, J. A., & Wang, Z. (2011). Next-generation transcriptome assembly. *Nature Reviews Genetics*, 12(10), 671-682.

Martinez, G., Hograindleur, J. P., Voisin, S., Abi Nahed, R., Abd El Aziz, T. M., Escoffier, J., ... & Arnoult, C. (2017). Spermaurin, an La1-like peptide from the venom of the scorpion *Scorpio maurus palmatus*, improves sperm motility and fertilization in different mammalian species. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 23(2), 116-131.

Ministerio de Salud del Peru (2005). Norma técnica sobre prevención y tratamiento de accidentes por animales ponzoñosos. http://bvs.minsa.gob.pe/local/dgsp/123_NTPONZONOSOS.pdf

Miyashita, M., Otsuki, J., Hanai, Y., Nakagawa, Y., & Miyagawa, H. (2007). Characterization of peptide components in the venom of the scorpion *Liocheles australasiae* (Hemiscorpiidae). *Toxicon*, 50(3), 428-437.

Moerman, L., Bosteels, S., Noppe, W., Willems, J., Clynen, E., Schoofs, L., ... & Verdonck, F. (2002). Antibacterial and antifungal properties of α -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *European journal of biochemistry*, 269(19), 4799-4810.

Morgenstern, D., Rohde, B. H., King, G. F., Tal, T., Sher, D., & Zlotkin, E. (2011). The tale of a resting gland: transcriptome of a replete venom gland from the scorpion *Hottentotta judaicus*. *Toxicon*, 57(5), 695-703.

- Mouchbahani-Constance, S., & Sharif-Naeini, R. (2021). Proteomic and transcriptomic techniques to decipher the molecular evolution of venoms. *Toxins*, 13(2), 154.
- Mullen, G. R., & Sissom, W. D. (2019). Scorpions (scorpiones). In *Medical and veterinary entomology* (pp. 489-504). Academic Press.
- Mutz, K. O., Heilkenbrinker, A., Lönne, M., Walter, J. G., & Stahl, F. (2013). Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Current opinion in biotechnology*, 24(1), 22-30.
- Neto, E. B., Mariano, D. O., Freitas, L. A., Dorce, A. L., Martins, A. N., Pimenta, D. C., ... & Nencioni, A. L. (2018). Tb II-I, a Fraction Isolated from Tityus bahiensis Scorpion Venom, Alters Cytokines': Level and Induces Seizures When Intrahippocampally Injected in Rats. *Toxins*, 10(6).
- Nikodijević, D. D., Jovankić, J. V., Cvetković, D. M., Anđelković, M. Z., Nikezić, A. G., & Milutinović, M. G. (2021). L-amino acid oxidase from snake venom: Biotransformation and induction of apoptosis in human colon cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 910, 174466.
- Nisenbom, H. E., Perazzo, J. C., Monserrat, A. J., & Vidal, J. C. (1986). Contribution of phospholipase A2 to the lethal potency of Bothrops alternatus (víbora de la cruz) venom. *Toxicon*, 24(8), 807-817.
- Nishikawa, A. K., Caricati, C. P., Lima, M. L. S. R., Dos Santos, M. C., Kipnis, T. L., Eickstedt, V. R. D., ... & Da Silva, W. D. (1994). Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. *Toxicon*, 32(8), 989-998.
- Noiva, R. (1999, October). Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 10, No. 5, pp. 481-493). Academic Press.
- Ochoa, J. A., & Prendini, L. (2010). The genus Hadruidoidea Pocock, 1893 (Scorpiones: Iuridae), in Peru: new records and descriptions of six new species. *American Museum Novitates*, 2010(3687), 1-56.
- Oliveira-Mendes, B. B. R. D., Miranda, S. E. M., Sales-Medina, D. F., Magalhaes, B. D. F., Kalapothakis, Y., Souza, R. P. D., ... & Horta, C. C. R. (2019). Inhibition of Tityus serrulatus venom hyaluronidase affects venom biodistribution. *PLOS neglected tropical diseases*, 13(4), e0007048.
- Oukkache, N., Chgoury, F., Lalaoui, M., Cano, A. A., & Ghalim, N. (2013). Comparison between two methods of scorpion venom milking in Morocco. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 19, 1-5.
- Paiva, R. D. M. A., de Freitas Figueiredo, R., Antonucci, G. A., Paiva, H. H., Bianchi, M. D. L. P., Rodrigues, K. C., ... & Sampaio, S. V. (2011). Cell cycle arrest evidence, parasiticidal and bactericidal properties induced by L-amino acid oxidase from Bothrops atrox snake venom. *Biochimie*, 93(5), 941-947.

- Pardal, P. P., Ishikawa, E. A., Vieira, J. L., Coelho, J. S., Dórea, R. C., Abati, P. A., ... & Chalkidis, H. M. (2014). Clinical aspects of envenomation caused by *Tityus obscurus* (Gervais, 1843) in two distinct regions of Pará state, Brazilian Amazon basin: a prospective case series. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 20, 1-7.
- Pimenta, A. M., Legros, C., de Marco Almeida, F., Mansuelle, P., De Lima, M. E., Bougis, P. E., & Martin-Eauclaire, M. F. (2003). Novel structural class of four disulfide-bridged peptides from *Tityus serrulatus* venom. *Biochemical and biophysical research communications*, 301(4), 1086-1092.
- Pimenta, R. J. G., Brandão-Dias, P. F. P., Leal, H. G., Carmo, A. O. D., Oliveira-Mendes, B. B. R. D., Chávez-Olórtegui, C., & Kalapothakis, E. (2019). Selected to survive and kill: *Tityus serrulatus*, the Brazilian yellow scorpion. *PLoS One*, 14(4), e0214075.
- Pollegioni, L., Motta, P., & Molla, G. (2013). L-amino acid oxidase as biocatalyst: a dream too far?. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 9323-9341.
- Possani, L. D., Becerril, B., Delepierre, M., & Tytgat, J. (1999). Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *European journal of biochemistry*, 264(2), 287-300.
- Pucca, M. B., Cerni, F. A., Junior, E. L. P., Bordon, K. D. C. F., Amorim, F. G., Cordeiro, F. A., ... & Arantes, E. C. (2015). *Tityus serrulatus* venom—a lethal cocktail. *Toxicon*, 108, 272-284.
- Pucca, M. B., Ahmadi, S., Cerni, F. A., Ledsgaard, L., Sørensen, C. V., McGeoghan, F. T., ... & Laustsen, A. H. (2020). Unity makes strength: exploring intraspecies and interspecies toxin synergism between phospholipases A2 and cytotoxins. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 611.
- Quijano-Ravell, A. F., Ponce-Saavedra, J., & Francke, O. F. (2011). Ciclo de vida de *Hadrurus gertschi* Soleglad (Scorpiones, Iuridae) en una localidad del Estado de Guerrero, Mexico. *Rev. Iber. Aracnol*, 19, 133-145.
- Quintero-Hernández, V., Ramírez-Carreto, S., Romero-Gutierrez, M. T., Valdez-Velazquez, L. L., Becerril, B., Possani, L. D., & Ortiz, E. (2015). Transcriptome analysis of scorpion species belonging to the *Vaejovis* genus. *PloS one*, 10(2), e0117188.
- Quiroz, A. D. (1967). La fauna ponzoñosa del Valle del Rímac. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 50, No. 1, pp. 105-207).
- Ramírez-Carreto, S., Quintero-Hernández, V., Jiménez-Vargas, J. M., Corzo, G., Possani, L. D., Becerril, B., & Ortiz, E. (2012). Gene cloning and functional characterization of four novel antimicrobial-like peptides from scorpions of the family Vaejovidae. *Peptides*, 34(2), 290-295.
- Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*, 290(1), 205-218.
- Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (1995). [13] Evolutionary families of metallopeptidases. In *Methods in enzymology* (Vol. 248, pp. 183-228). Academic Press.
- Rawlings, N. D., & Bateman, A. (2019). Origins of peptidases. *Biochimie*, 166, 4-18.

Rein, J. O. (2023). The scorpion files. Norwegian University of Science and Technology, online at <https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>.

Rendón-Anaya, M., Delaye, L., Possani, L. D., & Herrera-Estrella, A. (2012). Global transcriptome analysis of the scorpion *Centruroides noxius*: new toxin families and evolutionary insights from an ancestral scorpion species.

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *bioinformatics*, 26(1), 139-140.

Rojas-Azofeifa, D., Sasa, M., Lomonte, B., Diego-García, E., Ortiz, N., Bonilla, F., ... & Díaz, C. (2019). Biochemical characterization of the venom of Central American scorpion *Didymocentrus krausi* Francke, 1978 (Diplocentridae) and its toxic effects in vivo and in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 217, 54-67.

Rokyta, D. R., & Ward, M. J. (2017). Venom-gland transcriptomics and venom proteomics of the black-back scorpion (*Hadrurus spadix*) reveal detectability challenges and an unexplored realm of animal toxin diversity. *Toxicon*, 128, 23-37.

Romero-Gutierrez, T., Peguero-Sanchez, E., Cevallos, M. A., Batista, C. V., Ortiz, E., & Possani, L. D. (2017). A deeper examination of *Thorellius atrox* scorpion venom components with omic technologies. *Toxins*, 9(12), 399.

Safavi-Hemami, H., Li, Q., Jackson, R. L., Song, A. S., Boomsma, W., Bandyopadhyay, P. K., ... & Ellgaard, L. (2016). Rapid expansion of the protein disulfide isomerase gene family facilitates the folding of venom peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(12), 3227-3232.

Salabi, F., & Jafari, H. (2022). New insights about scorpion venom hyaluronidase; isoforms, expression and phylogeny. *Toxin reviews*, 1-16.

Santibáñez-López, C. E., Cid-Urbe, J. I., Batista, C. V., Ortiz, E., & Possani, L. D. (2016). Venom gland transcriptomic and proteomic analyses of the enigmatic scorpion *Superstitionia donensis* (Scorpiones: Superstitioniidae), with insights on the evolution of its venom components. *Toxins*, 8(12), 367.

Santos, M. S., Silva, C. G., Neto, B. S., Júnior, C. R. G., Lopes, V. H., Júnior, A. G. T., ... & Lima, M. A. (2016). Clinical and epidemiological aspects of scorpionism in the world: a systematic review. *Wilderness & Environmental Medicine*, 27(4), 504-518.

Sayers, E. W., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D. C., ... & Sherry, S. T. (2023). Database resources of the National Center for Biotechnology Information in 2023. *Nucleic acids research*, 51(D1), D29-D38.

Schwartz, E. F., Diego-García, E., Rodríguez de la Vega, R. C., & Possani, L. D. (2007). Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). *BMC genomics*, 8(1), 1-12.

- Shu, Q., Lu, S. Y., Gu, X. C., & Liang, S. P. (2002). The structure of spider toxin huwentoxin-II with unique disulfide linkage: Evidence for structural evolution. *Protein science*, 11(2), 245-252.
- Simone, Y., & Meijden, A. V. D. (2021). Armed stem to stinger: a review of the ecological roles of scorpion weapons. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 27.
- Smith, J. J., Hill, J. M., Little, M. J., Nicholson, G. M., King, G. F., & Alewood, P. F. (2011). Unique scorpion toxin with a putative ancestral fold provides insight into evolution of the inhibitor cystine knot motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(26), 10478-10483.
- Smith, J. J., Vetter, I., Lewis, R. J., Peigneur, S., Tytgat, J., Lam, A., ... & Dulhunty, A. F. (2013). Multiple actions of ϕ -LITX-Lw1a on ryanodine receptors reveal a functional link between scorpion DDH and ICK toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22), 8906-8911.
- Soltan-Alinejad, P., Alipour, H., Meharabani, D., & Azizi, K. (2022). Therapeutic potential of bee and scorpion venom phospholipase A2 (PLA2): a narrative review. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 47(4), 300.
- Souza, D. H., Eugenio, L. M., Fletcher, J. E., Jiang, M. S., Garratt, R. C., Oliva, G., & Selistre-de-Araujo, H. S. (1999). Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data. *Archives of biochemistry and biophysics*, 368(2), 285-290.
- Stábeli, R. G., Marcussi, S., Carlos, G. B., Pietro, R. C., Selistre-de-Araújo, H. S., Giglio, J. R., ... & Soares, A. M. (2004). Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(11), 2881-2886.
- Stevens, M., Peigneur, S., & Tytgat, J. (2011). Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Frontiers in pharmacology*, 2, 71.
- Sunagar, K., Undheim, E. A., Chan, A. H., Koludarov, I., Muñoz-Gómez, S. A., Antunes, A., & Fry, B. G. (2013). Evolution stings: the origin and diversification of scorpion toxin peptide scaffolds. *Toxins*, 5(12), 2456-2487.
- Tan, K. Y., Tan, C. H., Chanhome, L., & Tan, N. H. (2017). Comparative venom gland transcriptomics of *Naja kaouthia* (monocled cobra) from Malaysia and Thailand: elucidating geographical venom variation and insights into sequence novelty. *PeerJ*, 5, e3142.
- Teixeira, T. L., Silva, V. A. O., da Cunha, D. B., Poletini, F. L., Thomaz, C. D., Pianca, A. A., ... & Mazzi, M. V. (2016). Isolation, characterization and screening of the in vitro cytotoxic activity of a novel L-amino acid oxidase (LAAOcdt) from *Crotalus durissus terrificus* venom on human cancer cell lines. *Toxicon*, 119, 203-217.
- Turner, A. J., & Hooper, N. M. (2002). The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends in pharmacological sciences*, 23(4), 177-183.

