

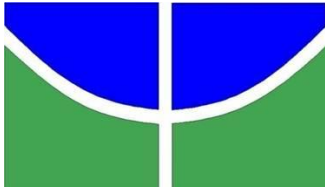
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
ANIMAL

*Análises transcritômicas
comparativas do ferrão de
Potamotrygon falkneri e
Potamotrygon motoro*

Dissertação de Mestrado do Programa de Biologia
Animal-Universidade de Brasília

Nelson Gomes de Oliveira Júnior

Brasília - DF