- Valdivia, H. H., Kirby, M. S., Lederer, W. J., & Coronado, R. (1992). Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca (2+)-release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(24), 12185-12189.
- Van Verk, M. C., Hickman, R., Pieterse, C. M., & Van Wees, S. C. (2013). RNA-Seq: revelation of the messengers. *Trends in plant science*, 18(4), 175-179.
- Vasconcelos, F., Lanchote, V. L., Bendhack, L. M., Giglio, J. R., Sampaio, S. V., & Arantes, E. C. (2005). Effects of voltage-gated Na⁺ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 141(1), 85-92.
- Verano-Braga, T., Rocha-Resende, C., Silva, D. M., Ianzer, D., Martin-Eauclaire, M. F., Bougis, P. E., ... & Pimenta, A. M. C. (2008). *Tityus serrulatus* Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. *Biochemical and biophysical research communications*, 371(3), 515-520.
- Vergara, I., Pedraza-Escalona, M., Paniagua, D., Restano-Cassulini, R., Zamudio, F., Batista, C. V., ... & Alagón, A. (2014). Eastern coral snake *Micrurus fulvius* venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipases A2. *Journal of proteomics*, 105, 295-306.
- Wang, X. H., Connor, M., Smith, R., Maciejewski, M. W., Howden, M. E., Nicholson, G. M., ... & King, G. F. (2000). Discovery and characterization of a family of insecticidal neurotoxins with a rare vicinal disulfide bridge. *Nature structural biology*, 7(6), 505-513.
- Wilkinson, B., & Gilbert, H. F. (2004). Protein disulfide isomerase. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-proteins and proteomics*, 1699(1-2), 35-44.
- Williams, S. C. (1987). Scorpion bionomics. *Annual Review of Entomology*, 32(1), 275-295.
- Ye, A., Singh, H., Taylor, M. W., & Anema, S. (2002). Characterization of protein components of natural and heat-treated milk fat globule membranes. *International Dairy Journal*, 12(4), 393-402.
- Zavaleta, A., Navarro, J., & De La Mata, R. C. (1981). Pharmacological effects of a Peruvian scorpion (*Hadrurides lunatus*) venom. *Toxicon*, 19(6), 906-909.
- Zeng, X. C., Corzo, G., & Hahin, R. (2005). Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB life*, 57(1), 13-21.
- Zeng, X. C., Wang, S., Nie, Y., Zhang, L., & Luo, X. (2012). Characterization of BmKbpp, a multifunctional peptide from the Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: gaining insight into a new mechanism for the functional diversification of scorpion venom peptides. *Peptides*, 33(1), 44-51.
- Zhao, H., & Kinnunen, P. K. (2003). Modulation of the activity of secretory phospholipase A2 by antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 965-971.

Zhu, S., Gao, B., & Tytgat, J. (2005). Phylogenetic distribution, functional epitopes and evolution of the CS $\alpha\beta$ superfamily. Cellular and molecular life sciences CMLS, 62, 2257-2269.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Putativas neurotoxinas de *Hadruidoies lunatus*

Putativas neurotoxinas identificadas nas glândulas de veneno do escorpião *Hadruidoies lunatus*. Os números de acesso no GenBank serão indicados entre colchetes. Os peptídeos sinais foram inferidos usando ProP 1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?ProP-1.0>) e são mostrados em negrito e sublinhados. As correspondências mais próximas e classes putativas foram encontradas usando bancos de dados BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Componente	Sequência	Match e classe putativa	Cobertura	E-value	Identidade	Similaridade
HI_KTx1 []	<u>MRVALMLLILTVIATMTIVPSVEAD</u> GGKPEVSSECTAPCQAMGGTRGKCINKKCKC YNVGRK-	Putative K ⁺ channel toxin <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45772.1]	93%	2e-16	50%	72%
HI_KTx2 []	<u>MRVALMLLILTVIATMTIVPSVEAD</u> GEKCLVSSQCTAPCQAIGGTRGKCINKKCKC YNVGRK-	Putative K ⁺ channel toxin <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45772.1]	93%	6e-16	51.72%	70%
HI_KTx3 []	<u>MRVVLMLFLITVIAVMTIVPSVEAD</u> GEPCTASKQCTAPCRAIGGSHGKCMNRKCKC YNIRGK-	Putative K ⁺ channel toxin <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45772.1]	91%	1e-22	68.42%	85%
HI_KTx4 []	<u>MRVALMFLITVIATTTLVPSILA</u> DGEKCKSPTQCTAPCRAIGGTHGKCINGKCKCY NVGK-	Putative K ⁺ channel toxin <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45772.1]	91%	7e-15	53.57%	75%
HI_KTx5 []	<u>MARHLIALFLVIMLLSTLIDA</u> KGSIGKKIKSTVAKAVKKVKDVINSSEYMCPLVSSY CEEHCARKGKSGKCDLLECICS-	Potassium channel toxin Hge-beta- KTx <i>Hadurus gertschi</i> [Q0GY41.1]	100%	2e-30	62.03%	84%

HI_Tx1 []	<u>MGLTTKIFLVVLMVVVSTVIG</u> DEYVYSSLEEYEETDMERGLPLSGEYETCVRPRK CKPHLTCSPSQICRDPSKG-	DDH-Uro-1 <i>Urodacus manicatus</i> [JAA98061.1]	100%	2e-26	61.33%	73%
HI_Tx2 []	<u>MGLTTKIFLVVLMVVVSTVIG</u> DEDVYSSLEEYEETDMERGLPLSGEYETCVRPRK CKPHLTCSPSQICRDPSKG-	DDH-Uro-1 <i>Urodacus manicatus</i> [JAA98061.1]	100%	2e-26	61.33%	73%
HI_Tx3 []	<u>MGLTTKIFLVVLMVVVSTVIG</u> DENVYSSLEGYEETDMERGLPLSGEYETCVRPRK CKPHLTCSPSQICRDPSKG-	DDH-Uro-1 <i>Urodacus manicatus</i> [JAA98061.1]	100%	7e-26	61.33%	72%
HI_Tx4 []	<u>MKIFLVALLMVMIAAIGREAVNA</u> FEEFEESDTERGFPPSKEYEPCVRPRKCLPNLK CNAAQICVDPNKGW-	Phi-liotoxin-Lw1a <i>Hormurus waigiensis</i> [P0DJ08.1]	98%	1e-23	65.71%	72%
HI_Tx5 []	<u>MKIFLVALLVVMIAIAIVREAANA</u> FEEFEESDIERGLPLSKENEPVRPRKCLANLTC HSAWQICLKKDWGKR-	DDH-Uro-1 <i>Urodacus manicatus</i> [JAA98061.1]	87%	5e-13	50.77%	64%
		Phi-liotoxin-Lw1a <i>Hormurus waigiensis</i> [P0DJ08.1]	90%	3e-11	50.72%	63%
HI_Tx6 []	<u>MKIFLVALLMVMVATAIG</u> DEGFEEYDNNEIERDLKPGKLYESCVRPRKCEPGLTCR MPDQICVKKTR-	DDH-Uro-1 <i>Urodacus manicatus</i> [JAA98061.1]	92%	1e-09	44.62%	60%
		Phi-liotoxin-Lw1a <i>Hormurus waigiensis</i> [P0DJ08.1]	97%	4e-09	44.62%	60%
HI_Tx7 []	<u>MKIFLVALLMVMVATALG</u> DEGFEEYDNNEIERDLKPGKLYDSCVRPRKCEPGLTC RMPDQICVKKTR-	DDH-Uro-1 <i>Urodacus manicatus</i> [JAA98061.1]	92%	4e-09	43.08%	60%
		Phi-liotoxin-Lw1a <i>Hormurus waigiensis</i> [P0DJ08.1]	97%	9e-09	43.08%	60%

HI_Tx8 []	MKKFSVFTAICVFVLTRENYCNG QGKGVFPKWNGVNYITCGHLSNGE EYCQNLCSVTGGEGYCYGIKPPSCFCRRVPGKGGYIADQNRNLISCOGNEGNFRCEKICELVKA GYGYCSYDNCYCEMINP-	Putative Na ⁺ channel toxin <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45778.1]	96%	2e-13	34.65%	46%
HI_Tx9 []	MKKFSVFTAICVFVLTRENYCSG QGKGVFPKWNGVNYITCGHLSNGE EYCQNLCSVTGGEGYCYGIKPPSCFCRRVPGRGGYIADQNRNLISCOGSEGNFRCEKICGLFKA GYGYCSYDNCYCEMINP-	Putative Na ⁺ channel toxin <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45778.1]	96%	1e-13	34.65%	45%
HI_Tx10 []	MKKIPVFIVICTLILSPENYCSG QGKGVFPKWKGEYFYMCGHLPDGEAFCRNLCKNMTGGEGYCYGIIPSCFCRRIPGRGGYISDQNGNLLTCRGKHGETSCAKICASANGGF GYCSYDNCYCEMLKP-	Putative Na ⁺ channel toxin <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45778.1]	96%	8e-13	30.71%	47%

APÊNDICE B – Putativos peptídeos La1-like de *Hadruidoies lunatus*

Putativos peptídeos La1-like identificados nas glândulas de veneno do escorpião *Hadruidoies lunatus*. Os números de acesso no GenBank serão indicados entre colchetes. Os peptídeos sinais foram inferidos usando ProP 1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?ProP-1.0>) e são mostrados em negrito e sublinhados. As correspondências mais próximas e classes putativas foram encontradas usando bancos de dados BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Componente	Sequência	Match e classe putativa	Cobertura	E-value	Identidade	Similaridade
HI_La1-like_1 []	<u>MKQFCLAALFICTLFSYSVGI</u>KESCQEAGFTIESGSKKDPKSCTLYKCDLMNNRLII SKDTCAPQVKKSGCRIVPGPVDAPFPDCCPTLCRGKQWDK-	Putative La1-like peptide <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45684.1]	100%	1e-33	57.43%	67%
HI_La1-like_2 []	<u>MKQFCLAALFICTLFSYSVGI</u>KERCQEAGFTIDSGSQKDPKSCTLYKCNLMNNRLII ISKDTCAPQVKKSGCRIVPGPVDAPFPDCCPTLCRGKQWDK-	Putative La1-like peptide <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45684.1]	100%	1e-33	57.43%	67%

APÊNDICE C – Putativos peptídeos lineares citotóxicos de *Hadruidoidea lunatus*

Putativos peptídeos lineares citotóxicos (CYLIPs e NDBPs) identificados nas glândulas de veneno do escorpião *Hadruidoidea lunatus*. Os números de acesso no GenBank serão indicados entre colchetes. Os peptídeos sinais foram inferidos usando ProP 1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?ProP-1.0>) e são mostrados em negrito e sublinhados. As correspondências mais próximas e classes putativas foram encontradas usando bancos de dados BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Componente	Sequência	Match e classe putativa	Cobertura	E-value	Identidade	Similaridade
HI_CYLIP1 []	<u>MKTYFAIVILAVVFLQMFSETEA</u> IFGAIMNMVKGLISKIGKRGLQNLDQFDDIYEPE MSEADLRFLQELLR-	CYLIP-Cer-2 <i>Cercophonius squama</i> [JAA98048.1]	100%	4e-26	63.38%	83%
HI_CYLIP2 []	<u>MKTYFLIVILAVVFLQMFSETEA</u> FFGPFMNMVGGLIKLGKRGLQNMDQFDDIYEP ELSEADLRFLQELLR-	CYLIP-Cer-2 <i>Cercophonius squama</i> [JAA98048.1]	100%	9e-25	60.56%	83%
HI_CYLIP3 []	<u>MKTYFVIVILAVVFLQMFSETEA</u> FLGPLMNMVGGLIKLGKRGLQNMDQFDDIYE PELSEADLRFLQELLR-	CYLIP-Cer-2 <i>Cercophonius squama</i> [JAA98048.1]	100%	6e-26	61.97%	85%
HI_CYLIP4 []	<u>MKTYFFIVFLAFVFLQFFSGTNA</u> FLGPMLKAFGSLFGKRGLRNLQFDDIYEP EMSEADLRFLQELLR-	CYLIP-Cer-2 <i>Cercophonius squama</i> [JAA98048.1]	100%	6e-24	61.76%	77%
HI_CYLIP5 []	<u>MKTYFFIVFLAFVFLQFFSGTNA</u> FLGPVIEAFKSIFGKRGLRNLQFDDIYEP EMSEADLRFLQELLR-	Amphipathic peptide CT2 <i>Vaejovis smithi</i> [I0DEB4.1]	100%	1e-21	63.77%	75%
		CYLIP-Cer-2 <i>Cercophonius squama</i> [JAA98048.1]	100%	5e-25	63.24%	79%

HI_CYLIP6 []	<u>MKTYFFIVFLAFVFLQFFSGTNA</u> FLIPVLKAFGSLFGKRGLRNLDQFDDIYEPEMSE ADLRFQELLR-	Amphipathic peptide CT2 <i>Vaejovis smithi</i> [I0DEB4.1]	100%	7e-20	60.87%	73%
		CYLIP-Cer-2 <i>Cercophonium squama</i> [JAA98048.1]	100%	1e-22	60.29%	76%
HI_CYLIP7 []	<u>MKTYFFIVFFAVVFLQLFSGTNA</u> IFGAIMGALSNLFGKRGLRNLDQFDDIYEPEMSE ADLRFQELLR-	CYLIP-Cer-2 <i>Cercophonium squama</i> [JAA98048.1]	100%	6e-24	60.29%	77%
HI_CYLIP8 []	<u>MKTQFVILVLAVVLLQMFSTEA</u> FLGSIVNAIKGLFGKRSLRNLDQFDDIYEPEMS DADLRFQELLR-	CYLIP-Cer-2 <i>Cercophonium squama</i> [JAA98048.1]	100%	3e-32	75%	91%
HI_CYLIP9 []	<u>MKTQFVVLLILAVVLLQMFSTEA</u> IIGGLVSMKGLFGKRSLRNLDQFDDIYEPEMS DADLRFQELLR-	CYLIP-Cer-3 <i>Cercophonium squama</i> [JAA98047.1]	100%	1e-28	67.65%	88%
HI_CYLIP10 []	<u>MKTQFVILVLAVVLLQMFSTEA</u> IFGDILKTITGLFGKRSLRNLDQFDDIFEPEMSD ADLRFQELLR-	CYLIP-Cer-3 <i>Cercophonium squama</i> [JAA98047.1]	100%	3e-28	70.59%	82%
HI_CYLIP11 []	<u>MKTQFVILVLAVVLLQMFSTEA</u> IFGDIKKIAGLFGKRSLRNLDQFDDIFEPEMSD ADLRFQELLR-	CYLIP-Cer-3 <i>Cercophonium squama</i> [JAA98047.1]	100%	7e-28	70.59%	82%
HI_CYLIP12 []	<u>MKTQFVILVLAVVLLQMFSTEA</u> ILGDIKKIAGLFGKRSLRNLDQFDDIFEPEMSD ADLRFQELLR-	CYLIP-Cer-3 <i>Cercophonium squama</i> [JAA98047.1]	100%	2e-28	72.06%	83%
HI_CYLIP13 []	<u>MKTQFVILVLAVVLLQMFSTEA</u> ILGDIKKIAGMFGKRSLRNLDQFDDIFEPEMSD ADLRFQELLR-	CYLIP-Cer-2 <i>Cercophonium squama</i> [JAA98048.1]	100%	5e-29	72.06%	83%
HI_CYLIP14 []	<u>MKTQFVILVLAVVLLQMFSTEA</u> FLGGLIKTISGLFGKRSLRNLDQFDDIFEPEMSD ADLRFQELLR-	CYLIP-Cer-3 <i>Cercophonium squama</i> [JAA98047.1]	100%	1e-30	73.53%	86%
HI_CYLIP15		Amphipathic peptide CT1	100%	1e-21	61.76%	82%

	<u>MKSQFLVLILAVVLLQMLSEAEA</u> FWGLLANAVGSLLGKRGLQNIDFDDIYEPEMS DADLKLLRELLR-	<i>Vaejovis smithi</i> [I0DEB3.1]				
		CYLIP-Cer-2 <i>Cercophonius squama</i> [JAA98048.1]	100%	6e-25	57.35%	86%
HI_CYLIP16 []	<u>MKTQFHLIVAVIFLQMFSDADA</u> FLWGLVKSIKGRGLRNQNLQDFDDIFEPELSAA DLKFLQNLLE-	CYLIP-Cer-1 <i>Cercophonius squama</i> [JAA98049.1]	100%	1e-23	64.29%	80%
HI_CYLIP17 []	<u>MKTQFHLIVVVFILQMFSDADA</u> FLWGLVKSIKGRGLRNQNLQDFDDIFEPELSAA DLKFLQDLLE-	CYLIP-Cer-1 <i>Cercophonius squama</i> [JAA98049.1]	100%	9e-23	62.86%	78%
		Amphipathic peptide CT1 <i>Vaejovis smithi</i> [I0DEB3.1]	100%	6e-21	62.86%	75%
HI_CYLIP18 []	<u>MKTLHFLIVAITLLOMFSQGDA</u> VSVPAIVASMLGKRSLRNLDQFDDVFEPEKSDA DLKFLQELLK-	CYLIP-Cer-3 <i>Cercophonius squama</i> [JAA98047.1]	100%	1e-18	57.35%	75%
HI_CYLIP19 []	<u>MKTQHILIVAVILLQMLKMDA</u> IPSAAIKTLVGKRSFQNLQDLDVFEPEMSDADL KFLQELLK-	CYLIP-Cer-3 <i>Cercophonius squama</i> [JAA98047.1]	100%	3e-20	57.35%	77%
HI_NDBP-1 []	<u>MHFKKTLVIFIAVLLVTDEAEA</u> IWGSVARFAMKLIPSIKGGKKEKREIQNLFEPY QKDFDLDDLDRLLSELE-	Putative Non Disulfide Bridge Peptide <i>Megacormus gertschi</i> [JAW07151.1]	100%	1e-29	70.67%	82%
HI_NDBP-2 []	<u>MHFKKTLVIFIAVLLVTDEAEA</u> IWGSVARFAMKVIPSIFGGGKKEKREIQNLFEPY QKDFDLDDLDRLLSELE-	Putative Non Disulfide Bridge Peptide <i>Megacormus gertschi</i> [JAW07151.1]	100%	3e-30	72%	82%
HI_NDBP-3 []	<u>MHFKKTLVIFIAVLLVTDEAEA</u> FWGSIKAFAMKAIPSLFGGGKKEKREIQNLFEPY QKDFDLDDLDRLLSELE-	Putative Non Disulfide Bridge Peptide <i>Megacormus gertschi</i> [JAW07151.1]	100%	5e-32	76%	85%

HI_NDBP-4 []	<u>MHFKKTLVIFIAVLLVTDEAEA</u> FWGSIAKFAMKAIPSLFGGGKKDKREIQNLFEPY QKDFDLDDLDRLLSELE-	Putative Non Disulfide Bridge Peptide <i>Megacormus gertschi</i> [JAW07151.1]	100%	5e-32	76%	85%
HI_NDBP-5 []	<u>MQLKKALLIIFTVYLLGIQEAES</u> FLRNIMELFPQSSLLGRSKLFGKRESGDFYNQR DFVNSLLSLFE-	Putative NDBP <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45745.1]	95%	4e-04	36.84%	55%
HI_NDBP-6 []	<u>MQLKKALLIIFTVYLLGIQEAES</u> FLRNIMELFPPSSLLGRSKLFGKRESGDFYNQRD FDVNSLLSLFE-	Putative NDBP <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45745.1]	95%	6e-04	36.84%	53%
HI_NDBP-7 []	<u>MQLKKALLIIFTVYLLGIHEAES</u> FLRNIVELFPPSSLLGRSKLFGKRESGDFYNQRD FDVNSLLSLFE-	Putative NDBP <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45745.1]	95%	3e-05	38.16%	55%
HI_NDBP-8 []	<u>MNSKAILVFLVTLFVTERAEA</u> GFWRGVKDFASKAWNSGMGKALRNAAASALAV TPEQLDRMTLEEIADALYYIS-	Putative Non Disulfide Bridge Peptide <i>Megacormus gertschi</i> [JAW07148.1]	100%	4e-22	52.44%	69%
HI_NDBP-9 []	<u>MNSKLILVLFMVALFVTDQTEA</u> GFFGWMKKAWSKIGKAIRKGAGSVARNLLSNS AGGGEQPEQPAKLDELLNALLYIS-	Putative Non Disulfide Bridge Peptide <i>Megacormus gertschi</i> [JAW07150.1]	97%	7e-19	48.72%	69%
HI_NDBP-10 []	<u>MKLISLLPVFFILLIVVDYSQA</u> FWGFLANMIPPAISALSCLGKRNAMSQRYVNLRRK DADMDLDDLDELLSRLSEY-	Putative NDBP <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45748.1]	100%	2e-23	61.84%	78%
HI_NDBP-11 []	<u>MKLISLLPVFFILLIVVDYSQA</u> FWGFLANMIPPAISALSCLGKRNAMSQRYVNLRRK DADMDLDDLDELLSRLSEY-	Putative NDBP <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45748.1]	100%	1e-22	60.53%	77%
HI_NDBP-12 []	<u>MKLISLLPVFFILLIVVDYSQA</u> IFGLLAGLIPTAISALSCLGKRNAMSQRYVNLRRRD ADMDDLDDLDELLSKLSEY-	Putative NDBP <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45748.1]	100%	3e-22	60.53%	76%
HI_NDBP-13 []	<u>MKLISLLPVFFILLIVVDYSQA</u> IWGLFANLIPTAISALSCLGKRNAMSQRYVNLRRRD ADMDDLDDLDELLSRLSEY-	Putative NDBP <i>Superstitionia donensis</i>	100%	2e-22	60.53%	76%

		[JAV45748.1]				
HI_NDBP-14 []	<u>MKLINIVPVFFILLIVADYSQAL</u> IGLFTSLIPAAISAIKLGKRNAMSQRFADFRKRDT DMDLDDLDELLSRLSEY-	Putative NDBP <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45748.1]	100%	1e-19	53.95%	69%
		AmpI precursor <i>Vaejovis punctatus</i> [ALG64974.1]	100%	5e-21	53.95%	73%
HI_NDBP-15 []	<u>MKLISLMPVFFLLIVADYCOA</u> LFPFLTAIPGIISAVSKLGKRNAMYQRYVDLRKR DTDLDLDDLDELLSRLSEY-	Putative NDBP <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45748.1]	100%	7e-23	63.64%	76%
HI_NDBP-16 []	<u>MKLISLMPVFFLLIVANYCOA</u> LFPFLTMIPGIISAVSKLGKRNAMYQRYVDLRRR DTDLDLDDLDELLSRLSEY-	Putative NDBP <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45748.1]	100%	5e-23	61.84%	76%

APÊNDICE D – Putativos peptídeos *scorpine-like* de *Hadruroides lunatus*

Putativos peptídeos *scorpine-like* identificados nas glândulas de veneno do escorpião *Hadruroides lunatus*. Os números de acesso no GenBank serão indicados entre colchetes. Os peptídeos sinais foram inferidos usando ProP 1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?ProP-1.0>) e são mostrados em negrito e sublinhados. As correspondências mais próximas e classes putativas foram encontradas usando bancos de dados BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Componente	Sequência	Match e classe putativa	Cobertura	E-value	Identidade	Similaridade
HI_Scorpine-like_1 []	<u>MEIKLTILLLLGLATLCTC</u> GGILREKYFHKGIDALTPMIPVPPVVGKVVGNLAKQLV HKIGKNQSLCMFNKDIAGMCEKSCQESQKKGFCHGTKCKCGIPVSYKK-	Antimicrobial peptide <i>Hadrurus spadix</i> [JAV48316.1]	99%	1e-50	74.04%	83%
HI_Scorpine-like_2 []	<u>MQMQLTICFLLMVTLCLC</u> GGILKEKYFHKAIMAPPVPPQIAKNLAKQLVHKIA KIEFLCVAGQDLKGLCLKSCLANTGEGGSCHGTKCKCNSV-	Antimicrobial peptide <i>Hadrurus spadix</i> [JAV48314.1]	97%	2e-30	57.45%	72%
HI_Scorpine-like_3 []	<u>MNAKISILFLAAITIASC</u> AWISEKKQAALDKKLPNGKIKNALKAVVHKAWKMESG CFLDIDTRGACEAKCEKEGEKGVCHGTKCKCGKPRAYD-	Antimicrobial peptide <i>Hadrurus spadix</i> [JAV48322.1]	98%	1e-33	56.38%	76%

APÊNDICE E – Putativas *venom proteins* de *Hadruroides lunatus*

Putativas *venom proteins* (VPs) identificadas nas glândulas de veneno do escorpião *Hadruroides lunatus*. Os números de acesso no GenBank serão indicados entre colchetes. Os peptídeos sinais foram inferidos usando ProP 1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?ProP-1.0>) e são mostrados em negrito e sublinhados. As correspondências mais próximas e classes putativas foram encontradas usando bancos de dados BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Componente	Sequência	Match e classe putativa	Cobertura	E-value	Identidade	Similaridade
HI_VP1 []	<u>MESK</u>LHILMMLLIIEAFLPSNA YDETPRLMIYKQKHCVIGNSDCDLKKVQKHMITM FNGARDYVAVGQKGPKGTNMLQLEWEERLGNKAQEYAEACLKKFDGEKCEVPGEE EFDGEVNISVLKFDANKVGAGIYGRMSNIIQYWSYKDKDFDESTLVGLIKSYDISRIES KKQKEVHEWANAVRATTWKIGCGVADFIYEPPLKFIEVVICYFANYKLQKGDELYK LGNPCTGCPEETTCGTAQFSNALCVANKGSSPVTTNTYILQEDRPKSTDLQVEKRIIW SCSAESYSENCRPEHPCAAAYWQIGEDERFMQVIVSGKCTSANMFQKEIQIDEPACFEF EYFKKPTSDELSSTVTGFVFQSDGDGIVKVTGEDTDDWTEIKLDIPWSKTTVQVGV SVRSRSTGDGKQGIKVRKFSIFAGKCQ-	Putative venom protein <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45662.1]	99%	2e-111	42.30%	59%
HI_VP2 []	<u>MESK</u>LHILMMLLIIEAFLPSNA YDETPRLMIYKQKHCIIGNSDCDLKKVQKHMITVF NGARDYVAVGQKGPKGTNMLQLEWEERLGNKAQEYAEACLKKFDGENCEVPEEEEE FDGEVNISVQKFDANKVGAGIYGRMSNIIQYWTYKDKDTFDESTLVGLIKSYDISRIES KKQREAHEWANAVRATTWKIGCGVADFIYEPPLKFIEVVICYFANYKLQKGDELYK LGNPCTGCPEETTCGTAQFSNALCVANKGSSPVTTNTYILQEDRPKSTDLQVEKRIIW SCSAESYSENCRPEHPCAAAYWQIGEDERFMQVIVSGKCTSANMFQKEIQIDEPACFEF EYFKKPTSDELSSTVTGFVFQSDGDGIVKVTGEDTDDWTEIKLDIPWSKTTVQVGV SVRSRSTGDGKQGIKVRKFSIFAGKCQ-	Putative venom protein <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45662.1]	99%	9e-113	42.53%	59%
HI_VP3 []	<u>MESK</u>LHILMMLLIIEAFLPSNA YDETPRLMIYKQKHCIIGNSDCDLKKVQKHMITVF NSARDYVAVGQKGPKGTNMLQLEWEERLGNKAQEYAEACLKKFDGEKCEVPEEEEE FDGEVNISVQKFDANKVGAGISGRMSNIIQTWYKDKDTFDESTLVGLIKSYDISRIESE KQREAHEWANAVRATTWKIGCGVADFIYEPPLKFIEVVICYFANYKLQKGDELYKL GNPCTGCPEETTCGTAQFSNALCVANKGSSPVTTNTYILQEDRPKSTDLQVEKRIIWS CSAESYSENCRPEHPCAAAYWQIGEDERFMQVIVSGKCTSANMFQKEIQIDEPACFEFE	Putative venom protein <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45662.1]	99%	2e-113	42.53%	59%

	YFKKPTSDELSSTVTGFVQSDGDGIVKVTGEDTDDWTEIKLDIPWSKTTVQVGVSVRSRSTGDGKQGIKVRKFSIFAGKCQ-					
HI_VP4 []	METKHLHILTMLLIIIEAFLPSNA YDDTPLLVMYKQEPICIGNSDCDLKKVQRHMINEFNHARAYVASGLKGPKATNMLQLQWEERLGNKAQKYAETCLKKFNGEKCEVPGEAEFDGEVNISVLKSYEKKLSPTIYSRMGSLIYYWYTKKHKFNESLIGLIKSYDISRIESKQREMHEWANAVRATTWKIGCGVADFINESPLKFIEVVICYFANYKLQKGDELYKLGNPCTGCPEETTCGTAQFSNALCVANTGSSPVTNTYILQEDRPKNLQAEKHVIWNCSAEDYSENCRPEHPCAAYWQIGENERYMEVTVSRKCTSANMFQKEIQIDEPACFEFEYFKKPTSDELSSTVTGFVQSDGDGIMKVTAGEDTDDWTKIKLDIPWSKTTVQVGVSVRSRSTGDGKQGIKVRKFSIFAGKCQ-	Putative venom protein <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45662.1]	99%	4e-115	43.22%	60%
HI_VP5 []	MESKLNIFTMLLIIIEAFLPSNA YDDTPRLMIYKQKHCIIGNSDCDLKKVQKVMMQVFTTARDNVASGLKGPKATNMLKLQWEERLGNKAQKYAETCLKKFSGEKCEVPGEAEFDGEVNISVLKSYEKKLSPTIYSRMGSLIYYWYTKKHKFNESLIGLIKSYDISRIESKQREMHEWANAVRATTWKIGCGVADFINESPLKFIEVVICYFANYKLQKGDELYKLGNPCTGCPEETTCGTAQFSNALCVANTGSSPVTNTYILQEDRPKNLQAEKHVIWNCSAEDYSENCRPEHPCAAYWQIGENERYMEVTVSRKCTSANMFQKEIQIDEPACFEFEYFKKPTSDELSSTVTGFVQSDGDGIMKVTAGEDTDDWTKIKLDIPWSKTTVQVGVSVRSRSTGDGKQGIKVRKFSIFAGKCQ-	Putative venom protein <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45662.1]	99%	3e-115	43.55%	61%
HI_VP6 []	MELILFVIAILVKFGAFVSNISIS NENPPVLMFNDRRWENCVISNPECRNLNVHEALIE NSNFERSRVAGGDQGIAPAANMLMMEWDDDLAEKAQRYAERCLISNAYCLPPDDY EFDGESNIYVGHNLKQSGSMSNRIKELVSMWARTSIFYDDKEKLNRLKSYDDSDSK TDYHEWANAVRATNWKMGCGLADVFVTSADTFEIVVCFYRNYKLNQDEIYKVGTPCSGCPLGTRCSVKEEYKNLCRVDKGNCPIRNNFRPDRCLQNPLLGRET VWKCASEDETEKCKSESACNSWEVYPDENYKKITVSGICTASAMFRKEITVDGPPSCFTFEYFKKPTGNRQFSSEITGFILQTRGAKSQKVIVYEDTDKWTKVKLDINWTRTPLQVGISVRSRSEQTAEQDIKVRNFMITTYGCSDI-	Putative venom protein <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45662.1]	99%	1e-134	46.50%	63%
HI_VP7 []	MTSQIVFMLAAWLMVIRYASSD NICDEKYLNITLHTMCKDINESCHFIRNKGKVYERQLLRTHNMIRNSIKRFIGKEYLLPSNMEIMEWDDDEL YEMARIHSHQCTEEDCNLCHQIGTFPVEQNFVAVKTYSFSDVKDNGPVRRFQTVIKEWAAELQLFDPVIVSNFTNIDGKPTNWTNLRATTLVYVGCASMNFTNDPNTFKEVYVCNYGPADLTDGEVIYKTGGGPCSDCEDNGICDSEFRNLVPSDIDINITEIIFPGKENTIVENYTMIVTKYLPNEEFRETSVKEENGSEKPAVDEVTSTSVESSEFVEKGYTIEESSFINEGYTIEEVTNLRKREILPLLPKLLNYGAKKNAA-	Cysteine-rich secretory protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV48225.1]	98%	4e-130	55.32%	67%
HI_VP8 []	MNASYFVPLLLALWFSPTEQ LPSCHTNELNVCMLPSVLRSGSLPRNESEIISACKIWSKSWDCFDNYISNCLSDIHRMLAEVVLQQRIGFKEFCDPNSKLRTELQKNLPCSSDAVTLTLQTCCTDNLESIIHMVAGDNAEDRVNAACCYFQRGYHCLKRNTEKLCRKGSF	Uncharacterized protein <i>Centruroides sculpturatus</i> [XP_023209998.1]	96%	6e-43	34.51%	55%

	NVLRKAMSFQVDTAETICEFHNPDEMCKDYLSRNVAPSEEASYLARISAQYLRYLQ-					
HI_VP9 []	<u>MNASYFVPLLLALWFSPTQL</u> PSCHTNELNVCMLPSVLRSRGSLPRNESEIISACKI WSKSWDCFDNYISNCLSDIHRMLAEVVLQQRIGFKEFCDPNSKLRTELQKNLPCSSD AVTLTLQTCTDNLESIIHMVAGDNAEDRVNAACCYFQRGYHCLKRNTEKLCRKGSF NVLRKAMSFQVDTAETICEFHNPDEMCKDYLSRNVAPSEEASYLARIGAQYLRYLQ-	Uncharacterized protein <i>Centruroides sculpturatus</i> [XP_023210000.1]	96%	8e-43	34.51%	54%
HI_VP10 []	<u>MNASYFVPLLLVLWFSPTQL</u> PSCHTNELNVCMLPSVLRSRGSLPRNESEIISACKI WSKSWDCFDNYISNCLSDIHRMLAEVVLQQRIGFKEFCDPNSKLRTELQKNLPCSSD AVTLTLQTCTDNVESIIHMIAGDNAEDRVNAACCYFQRGYHCLKRNTEKLCRKGSFN VLRKAMSFQVDTAEAEICEFHNPDEMCKDYLSRNVAPSEEASYLARITAQYLRYLQ-	Uncharacterized protein <i>Centruroides sculpturatus</i> [XP_023209998.1]	96%	1e-42	34.51%	55%
HI_VP11 []	<u>MNSSFLIVVAFAVQVSKQ</u> DSCHLRELDLCVATAIVQYRDSVPVQNEQQMNEQCN VGKETIDCIKNFTSKCATPLQREVITFATQGAQASFDKYCTPGSDLRKTILERSECLAQ AWEEQRSCMTDAQAAIESVSDAPVDKRLDVLCCYRYYRACGTEIARKKCGEGVDG FINEMTGLVVANLPNLICNDGNDSTKCSGLLPAPGTQPKGSSSDSPIAQLLGIYLN-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47654.1]	100%	1e-125	71.49%	84%
HI_VP12 []	<u>MKSSFVLIVVAFAIQVSKQ</u> DSCHLRELDLCVATAIVQYRDSVPVQNEQQMNEQCN VGKETIDCIKNFTSKCATPLQREVITFATQGAQASFDKYCTPGSDLRKSILERSECLAQ AWEEQRSCMTDAQAAIESVSDAPVDKRLDVLCCYRYYRRCGTEIARKKCGEGVDK FINEMTGLVVANLPNLICNDGNSNKCGLLPAPGTQPKGSSSDSPIAQLLGIYLN-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47654.1]	100%	6e-126	71.05%	85%
HI_VP13 []	<u>MKSSFVLIVVAFAIQVSKQ</u> DSCHLRELDLCVATAIVQYRDSVPVQNEQQMNEQCN VGKETIDCIKNFTSKCATPLQREVITFATQGAQASFDKYCTPGSDLRKSILERSECLAQ AWEEQRSCMTDAQAAIESVSDAPVDKRLDVLCCYRYYRRCGTEIARKKCGEGVDE FINEMTGLVVANLPNLICNDGNDSTKCSGLLPAPGTQPKGSSSDSPIAQLLGIYLN-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47654.1]	100%	2e-126	71.05%	85%
HI_VP14 []	<u>MKSSFVLIVVAFAIQVSKQ</u> DSCHLRELDLCVATAIVQYRDSVPVQNEQQMNEQCN VGKETIDCIKNFTSKCATPLQREVITFATQGAQASFDKYCTPGSDLRKSILGRSECLAQ AWEEQRSCMTDAQAAIESVSDAPVDKRLDVLCCYRYYRRCGTEIARKKCGEGVDE FINEMTGLVVANLPNLICNDGNDSTKCSGLLPAPGTQPKGSSSDSPIAQLLGIYLN-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47654.1]	100%	2e-126	71.05%	85%
HI_VP15 []	<u>MKTSFVLIVLAALAIQVSKQ</u> DSCHLRELDLCVATAVVSRLRDSVPVQNEEQMNEQCN VGKETIDCIKNYTAKCTTRLQREVITFATQGAQGTDFDKYCTPGSDLRKSILEKSECLA QAWEEQKSCMSDAQAGIESINEAPVDKRLDVLCCYRYYRRCGTEIARKKCGDGAE SFMDEMASLVVANLPQLVCNDCENDSAKCSGLLPPTGTPKPKGSSSDSPIAQLLSVYLN-	Venom peptide HtC16x <i>Hadogenes troglodytes</i> [AOF40220.1]	99%	2e-105	67.84%	85%
		Venom protein <i>Hadrurus spadix</i>	100%	8e-121	67.54%	82%

		[JAV47654.1]				
HI_VP16 []	<u>MKTSFVLIVLAALAIQVSKQ</u> DSCHLRELDLCVATAVVSRLRSPVPQNEEQMNEQCN VGKETIDCIKNYAKCTTRLQREVITFATQGAQGTDFDKYCTPESDLRKSILEKSECLA QAWEEQKSCMSDAQAGIESINEAPVDKRLDVLCCCTYRRYRRCGTEIARKKCGDGAE SFMDEMASLVVANLPQLVCNDCENDSAKCSGLLPAPGTKPKGSSSDSPIAQLLSVYL N-	Venom peptide HtC16x <i>Hadogenes troglodytes</i> [AOF40220.1]	99%	4e-104	67.40%	85%
		Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47654.1]	100%	8e-120	67.11%	82%
HI_VP17 []	<u>MKSSFVLTVVVAALAIQVSKQ</u> DSCHLRELDLCVATAIIQFRDSPVPQNEQDMNEQC NVGREVIDCIKNFTNKCASPLQREVITFATQGAQASFDKYCTPGSDLRKSILERSECLA QAWEEQRSCMTDAQAAIESVSDAPVDKRLDVLCCCTYRRYRRCGTEIARKKCGEGVD GFINEMTGLVVANLPNLICNDCGNDSTKCNGLLPAPGTQPKGSSSDSPIAQLLGIYLN-	Venom peptide HtC16x <i>Hadogenes troglodytes</i> [AOF40220.1]	92%	9e-106	70.28%	85%
		Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47654.1]	100%	7e-123	69.87%	83%
HI_VP18 []	<u>MKIVLVILVTVAVVQVSRQ</u> DSCHLRELDLCAATAVVAFRDSPVPKNEEEVEEQCKV GREAYECVTNYTNKCASKLQRELISFVSEGAHASFNEYCTPGSDIRKSILERSECLSQT WEEQRSCMTDAQAGVESVNDAPVDKRLDVLCCAYKRYRKCGLIARKNCGNDVEG WLHRITGLVVSNLPMICNCCEDDDAKCNSLLPAPGTKPRGSSSDSAIGQLLGIYLN -	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47654.1]	99%	2e-114	64.91%	82%
HI_VP19 []	<u>MKTILLLLVAISLVQVSRQ</u> DSCHLRELDLCVATAIIAFRSPVPQNDEQVEEQCKVG REAHECVSNYTNKCASQLQRELISFVTEGAHASFKEYCTPGSDLRKSILERSECLSKT WEEQRSCVSDAQAGIESVSDAPVDKRLDVLCCAYKMYRKCGLIARKNCGNDVEN WLHTITQLLTSNLPDMICNCCEDKDAECNVLLPAPGTKPKGSSSDSAIGQLLGIYLN-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47654.1]	99%	4e-113	64.91%	81%
HI_VP20 []	<u>MKTILLLLVAISLVQVSRQ</u> DSCHLRELDLCIATAVIAFRSPVPQNDEQVEEQCKVG REAHECVSNYTNKCASQLQRELISFVSEGAHASFKEYCTPGSDLRKSILERSECLSKT WEEQRSCVSDAQAGIESISDAPVDKRLDVLCCAYKMYRKCGLIARKNCGSDVENW LHTITQLLTSNLPDMICNCCEDKDAECNVLLPAPGTKPKGSSSDSAIGQLLGIYLN-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47654.1]	99%	3e-112	64.04%	81%
HI_VP21 []	<u>MVYMKTCCCFDTKNGSIACGVYTMILKIIAIALIIVIA</u> QNKVLEQTVSLGLDPD QVGVVVRGMIFYLVKCVIFVAFCGLLIYGVKNDRPGFLIPWVAVMSVEVAFNIITLIA VIIVAALAEKVAIAATICTVFAMAFNIAFVIYMILCVESQRKLLTQGSPPAYAAKIN MSKATMISIPV-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47716.1]	93%	6e-92	80.35%	91%

HI_VP22 □	MVYMKTCCCFDFTKNGSIACGVYTMILKIIAIALIIVIA QHKVLKEQTVSLGLDPD QVGVVVRGVMIFYLVKCVIFVAFCLLLIYGKNDPRPGFLIPWVAMSVEVAFNIITLIA VIIVAALAEKVAIAATICTVFAMAFNIAFVIYMILCVESQRKLLTQGSSPPAYAAKM-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47716.1]	100%	8e-92	80.35%	91%
HI_VP23 □	MVYMKTCCFCFDTKHGSVMVSGIYTLVLKIIAIFVQIFVLA YYNVISERLVEQGFDP KLLQVFRGMIIFFLVQSIIIVFFSCLLLYGTRNDRPGYLIPWIVAMSIEVALNFILIIKIIIL AIVAKNTDVLTLVAVVLMVCDIAFVIYMILCVESHKLLVENSSPKSSEAKM-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47716.1]	100%	1e-55	55.49%	71%
HI_VP24 □	MKLAASTIFILCLIGGNFGEKDY PECNVGDCVCNHIRCIASNISKSTIENEIYECCRFA IRKDHGGDLDMDECWKREGFFETPYCSSILPANCTDENWLYFLMAVGFNNVLFTRV RQRAPLPACDFRCETYTEKYIKAVLELCKTDKIPQIETICFLYRTLYG-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47653.1]	100%	1e-45	44.51%	62%
HI_VP25 □	MLLAASTILLYLIGGNFGEKDNPKCSVDDCIN DIRCTASNISKSTIENEIYRCKFAI RKEQGEDLDMDECWKREGFFDTTHCSKILSTECEKQKLFYFYVASGTSRIFFRKIREL APLPACEYKCDLYIEDYIKAVVELCRQGTIPEIETICFLYRTLYD-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47653.1]	99%	6e-47	42.86%	65%
HI_VP26 □	MMLLATSTIFVLCLIGNRNF GENDYPECTVGDVCVDCNIRCVASNISKTDMDECRKR EGFFDTPYCSRILSSNCGDEKLYYFLMATGDNDFERVRELAPLPASGHKCDMYTK DYIKAVVELCKTNTIEIQTICFLYRTLYG-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47653.1]	100%	7e-39	43.90%	54%
HI_VP27 □	MKPNPFLSHIAIAIMFLFGSTFSE EELNEEHWKFICNSSRETIRELVHCFRNLASKLTV EWYKVFADCMKMDLISITQLFCVMKHSTMPNPKKKQFVSCHKKASEEKPHFRDNQT DPMIIGCVESHMTFRKANRY-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47685.1]	90%	1e-17	36.51%	56%
HI_VP28 □	MKPNPFLSHIAIAIMFLFGSIFSE EELNEEHWKFICNSSRETIRELVDCFRNLASKLTV WYKVFADCMKMDLISITQLFCVMKHSTMPNPKKKQFVSCHKKASEEKPHFRDNQTD PMIIGCVESHMTFRKGGK-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47685.1]	91%	4e-18	36.51%	57%
HI_VP29 □	MKPNPFLSHIAIAIMFLFGSIFSE EELNEEHWKFICNSSRETIRELVDCFRNLASKLTV WYKIFADCMKMDLISITQLFCVMKHSTMPNPKKKQFVSCHKKASEEKPHFRDNQTD PMIIGCVESHMTFRKGGK-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47685.1]	91%	5e-18	36.51%	57%
HI_VP30 □	MKPNPFLWHIAIAIMFLFGSIFSE EELNEEHWKFICNSSKETIRELVDCFRNLASKLTV EWYKVFADCMKMDLISITQLFCVMKNSTMPNPKKKQFVSCHKKASEEKPHFRDNQT DPMIIGCAESHMTFRKGGK-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47685.1]	93%	3e-17	34.11%	56%
HI_VP31 □	MYALOGFVFSLFFCCLLA EPWTDLAKRFCAKTCDRGPYLMCIESRLPKTVDFRKC VDIIKEGLGTWKQSADYFCNQDTDEEFAYVLECTIQALKMEYKDQKVKELVDECLT KHQC-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47680.1]	100%	2e-13	31.03%	51%

HI_VP32 []	<u>MYALOGFVFSLFFCCLLA</u> EPWSDLAKRCAKTCDRGPYLMCIERSRLPKTVDTFRKC VDIIKEGLGTWKQSADYFCNQDTDEEFAYVLECTIQALKMEYKDQKVKELVDECLT KHQC-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47680.1]	100%	1e-13	31.03%	51%
HI_VP33 []	<u>MYALOGFVFSLFFCCLLA</u> EPWTDLAKRFSKTCDRGPYLMCIERSRLPKTVDTFRKC VDIIKEGLGTWKQSADYFCNQDTDEEFAYVLECTIQALKMEYKDQKVKELVDECLT KHQC-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47680.1]	100%	4e-13	30.17%	51%
HI_VP34 []	<u>MYALOGFVFSLFFCCLLA</u> EPWTDLAKRCAKTCDRGPYLMCIENRLPKTVDTFRKC VDIIKEGLGTWKQSADYFCNQDTDEEFAYVLECTIQALKMEYKDQKVKELVDECLT KHQC-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47680.1]	100%	9e-14	31.03%	52%
HI_VP35 []	<u>MNNVQIAVGLLYLSLSICVLSVEG</u> QSSCCASAKPSTLNFAVRYCLPHCDRAKVIQC GMERAPEGLKIHACIRLLYPDLEESLLDDYVCNRTSEKKKAMKSCCFARAIELEDEE KGTNYVSVTEQCLTEAGCQ-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47690.1]	89%	0.001	27.50%	41%
HI_VP36 []	<u>MNNVQIAVGLLYLSLSICVVSVEG</u> ESSCCASAKPSTLNFAVRYCLPHCDRAKVIQCG MERAPEGLKIHACIRVLYPDLEESLLDEYVCNRTSEKKKAMKSCCFARAIELEDEEK GTNYVSVTEQCLTEAGCQ-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47692.1]	69%	0.001	28.72%	45%
HI_VP37 []	<u>MKVVFVLLAFFVAVSA</u> RFHEDPLCSASTDVVNKYIECMRANYRPAFDMALTCSREL GANAMADFIQFSCGKRLASKEQELKYGSCLNRSINPSAAISEDELSKMOVESCRRASLL PQ-	Hypothetical protein <i>Opisthacanthus cayaporum</i> [CAX51393.1]	92%	2e-36	57.01%	69%
HI_VP38 []	<u>MSLIHFVVVFLSIDVAIFCL</u> NDDFADRIRVEITPSAQFNRKCWLNVAQLQDSETLHDI SRCEKKECRLIDERSYIVKYSCIHKLPTECALRHHGEYFPHCCPKSSSCK-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47655.1]	100%	8e-66	83.49%	96%
		Venom peptide HtfTx1 <i>Hadogenes troglodytes</i> [AOF40195.1]	100%	4e-65	83.49%	96%
HI_VP39 []	<u>MFALKLSVLFTHILFLAMSPTSET</u> RLNSTGVNCTAVCMETGYHGTQGACKCGFKVF QSKQRRQAAAQEADSKI-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47712.1]	86%	9e-10	41.27%	63%
HI_VP40 []	<u>MFALKLSVLFTHILFLAMSPTSET</u> RLNSTGVNCTAVCMETGYHGTQGACKCGFKVF QRKQRRQAAAQEADSKI-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47712.1]	86%	2e-09	41.27%	63%

HI_VP41 []	<u>MFALKLSMLFTHILFLAMSPTSET</u> RLNSTGVNCTAVCMESGYHGTLGICKCGFKFH KESRSYKDDDRLLPRKLIQKYSLSFRETRGRFNRRFDEPLI-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47712.1]	100%	3e-18	41.24%	61%
HI_VP42 []	<u>MWKTHICFVLLSSVCTG</u> EEDQEGGRIINLLSDDGRKTLQCWFYTFYSYLPGADT TAKLAAQVQLCDCMKKAIAGNR-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47661.1]	100%	7e-34	68.35%	82%
HI_VP43 []	<u>MYKIAIVCLIVMSFLSFCIG</u> ENNSEEGRTIPLIFSEEGRVLSCLSGFIFTYRPGDDAK VKSENQVKLCDCLQKATTA-	Venom protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47661.1]	96%	2e-18	48%	64%
		Putative toxin <i>Didymocentrus krausi</i> [AZL95822.1]	100%	3e-15	46.15%	64%
HI_VP44 []	<u>MKLKTVLVVFLICHAADLVV</u> ARRCFPRTRTRITRIIHTVPKVLRIVKIIKTAKRIKCLR NIRRRIRRCRWITLRG-	Hypothetical protein <i>Pandinus cavimanus</i> [AEX09189.1]	84%	6e-07	56.72%	70%
HI_VP45 []	<u>MKLKTVLVVFLICHAADLVV</u> ARRCFPRTRTRITRIIHTVPKVLRIVKIIKTAKRIKCLR NIRRRIRRCRWITLRG-	Hypothetical protein <i>Pandinus cavimanus</i> [AEX09189.1]	84%	6e-07	56.72%	70%
HI_VP46 []	<u>MKLKTVLVVFLICHAADLVV</u> ARRCFHRTRTRITRIIHTVPKVLRIVKIIKTAKRIKCLR RNIRRRIRRCRWITLRG-	Hypothetical protein <i>Pandinus cavimanus</i> [AEX09189.1]	84%	1e-06	56.72%	70%
HI_VP47 []	<u>MKLKTVLVVFLICHAADLVV</u> ARRCFHRTRTRITRIIHTVPKVLRIVKIIKTAKRIKCLR RNIRRRIRRCRWITLRG-	Hypothetical protein <i>Pandinus cavimanus</i> [AEX09189.1]	84%	2e-06	56.72%	70%
HI_VP48 []	<u>MKLKTVLVVFLICHAADLVV</u> ARRCFPRTRTRISRIIHTVPKVQRIVKIIKTARRIRKCLR NITRRIRRCRWVTVRG-	Hypothetical protein <i>Pandinus cavimanus</i> [AEX09189.1]	92%	3e-06	56.16%	68%
HI_VP49 []	<u>MKLKTVLVVFLICHAADLVV</u> ARRCFPRTRTRITRIIHTVPKVQRIVKIIKTARRIRKCLR NITRRIRRCRWVTVRG-	Hypothetical protein <i>Pandinus cavimanus</i> [AEX09189.1]	92%	3e-06	56.16%	68%

HI_VP50 []	<u>MKLOTVLVFLICHAADLVV</u> ARRCFHRTRTRITRIIHTVPKVLRIVKIIKTAKRIKLL RNITRRIRKCRWVTVRG-	Hypothetical protein <i>Pandinus cavimanus</i> [AEX09189.1]	92%	7e-06	54.79%	69%
HI_VP51 []	<u>MKTAIVVVAAALISLAST</u> QGPPPPSGPPQINWGKCESLKPTDSEKEEKKKVIDECLK ENPPPSGEAENPEQIAKHHEKITVCALKKEKWLTEAGPYDFDRAYKELEPKVPKEIKE TIAKEHEGCQNEAKEKVPDDFAGQAQLYQACMDFHVSEQCGIQVPPPRP-	Secreted protein <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47832.1]	100%	1e-78	77.71%	87%

APÊNDICE F – Putativas enzimas de *Hadruroides lunatus*

Putativas enzimas identificadas nas glândulas de veneno do escorpião *Hadruroides lunatus*. Os números de acesso no GenBank serão indicados entre colchetes. Os peptídeos sinais foram inferidos usando ProP 1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?ProP-1.0>) e são mostrados em negrito e sublinhados. As correspondências mais próximas e classes putativas foram encontradas usando bancos de dados BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Componente	Sequência	Match e classe putativa	Cobertura	E-value	Identidade	Similaridade
HI_PLA1 []	<u>MHSVETCSSYFHPFHS</u>AOQLFFRRREMYLGVVFLHLLVIVVA VESGIVDIICTVDEDE VFSKAESITADYVQFRLYTTSDRSNFKLLSSREDIEQSAFNPYLQTI FIVHGYQSSPGNT GFISLKDFSLMVDNFNHIVDWSMGASEEYMPHAIRNAFASARKVASFIELLVTSGTTL NRIQLIGFSLGAQLVSFVGKQIDKVGGRITALDPAGPCFSLYSNNHRLHYTDAEFVDVII TNGDGLGLMRPTGHVNFVVGKKTQSECGAVVLQNFRTSHSYQELYVDSCSHHRA LQLYTDSLWSVCKLVGYSCSSYEAFKGECTDCGENGDKCALLGHEAIKYKPKIRN ETKVFYLKAAASESPYCLYYYPVSVKIKDSNSSEGQTGVL YIALQGSQHETMKLLNQGI FSQTFEPGEEYVYLLTLPTDIGDLSLIKLLWVRTSGGSSDTYWLDVDSVKISSMNGSK DTHSIVFKACRRFPL YSGIPRTFHTTEK FVNERCLQ-	Phospholipase A1 <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47955.1]	93%	0.0	60.17%	74%
HI_PLB []	<u>MKYIYIFCFLPCLVM</u>AL PARNVSVSWDPQNGAFSLHDSVVNDWLA WASFTNEIN TTGWSYLEVHTSEYKDSYQAYGAGLVEGYVTSDLIKLHWNNLYADYCDGEKAYC NRLQKFLETNLDFLNDQIKDNRKTSYWHQVALVLEQVKGLQDGYNNTPSQPSTRPSI FGPLFFNLFGDLEDLEAVLNKTVKKRMLGSGHCSGLVKLLPGNKDLYVAQDSWNTY NSMLRILKKYVMPRLRTSLSTDSKRISGHTMSFSSYPATVFSGDDFYHSSRLIALETTIG NSNSLWKFVTPNNTVLEWIRNIVANRLAKSGSTWTYIFSQYNSGTYNQWMIVDY NRFPPGNPPRKGT LWVLEQLPGHIERKDQTKHLLNTTYWPSYNTPFYDPDIFNLSGASV NVKKYGDWFTYDKTPRALIFKRDHKKVKDLTSMMLKLMRYNDYKNDNLSRCNCTPP YSAENAIAARSDLNPPNGTYPPPSLGHRSHGAIMKLTNYFMHMKYHFVAYGGPTY DQPPPFQWSKSDFIHEHSGQPD L WKFKPVVHQWLSDN-	Phospholipase B <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47950.1]	100%	0.0	81.24%	90%
HI_PLC []	MAENGVTSSGVSSRIEALKDLSKGCMLYKVKSGKRAFRRKFYVDFQNM TLKHNSH RKAGFCRRAPEYVDLYDVEEIRTGWNTDVFNQIEAKVRKSEKATAMHQDDKCFSLV INATHFTLDLVAPSKEKRDLWVEGLRHLLAMCQNVHREEEYNRWLKEQFRRADGN	Phospholipase C delta <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47949.1]	99%	0.0	87.35%	93%

	NNGSLNFKECTLLGQLNISMDKSHAKRLFDEANFRKLLDDEDALDPEEFVRRFFHS LQSRPDAETLFKEYNANNSTIMGPEELMNFHLKEQKMTKINLEDCNLIERYEPDKS KLEGYLSIRGFIQMLLSKDHAIFALDHNHVFQDMDQPLCNYYIASSHNTYLIQDQLLG DSSVEGYNRALEQGCRCVELDCWDGPNDEPVVYHGYTLTSKVLFRDVLDAIRLTA KASQFPVILSLENHCSVKQKMAEHLVNILGEYLHADPVKSEETELPSPSSLARKILI KNKKLADKTQTKPEDSDSEEDLPDAGEDGKKLAREKPKTDGKLAVELSELVNYVKA CSFKGFEEAKKKWKFYEMASFQETKAETFAQEQQKDYVEYNKEHLARIYPKGSRTD SSNYDPVQFWNVGCQIVALNYQTYDDPMFINQAFFAQNGGCGYVLKPEFLCKGVYD DPQHPPSDKYKETLIKIISGQHHPKDEDFEGEVIDPYVIVEVRGHPSEDETKHSTSYIQN NGFNPRWNETFTIPLCLPQLAIIILFTVKDESKYGKNLVLGRYAIPYTAMAEGYRHIHL LNDFRQPMIPATIFVHITKRKDK-					
HI_PLA2_1 []	MGVHILLPITALIAVATAL STETELYNFEPLPGQRDGWPMTRAVRMQFRSEEGE ESRSFEGCQILESLDAIMKEVSRTPRYAIQRISKDEMESFERRCERMGDVERTVWGT WCGAGNESKSYNDLGYFNNVDSCCRDHDHCENIPAGETKYGLKNAGSYTMMNCKC EDAFKKCLDAIPGYWSSKAVAGVKA VYFNLYGNGCYNVKCGAGRSARRADCVA YTGESGLGSKLLNAVGR-	Venom toxin <i>Hemiscorpius lepturus</i> [API81339.1]	98%	2e-115	67.08%	80%
		Phospholipase A2 <i>Hadrurus gertschi</i> [POC8L9.1]	98%	7e-105	64.44%	76%
HI_PLA2_2 []	MGVNILLPITALIAVATAL STENELYNFEPLPGQRDGWPMTRAVRMQFRSEEGE RESRSFEGCQILESLDAIMKEVSRTPRYAIQRISKDEMESFERRCERMGDVERTVWGT KWCGAGNESKSYNDLGYFNNVDSCCRDHDHCENIPAGETKYGLKNAGSYTMMNC KCEDAFKKCLDAIPGYWSSKAVAGVKA VYFNLYGNGCYNVKCGAGRSARRADCVA AKYTGESGLGSKLLNAVGR-	Venom toxin <i>Hemiscorpius lepturus</i> [API81339.1]	98%	5e-116	67.49%	80%
		Phospholipase A2 <i>Hadrurus gertschi</i> [POC8L9.1]	98%	1e-105	64.85%	76%
HI_PLA2_3 []	MGVHILLPITALIAVATAL STENELYNFEPLPGQRDGWPMTRAVRMQFRKSEEGE RESRSFEGCQILESLDAIMKEVSRTPRYAIQRISKDEMESFERRCERMGDVERTVWGT KWCGAGNESTSYNDLGYFNNVDSCCRDHDHCENIPAGETKYGLKNAGSYTMMNCK CEDAFKKCLDAIPGYWSSKAVAGVKA VYFNLYGNGCYNVKCGAGRSARRADCVA KYTGESGLGAKLMNAVGR-	Venom toxin <i>Hemiscorpius lepturus</i> [API81339.1]	98%	9e-116	67.49%	80%
		Phospholipase A2 <i>Hadrurus gertschi</i> [POC8L9.1]	98%	1e-106	65.69%	76%
HI_PLA2_4 []	MGVHILLPITALIAVATAL STENELYNFEPLPGQRDGWPMTRAVRMQFRSEEGE RESRSFEGCQILESLDAIMKEVSRTPRYAIQRISKDEMESFERRCERMGDVERTVWGT KWCGAGNESTSYNDLGYFNNVDSCCRDHDHCENIPAGETKYGLKNAGSYTMMNCK CEDAFKKCLDAIPGYWSSKAVAGVKA VYFNLYGNGCYNVKCGAGRSARRAACVA KYTGESGLGAKLLNAVGR-	Venom toxin <i>Hemiscorpius lepturus</i> [API81339.1]	98%	1e-116	67.90%	80%
		Phospholipase A2	98%	4e-106	65.27%	76%

		<i>Hadrurus gertschi</i> [POC8L9.1]				
HI_PLA2_5 []	MGVHILLPITALIAVATA LSTENELYLNFEPLPGQRDGPVRAVRMQRKSEEGE RESRSFEGCQILESLDAMKEVSRTPRYAIQRISKDEMESFERRCERMGDVERTIWGTK WCGAGNETANYNELGYFNLDSCCRDHDTCNIPAGITKYGLKNEGSYMMNCKC EDAFKKCLDAIPGFWSSAAISAVKAVYFDLYGNGCYNVKCGAGRSARRADCVAEYT GESGMGAKLLNAVGR-	Venom toxin <i>Hemiscorpius lepturus</i> [API81339.1]	98%	9e-114	67.49%	79%
		Phospholipase A2 <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47954.1]	100%	6e-113	65.98%	78%
HI_PLA2_6 []	MEMHTVMATVIAVISTAFA QPIENELLVNFEAMPQQRDGPVRAVRMQRKRSE GREYRTLEGQCILDRLDIGRIAYSTPRDLIKRITKEEMESFEERCERMGDERTYLGT KWCAGNEAANYSDLGYLDNIDRCCRHDHDCNIPKGVTKYGVKNMGAYTLMNC ECESQFEKCLDAVADEYYWFRKPVEGAINAIKWTFELYGNGCYKIRCNNRRSVMR MEECDNPVAVYGGETGWGAKLLNYG-	Phospholipase A2 <i>Hadrurus gertschi</i> [POC8L9.1]	99%	3e-99	59.68%	72%
HI_PLA2_7 []	MEMHTVMATVIAVISTAFT QPIENELLVNFEAMPQQRDGPVRAVRMQRKRSE GREYRTLEGQCILDRLDIGRIAYSTPRDLIKRITKEEMESFEERCERMGDERTYLGT KWCAGNEAANYSDLGYLDNIDRCCRHDHDCNIPKGVTKYGVKNMGAYTLMNC QCESQFEKCLDAVADEYYWFRKPVEGAINAIKWTFELYGNGCYKIRCNNRRSVMR MEECDNPVAVYGGETGWGAKLLNYG-	Phospholipase A2 <i>Hadrurus gertschi</i> [POC8L9.1]	99%	2e-99	59.68%	72%
HI_PLA2_8 []	MEMHTVMATVIALISTAFA QPIENELLVNFEAMPQQRDGPVRAVRMQRKRSE GREYRTLEGQCILDRLDIGRIAYSIPRDLIKRITKEEMESFEERCERMGDERTYLGTK WCGAGNEAANYSDLGYLDNIDRCCRHDHDCNIPKGVTKYSVKNMGAYTLMNCE CESQFEKCLDAVADEYYWFRKPVEGAINAIKWTFELYGNGCYKIRCNNRRSVMRM EECDNPVAVYGGETGWGAKLLNYG-	Putative phospholipase <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45694.1]	97%	5e-98	58.78%	71%
		Phospholipase A2 <i>Hadrurus gertschi</i> [POC8L9.1]	99%	4e-97	58.47%	72%
HI_PLA2_9 []	MEMHTAMATVIAVISTAFA QPIENELLVNFEAMPQQRDGPVRAVRMQRKRSE GREYRTLEGQCILDRLDIGRIAYSTPRDLIKRITKEEMESFEERCERIGDIERTYLGTK WCGAGNEAANYSDLGYLDNIDRCCRHDHDCNIPKGVTKYGVKNMGAYTLMNCE CESQFEKCLDAVADEYYWFRKPVEGAINAIKWTFELYGNGCYKIRCNNRRSMMR MEECDNPVAVYGGETGWGAKLLNYG-	Putative phospholipase <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45694.1]	95%	1e-96	59.34%	72%
		Phospholipase A2 <i>Hadrurus gertschi</i> [POC8L9.1]	99%	5e-98	59.27%	72%
HI_PLA2_10 []	MAFIFLALATLIQLSYS HDTQRELHLNFEPLPSQRDGPVRAAVVYKESGARDGF SECRMLTSMNEISREGLALPEDAIKRISKEEMDTLEKRCNSNAEQRFSFKMIYPGTK	Putative phospholipase <i>Superstitionia donensis</i>	100%	2e-90	56.30%	70%

	WCGPGNIAKDENDLGSLEADKCCRAHDCRNIGAGSTNYGLKNEGQFTLLNCDCDQ AFHKCLTDIAKANNEGFFGPTNVLKTYYFSVYAPQCYRLSCRKRSASEDARACSGKW MSSFNA-	[JAV45696.1]				
HI_PLA2_11 []	MAFIFLALATLIQLSY SHDTQRELHLNFEPLPSQRDSDWPVRAAVVYKESGARDGF SECRMLTSMNEISREGLALPEDAIKRISKEEMDTLEKRCNSFAEEQRFSEFKMIYPGTK WCGPGNIAKDENDLGSLEADKCCRAHDCRNIGAGSTNYGLKNEGQFTLLNCDCDQ AFHKCLTDIAKANNEGFFGPTNVLKTYYFSVYAPQCYRLSCRKRSASEDSRACSGKW MSSFNA-	Putative phospholipase <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45697.1]	99%	2e-90	54.47%	71%
HI_PLA2_12 []	MAFIFHLALATLIQLSFS YETQRELHVNFEPLPSQRDSDWPVRAAVLYKGSGARDG FSECRMLTSSISEISREVLAFPEDAIKRISKEEMDTLEKRCNSFAEEQRLGFNMIYPGTK WCGAGNIAANETDLGSLEADKCCWAHDHCDNIAVGDTKYGLKNEGSYTLNCECD QTFHKCLTDIATANNEGFMFGKTNQIKQAYFFFYAPKCYRLSCRKRAVSEDCTGKWM SSFQA-	Putative phospholipase <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45696.1]	100%	4e-83	54.39%	65%
HI_PLA2_13 []	MAFIFLLALATLTQLSY SHDTQRELHLNFEPLPSQRDSDWPVRAAVVYKESGARDG FPECRMLTSMNEISREGLALPEDAIKRISKEEMDTLEKRCNSFAEEQRFSEFKMIYPGTK WCGPGNIAKNENDLGSLEADKCCRAHDHCDNIGAGSTKYGLKNEGQFTLLNCDCDQ AFHKCLTDIAKANNEGSGFGPTNVLKTYYFSVYAPQCYRLSCRRRSASEDARACSGKW MSSFNA-	Putative phospholipase <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45696.1]	100%	2e-92	57.14%	70%
HI_PLA2_14 []	MVLLLLSALGLMILG YPYPSRRELYINLEPLLNQESRAVARAAIVTSVSRSEEGKV FSECRMINSMGIERERNTFLAHEIITVSKEEMDAIEKRCSQSAAEEERVITFTYKGTKW CGPGNLADNFDLGPLEQLDKCCRAHDHCDNIGNGETKYGVNTNYKSYTVLNCDCDCE AFDKCLQETAKRVNAEKKATEHVKTLYFENFAHSCYRVYCPNGRSDSNNSCPPEF IWKKNYKEL-	Putative Phospholipase A2 <i>Megacormus gertschi</i> [JAW07099.1]	99%	3e-88	55.46%	69%
HI_PLA2_15 []	MVLLLLSALGLMILG YPYPSRRELYINLEPLLNQESRAVARAAIVTSVLRSEEGK GFSKCRMINSMGIERERSTFLAHEIITVSKEEMDAIEKRCSQSAAEEERSFTFTYKGTK WCGPGNLADNFDLGPLEQLDKCCRAHDHCDNIGNGETKYGVNTNDKSYTVLNCDC EEAFDKCLQETAKRVNAEKKATEHVKTLYFENFAHSCYRIYCPNGMSDSSNSCPFP NFIWKKNYKEL-	Putative Phospholipase A2 <i>Megacormus gertschi</i> [JAW07099.1]	99%	5e-89	55.04%	70%
HI_PLA2_16 []	MFCTLWRSDETNVSEIHSFLNVSEGYKMFLPLVFPILLFFRYPSA LSLHHERTLTT ALPLPQEKTLTAYYQKEQNPYMLIIGRTGDVIHCHQYEEKKEAERVLAALNLKDAVK VTPQRMEGLLKFCVKEERMELPIKLLFIYPGTKWCGVGNDAASDNLGTEKEADSC CRDHDHCDNSIPAFSNKHNLTNYSPTKSNCDCCRFRHQCLGEAKTDAAKIISELYFD LLRMECFQOKSCSRKESCNDTWQWKFA-	Putative Phospholipase A2 <i>Megacormus gertschi</i> [JAW07086.1]	77%	2e-104	71%	82%

HI_PLA2_17 []	MKMKCSFOKFTTTFVLLSTCMLIEA GIFDIVDKVLPITTTFFRFRNGHRMVETIEFN TYIGGKKLVDCYLYGHVYIIDKMMMEVVPSPDIVKEVSKKEMSKLVNTCSDLHVKNFR NEVFEIVKSPFDIARKIFKSLIFPGTKWCGAGDVADDYDDLGVYSETDKCCRTHDHC NDSIAGFETKYSLTNKDFYTKSSCNCPLPFHSCLYEKEAFHSDAVGHLLFFNILQTQCF KEEYPIVKCLKKWGIPLIRETCQKYELDQNGTMKHQFFDAKMYKGNESPLKVKLS H-	Phospholipase A2 <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47992.1]	96%	8e-179	84.53%	92%
HI_PLA2_18 []	MKTSLILFLTMLFVYKCG ILDMVDDVLPITTTTFYREKGGHRMVETIEVNTYINGKK TVDCYMYGDGYIEKMQVLPADIVKEVDKKTISELVNDCSNLLLNELNNGIFHFVK SPFDSIRKAFKSLIFPGTKWCGAGDVADDYEDLGKAEETDKCCRTHDHCNDTIAGF ETKYELKNKNFYTKSACACDLKFHSCLYEGENLPSDIVGKTFFNILQTQCFQKDYPPQ VECLEKSGIPLIRESCQEYKLDYNGTKKYQFFDAKIYETKSDSSFLERLFSS-	Phospholipase A2 <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47991.1]	99%	4e-154	74.10%	84%
HI_ACE1 []	MKIYFIFLPLVMA YSPQEDFIDQARLFYKRNLLGTVAWERVGISIWNSLVGVTETE NVVAEAPSVENVTISDVPDWIPCDYNTIVHILDLLKDSKNLPDEKDESELYALLDNLTN TYIDAKVCSYDQRENATCVPSMQMEEIRSSTESRDEEQLLYYWKAWREETGKKMRK NYEKFIPLKNEESVLNGFKDAGHEWRAHYETECLKEEVDKLVKEIRPLYEELHAYIR RKLKIQYEGLLKPDGPIAHLTYTMEEMWLNIEKFTRPYPEKLTLDITDAMRRRKM TVMDMAVMADRPHYTSLGMKPMTEFWNESILEKPTDRPFDCYPVSLDIGKEGAHRT RFCSLVRLEDLFIIFHEMGHIIHYFLQTDTPILQYRQPNLGLHEAIGGTVALSALNPEY LKQIGLLDNVLANKAQDINFLYMMALMRIGLSHHYVMDKWRWNVFDGTITNSDL NKKWWEYRLKFKQGHCPISQRTENDFDAGAMYLVARNVPSVRYFIAGILEFQFHKAL CDAKGHVGPLHKCTIYNSTKAGDRLTSMKLGSSVSWRSSIQKITGGASNRIDAKPLL KFFRPLYKWLKLNKGHPVGVKSEDPLHCP-	Angiotensin-converting enzyme <i>Araneus ventricosus</i> [GBM64390.1]	83%	4e-171	46.72%	65%
		Angiotensin-converting enzyme <i>Parasteatoda tepidariorum</i> [LAA02259.1]	84%	3e-172	46.64%	65%
HI_ACE2 []	MKTIYGTATLCPYGADATQNCSTLEEDIKPILEKSTNFDPELLHYWKQRDETGRKI RGLYAKYVPLANKEAINNGFTDLGAKWRSKYEVENFREKCELDWDLKILPLYQHLHA YVRRKLGIVYGEDKICSDGPIPSHILGGYMMGESLINLLNLTSPYPNKPQTDITPIMQA RNMSVIDMVKVAEDFFESLGLPSMTEPFWNSIFERIPGRVMQCHPGSLDLCNGEDF RIVMCARVSMEDLNIIHHEMGHIEYFMNYAHQPPLFRDGDANDGFHEAVGDAIALSVF TPTHWKAIGFMENVTDDEEQDINALFATALNKGIGGAPHLFVVDKWRWDLFNGTIST DNMNSKWWEYRLKYQGNCPVVRTELDPASLFHVPAEISYSRYFVALILQFQFHK ALCSAAGHVGPLHKCDIYGSREAGERLKAMLSLGSKPWPEALKVLTGAMDDLDV SPIIEYFQPLLDWLKKNKDEFIWKSDNANICP-	Angiotensin-converting enzyme <i>Hadrurus spadix</i> [JAV48379.1]	100%	0.0	73.52%	86%
HI_Peptidase_M2_1 []	MSANDFLELERLRQQLPLYQQLHAFVRRRLIEVYGEDKIKHNGPIEHLIGLTPQK WNKIFDIVNIFESDFDATKAMEKKMTVSEMVNLAEGFYRSLGPELDAAFWRDSAF EKSPKMDACFSEIQEGCAGYGAKIRMCTNATEYYLHLLQLLGDHAEKATRALHY PFQGAANPGFLIAIGRTADLSTWTESYLRVALFESSSSDRDISVLLRIALENIPVIYN ALSVDTWRLDVFDKTTSSDNMNSKYWEKRVNNEGICPPVRRTESDFDPGAYIHVST	Peptidase M2 <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47965.1]	98%	0.0	74.49%	85%

	HSSIIIEYFVGGILQFQFHKAMSQAAGCTGPLHKCSIYQSHAAGALLKGVMEGRSKP WPEALSILTGGQTNKMQAGALIEFFEPLLQWLRHKNQNEYIGWVADDPTVCP-					
HI_Peptidase_M2_2 []	MLSLYITLLIVGSVLFSTFOKSSS LISDENKAEFLNNVDKQYRESCQDENKVLNFK DLWTFDWKFSNPTLRRAFELLSKMEPASTHRPEQADKSKYEKLEAAMIAGIIGGSV CPYNNQCSRNEEKLKFGINSEVDPSRDYDERLYYWKAWREATGKSLRSTYSEFVD VANTLNQAYPSYGDYWLKDYEMSANDFLELERLRQQLLPLYQQLHAFVRRRLIEV YGEDKIKHNGPIPEHLIGLTPQKWKNKIFDIVNTFESDFDATKAMEKKKMTVSEMVL AEGFYTSLGIPELDAAFWRDSAFEKSSMDACFSEIQEGCAGYGAKIRMCTNATEYY LHLLQLLGDHAHQEKATRALHYPFQGAANPGFLIAIGRTADLSTWTESYLRVALFD ESSSSDRDISVLLRIALENIPVIYNALSVDTRWLEVFDKTTSSDSMNSKYWEKRVNNE GICQYLLFILSDDVVLKSTSNLQVSTLNAL-	Peptidase M2 <i>Hadnurus spadix</i> [JAV47965.1]	94%	0.0	67.76%	80%
HI_Peptidase_M2_3 []	MLSGLAFVADATASIGSNMLSLYITLLIVGSVLFSTFOKSSS LISDENKAEFLNNV DKQYRESCQDENKVLNFKDLWTFEWSFSNPTLRRAFELLSKMEPASTHRPEQADK SKYEKLEAAMIAGIIGGSVCPYNNQCSRNEEKLKFGINSEVDPSRDYDERLYYWK AWREATGKSLRSTYSEFVDVANLNLQAYPSYGDYWLKDYEMSANDFLELERLRQ QLLPLYQQLHAFVRRRLIEVYGEDKIKHNGPIPEHLIGLTPQKWKNKIFDIINTFESDFDA TKAMEKKKMTVLEMVNLAEFGYRSLGIPELDAAFWRDSAFEKSSKMEACFSEIQEG CAGYGAKIRMCTNATEYYLHLLIQLLGDHAHQEKATRALHYPFQGAANPGFLIAIGRT ADLSTWTESFLRSVALFDESSSSDRDISVLLRIALENIPVIYNALSVDTRWLEVFDKTT-	Peptidase M2 <i>Hadnurus spadix</i> [JAV47965.1]	96%	0.0	67.43%	81%
HI_disulfide- isomerase_A3 []	MLREFIFLLFVISVVIS SDVLDLSGSDFEERVKEHDTMLVEFFAPWCGHCKKLAPKY EEAATILRKSEPPVPLAKVDCTSDAGKETCSKYGVSGYPTLKIFRGGFSEYSGARES DAIVKYMKAQVGPSSVEIKTSAEAKKLLSRAEVVIVGFFKDENSALKEEFLKVADKL RETTSFGHTFSQELMDLYGYKDQVFLFRPSHLQSKFEEKELTYGGAARKADLQEFIK ENYHGLAGHRTQENFQEFKNPLVVAYYDVYVKNKGTNYWRNRVMKVAQKFKG KLNFAVSDKSKFSAEVEDFGLSITGDKPGIAARNEKQKFRMTEEFMSMEAFEKFLQDF LDGKLTPLHKSEPVPEKNDGPVKVAVAENFEELVINNDKILIEFYAPWCGHCKKLA PTYEELGTEMENEAVEIVKMDATANDVPPAFEVHGFPPTYLWLPKNSKDSMPKYEGG RELDDLKYYIAKHSTEELNDFDRKGSKSKKSTEL-	Protein disulfide-isomerase A3 <i>Centruroides hentzi</i> [MBW20267.1]	100%	0.0	79.18%	90%
		Protein disulfide-isomerase A3-like <i>Centruroides sculpturatus</i> [XP_023243657.1]	100%	0.0	79.18%	90%
HI_disulfide- isomerase_A4 []	MANWFIVITLTAVFSLIST EDDIPNDSIPVVEGVGGNIKITEEDDVLVLTKNDFDLV VLTKDIIIVVEFYAPWCGHCKNLAPEYAKAAKLLKEEVTPIPLAKVDAIVETELATKYD VSGYPTMFIFIRKQKFPYDGPRTALGIVEYMKQQADPNWKPPEPVITLTSENFTDTV NSAEIILVEFYAPWCGHCKKLAPEYERAAKQLAERHPPIPLAKVDGTAEKDLANSFD VSGWPTLLIFRKRGRKYKYEGRDEPGIVNHMIEQSGSPSMVAVSAKSLEINMRGNDPI VIGYFTSNEEKLKFEYIEAANELRGKFNFYHTFDEDIKKHFAASEGTIVLYQPEIFHSE YESPHYKFSKHGDSIEILKFLNDNALPLVGHRTSRNSMWRVINKVPLVAVYYDVDFS FDHKVQTLIRKEVLKAAAQYKGSVTFCSIDEAEFSDELADLDDSGEDVNVGYFQ SRRLRYRLEPTDDFSSEILKEFVENIQKGKISRHIKSQVPKSSKGLVTVVVVGSTFDDL	Protein disulfide-isomerase A4-like <i>Centruroides sculpturatus</i> [XP_023221326.1]	99%	0.0	68.72%	82%

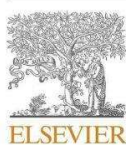
	VTNNKDVLEFYAPWCPHCNKFEPIYKLLAKHYNDKDLIIAKIDATNNDPFEQYE ISGYPTIYFIPASKKEDFVYVTGERNLGELIKFIDKQYSKSDSLSKESAETKDEL-					
Hi_disulfide- isomerase_A5 []	MKCHMMKCHMMVNFLKDPSGDMPWEEDEMSHDIVHISDANALGKLLHKEKLPIM VMFYAPWCGFCRKLKPEYAAAATEMKSNSILAAMDVNKPENAVVRRHFNITGFPTL LYFEGGNLKLRYEGENNKDSIISFLKNPTKQPEKPKELDWSETSNDVIHLTDTLFESF MTKESVLMFYAPWCGHCKKLPYVTAASSLKTQNVPGVLAAVDATREKELAE RFKITGYPTIKYFKDGEFAFDVNLRTADKIEDFMKNPKPPPPPEVPWHSTPSDVVH LNEDTFKTLKRKKHVLVMFYAPWCGHCKKAKPEFQAAAARFKDDPKVEFGAVDC TMYSALCNANEVRYGPTLKYFSYKISKPYEGGRTEADFVSFMNDPQNSLSTPSPAS TSPEEWWSELHGAEDLHHLTGSTFENFNQHEVSVLVMFYAPWCGHCKAMKAAFAQ AASVLKSEKVPGLATVDATVEREVASKYEIKGFPTVKYFRKQGLISEYDQKRTVED LVTFMKTNLQTKDEL-	Protein disulfide-isomerase A5-like <i>Limulus polyphemus</i> [XP_013790549.1]	98%	0.0	70.62%	85%
Hi_disulfide- isomerase_A6 []	MKCVNSKEMKIVPVVFLAVIEISNALY GSSSDVVDLTPSNFNSLVIDSDDVWIVEF YAPWCGHCKALAPEYSKAATALKGVVKGVDADKHQSLGGQYGVKGFPTIKVFG SNKRSPQDYSGRPRTASGIIDTAFKELRKIVNGRLGKSSSGGSDKTTDSKDVIELTDSN FEETVLKSDMFWLVEFYAPWCGHCKNLAPHWAKAATELKGKIKLGALDATEHTIM SRKYGVQGFPTIKFFSAGRKDGSADYTGGRTSEDIVNWAEMKFNENAPPEVNQLI TNAVLDKACENNQLCILSVLPHILDQCSACRNEYIDILKRIGEYKRNWSGWLWVEA AAQPELEESLEIGFGYPAMAIINVRKMKYSLLRGSFSYDGINEFLREVSVGRGASAP VKGAKLPDIHKTEAWDGGKDELPEEDIDLSDELDEKPKHSEL-	Protein disulfide-isomerase A6 homolog <i>Centruroides sculpturatus</i> [XP_023215237.1]	93%	0.0	78.37%	89%
Hi_disulfide- isomerase_TMX3 []	MVEKIFLVIVLGFSCIYSVQSNR VSELSDRFLEVRNEGVWLVVMFYAPWCGHCKNLE PIWNQVAQSLVEGEIRVGRVDCRFTSVATEFGVHGFPTIMFIKGHKTVEYKGDRIRE EIVDFAWRMDGPPVRHFPSCDDFQNAKRNKKVFFVYVDGEKLGGNVELKDEYTRIA EEFQPLIYFYTSPICLSRVEGITVPTSASVYVFKDKTSYKFDEEQAQENITLHDWVN WERFSPFLKVTHGNFHQLLTKGKHVALAVLEENLVGGLVMKMRFKDVEAIAVN NRERYHENIIFGWLQPDIANSVAMTTLVSPSFIIVNSVTYQYYMPPSSEEEKIPTPTII ELLDKVVNKSAPPYGGDTLRYMYRAYEAKTALSSMWKGNPLLTALLGLPLGLL SIICYTSCCNDILEADEEESHYPPRHEKKE-	Protein disulfide-isomerase TMX3- like isoform X1 <i>Centruroides sculpturatus</i> [XP_023214815.1]	98%	0.0	80%	90%
Hi_disulfide- isomerase-like_1 []	MQLFLSLTAFYVLTASS SEVKKEDNVVLTKDNFDDTVKINKYVLEFYAPWCG HCKALAPEYAKAAGQLIEEKSDIKLAKVDATEETELSEKHKVGYPTLKFFRDGIPV DYTGGRTADTIKWLKKTGPPATHLKTVDKAKNFKDSDDVVVIGFFKDQESKEAKE FLDVAFSIDEHPFGITSDENIYKLEVEKDNVVLFKKFDGRVNYEGKIEKDSIKKFKV ANSLPLVIEFTHETAQKIFGGDVKLHNLFISSKSEDEYKILEKFRFVASDFKGVVLFV SINTDEEDHSKIVEFFGLKDEQPTLRLIKLEEMTKYKPLTTELTEDNIRNFVQGVLD GKIKQHLLSQDLPEDWNGPVDLVSKNFDEVVYDTSKDVIVEFYAPWCGHCKQLA PIYEKLGK YKDRDDIIIAKMDATANELEHTKVNSFPTIKLYKKGTVNEVIEYKGERTFE ALSKFIDGGVKEPEEKPKETDSKDEL-	Protein disulfide-isomerase <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47972.1]	100%	0.0	86.76%	92%

HI_disulfide- isomerase-like_2 []	MLGAVSLCTLLLFVIAAG DEIKKDGVEVLVLNKNDFQKAIQENKHILVEFYAPWCGH CKALEPEYAKAAKLLKEEQSDIALAKIDATAESELAEEDYDVRGYPTIRFIRDGKSSEY KGGRTAEDIVRWLKKKVGPPADNLETVDSVKTFQASAEEVVLVGFVKDQTSDSAQVF LDVALESDDYAFGITSQDDVFKAYNMEKDGIVLQKQFDEGRNNFEGELTAEALKEFI NSNSLPLVVEFNQDTAQKVFGEIKAHNLLFVSKQSDYEYKLELVFRKVAKEFKNKV LFVTIDIDEEDHERIMEFFGMKKEDAPDMRLIRLEEMTKFKPPTSGLDEENIRNFVQG VLDGKIKRHLLSESVPDDWDKAAVKVLVGHNFDEIAFDKSKDVLVEFYAPWCGHCK QLAPIYEELGEKYKDHSSIVIAKMDATTNELDHVKIHSFPTIKLKKESNEVIDFNGER TLEGLTKFIDSGGVDGASPKKEEIDEEEEKDDDEKKRDEL-	Protein disulfide-isomerase <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47971.1]	95%	0.0	93.29%	97%
HI_Hyal1 []	MISAIHFPICTGNSETKAYLRHVMSSALFVGHILTLVSG HYIEASFDVFWNVPSLCS IKFRVNMNTLSKYNLLVNNREKFIGDKIALIYESALGKYPHIDPKKGDVNGGLPQLG DLDEHLKLAEKDVQKLLPDPKFSGLGVIDWEAWRPIWEYHWGTLGIYKNRTMELVK KNHPTWSTKLIIESEAKTLWEDSAKQWMSKTLELAKKLRPQGRWCYLLFPDCYNYF GKDQPSQFDCSNMIKSNNDRLSWMWDVSTALCPSIYFIENQMKYNESQRIWFLYSKL AEA VRVSRPNTKIYPYINMIHVSRLVPQDHFWMKLSLIGSLGLDGAIVWGSSSYLQ NRKACEELESYVENVIGPAVTTVSSNVERCSQMVCNCRGKCTWPNPFTSWRYLAD TTMGDFDRNKITCRCQSHNGRYCE-	Putative Hyaluronidase <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45691.1]	94%	0.0	75.88%	86%
HI_Hyal2 []	MISAIHFPICTGNSETKAYLRHVMSSALFVGHILTLVSG YIEASFDVFWNVPSLCS IKFRVNMNTLSKYNLLVNNREKFIGDKIALIYESALGKYPHIDPKKGDVNGGLPQLG DLDEHLKLAEKDVQKLLPDPKFSGLGVIDWEAWRPIWEYHWGTLGIYKNRTMELVK KNHPTWSTKLIIESEAKTLWEDSAKQWMSKTLELAKKLRPQGRWCYLLFPDCYNYF GKDQPSQFDCSNMIKSNNDRLSWMWDVSTALCPSIYFIENQMKYNESQRIWFLYSKL AEA VRVSRPNTKIYPYINMIHVSRLVPQDHFWMKLSLIGSLGLDGAIVWGSSSYLQ NRKACEELESYVENVIGPAVTTVSSNVERCSQMVCNCRGKCTWPNPFTSWRYLAD TTMGDFDRNKITCRCQSHNGRYCE-	Putative Hyaluronidase <i>Superstitionia donensis</i> [JAV45691.1]	94%	0.0	75.63%	86%
HI_LAAO []	MAERAQVIIVGAGISGLSAAK WLHESGVDVIVLEARDRVGGRTFTKRDPVAGGYV DLGGSYIGPTQNHFLRLTKELGIKNYKINEKECVVFYRKGKRYRYSAASNIPFWNPIV SLDVNNFLRTVDKMGEEIPADAPWDAPHAEEWDTITYHDFVDKICHTKTARALAKVI VEIALTAEDYESSLLWVLWYIKLCHGTLRLLSATNGGQERKFIGGSQQISERIANRLS DKVKLKNPVVGISQLSDRVVIKTMDGHTYQAGYVILAVPLPLQMKIHFDPPLPPHRN QMIQRCPMGSMKCMYYKAPFWRSGFCGSFLADTDEENPVAGGFDDTKPDGTH AAIIGFCAADYVRNMAKLSKEERKQIYAKQLATVFGLEEFQPVHYEEHNWMTEQY SGGCYPAMFPPGFLTRYGKCLREPIGRMYFAGTETATVWSGYMEGAIQAGERAAREI LHTMGKLLKDEIWRKEPVAQDVPDIPFVRTWVERNQPSVPGLYRLLGLTAVLAISGS VFFRCKYKCF-	L-amino acid oxidase <i>Hadrurus spadix</i> [JAV48068.1]	100%	0.0	90%	96%
HI_PAM []	MOKTDNLIKMLQDKLLVLEILSLVVVVIPVIG HVHIRAEPVYRENFIMNISMPDV KPLAADSYLCTAKQLGFGSAYITRFTPADLERAHHMLLFGEELDNHNHLYPHSW	Peptidyl-glycine alpha-amidating monoxygenase-like	98%	0.0	65.43%	78%

	NCIHSKCLKGMTIMYAWAKNAPPVTLPPDVGFHVSGNSSIHYYIILQLHYAKPLPENES DRSGLMLHITRVQQKYIAGIHLLLASKAVIPPHKPKFHVVDVNCYIQNSVPIHPFAYRV HAHQLGVVISGYHYNFKNQSWTFLAKGNPQWPQAFFPMDHIHTVVEGDVLAALRCTF NSSLRSMPTYMGSSSNDEMNCNLYIMYYTRSDRGHPFNRCIDVEVPQLVNMLPSGND VPLPRNPAMEEYAQGHLDDEQDPSNYQNAWSQKPTVYKKGNSFLYDSSQYFRPLP PQNIPEPPFIPSAYGHKVDPNHANPDFKYKEVENWPAEKSNYGQVAAVDIDAQNNLVI FHRGSHVWNEQTFDAENRYQLTDNGPISSPTVVTLDPATGHILNQWGSNLFYMPHGL TVQNDYIWLTDVAMHQVFKFPSSGSIISVLTGERFTPGSDHKKHFKCKPTSVAISSNGNI YVADGYCNSRIVRFSADGEFMNQWGQSNPIGVSSPPKGSFAIPHKVILAEDKQLVCA ADRENGRIQCFTLITGNFQFQIAQKEFGGRLFSIDYTPVRGGLLYAVCGPSEYFDHPV QAFVFNFTSQLLNSFAPKKGSFTQPHDIAVTLDSNEVFVSEIGPNKVWKFLRDSHKS TKKVLEDIPPVQVHNPTVTPQPTDSGTVVTKATIIVENKDKSLLSKQKPSDDIGSFG TSMIIMALLAIPVLLLIITAIIRLKKRGLQHCSFGHLKGLWGGYRTPHPQDKFNIGNL LNPHKGFDRVAMDESIDGEGSGSDIEEFSAVARKA-	<i>Centruroides sculpturatus</i> [XP_023214514.1]				
HI_PHM []	<u>MVNHLGFLVLTACFLPTFS</u> YRTLNLMLPNVQPTQPETYLCTSFKMNKKDHEYI VKFEPNATMHVAHHILYGCKEPGYVERDTPRAVWECGEMAGSKSEYHRAPTCAEG AQVIYAWAKDAPALQLEPGVGFVKVGGTDVRYLVLVQVHYASVENFINGGTDNSGIFI NLVPSTDGGVTKRAGVYLLGTSGKIEPRETEYMETACTISEPIVHPFAFRTHTHALGK VVAGYVKKGKKWVRIGKHNPQEPQMFYPVDDKTLTVKQGDVLAARCTMHNFRNR VTYVGATAKDEMCNFYMMYYTDGDKILEDKYCFSSGPPYYVWDADPQVGKPPRW VNRDASTLLR-	Peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase <i>Hadrurus spadix</i> [JAV47979.1]	100%	0.0	81.45%	92%
HI_Protease_inhibitor []	<u>MNFLYKCTKLFLLMKTSSIAYLVS</u> SDSVPSTQATEGNMILLTGIFLIVLLASQASA DLKKLAKANNEFSIQMYKTLPSDENVFYCPFGVFRALGMLFKGARGNTAQEMRKAL SYETAQISDETVHENFKLLESVDDSTGKYTLQIANAVSSSDYSLSEEYKEALKTY KALSKEVNFRTKTKALNEINDWVKEKTQGGKISQLLDDLEDVTMVLLNAVYFKGT WQTQFNESKTKQETFFANGKDAKPVPMNMIIHEFEYANFPEDKFQALKLPYKGEDI SMVILPFEKDGLKDLEKSLTLEKLEEITSDFTKRKVKVAIPKFKLEYSKKNLNDNLKKL GMNNAFQQGADFTGIDKAGRMFVSDVVHKAVIEVNEEGSEAAAATAIIGVIRSSRPR RQPEFIANHPFLFLLQHKKVGMLFMGRVSQL-	Putative Protease inhibitor <i>Megacormus gertschi</i> [JAW07136.1]	91%	0.0	67.93%	83%

APÊNDICE G – Artigos publicados durante o mestrado

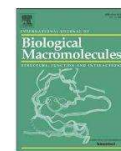
International Journal of Biological Macromolecules 225 (2023) 1246–1266



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac



An overview of *Tityus cisandinus* scorpion venom: Transcriptome and mass fingerprinting reveal conserved toxin homologs across the Amazon region and novel lipolytic components

Yan Kalapothakis^a, Kelton Miranda^a, Denis Alexis Molina Molina^b,
Izabela Mamede Costa Andrade Conceição^b, Débora Larangote^a, Huub J.M. Op den Camp^c,
Evanguedes Kalapothakis^a, Carlos Chávez-Olórtegui^b, Adolfo Borges^{d,e,*}

^a Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, CEP: 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, CEP: 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Department of Microbiology, Faculty of Science, Radboud University Nijmegen, Heyendaalseweg 135, NL-6525 AJ Nijmegen, the Netherlands

^d Instituto de Medicina Experimental, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

^e Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica, CEDIC, Asunción 1255, Paraguay

ARTICLE INFO

Keywords:

Antivenom
Envenomation
Ion channel toxins
Tityus
Scorpion
Scorpion venom

ABSTRACT

Tityus cisandinus, a neglected medically important scorpion in Ecuadorian and Peruvian Amazonia, belongs to a complex of species related to the eastern Amazon endemic *Tityus obscurus*, spanning a distribution of ca. 4000 km. Despite high morbidity and mortality rates, no effective scorpion antivenom is currently available in the Amazon region. Knowledge of the structural/functional relationships between *T. cisandinus* venom components and those from related Amazonian species is crucial for designing region-specific therapeutic antivenoms. In this work, we carried out the first venom gland transcriptomic study of an Amazonian scorpion outside Brazil, *T. cisandinus*. We also fingerprinted its total venom through MALDI-TOF MS, which supported our transcriptomic findings. We identified and calculated the expression level of 94 components: 60 toxins, 25 metalloproteases, five disulfide isomerases, three amidating enzymes, one hyaluronidase, and also uncovered transcripts encoding novel lipolytic beta subunits produced by New World buthid scorpions. This study demonstrates the high similarity between *T. cisandinus* and *T. obscurus* venoms, reinforcing the existence of a neglected complex of genetically and toxinologically related Amazonian scorpions of medical importance. Finally, we demonstrated the low recognition of currently available therapeutic sera against *T. cisandinus* and *T. obscurus* venoms, and concluded that these should be improved to protect against envenomation by Amazonian *Tityus* spp.

1. Introduction

Scorpionism, or the medical consequence of scorpion stings in humans, is a neglected health problem in tropical and subtropical areas associated with poverty and the lack of access to effective scorpion antivenoms [1]. Particularly, scorpionism by species in the genus *Tityus* can be severe and lethal among children in South America, where several areas, including the Amazon Basin, have been classified as hyperendemic. In southeast Brazil, the most problematic scorpion is *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, a parthenogenetic species currently expanding

its range and responsible for most severe envenomations in the area, whose venom is used to prepare the only specific scorpion antivenom produced in the country [2]. In Amazonia, focus has been given to scorpionism by Brazilian populations of *Tityus obscurus*, *Tityus strandi*, *Tityus apiacas*, *Tityus metuendus*, and *Tityus silvestris*, all of which produce neuromuscular alterations in envenomed victims as opposed to the mainly autonomic manifestations recorded in the southeast [3–7]. Significantly, the anti-*T. serrulatus* antivenom does not neutralize the neurological effects of *T. obscurus* venom, associated with cerebellar dysfunction [8]. However, scorpionism is prevalent in other sections of

* Corresponding author at: Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica, CEDIC, Asunción 1255, Paraguay.
E-mail address: borges.adolfo@gmail.com (A. Borges).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.185>

Received 13 August 2022; Received in revised form 9 November 2022; Accepted 18 November 2022

Available online 22 November 2022

0141-8130/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

DECLARAÇÃO DE ACEITE PARA PUBLICAÇÃO


A REVISTA ACTA BIOLOGICA BRASILIENSIA, ISSN online 2596-0016, publicação semestral do Instituto de Ciências Biológicas e Naturais da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, declara que o artigo intitulado:

“*Epicrates crassus* snake: complete mitochondrial genome sequence”; com autoria de:

Nazaré Lúcio, Kelton Miranda, Débora Larangote, Victor Hugo Martins Machado, Evanguedes Kalapothakis e Yan Kalapothakis,

foi aceite para publicação na Revista Acta Biologica Brasiliensia.

A previsão para publicação é no volume 6, número 1 de 2023.

Documento assinado digitalmente
 Afonso Pelli
Data: 05/06/2023 21:42:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Afonso Pelli
Editor Chefe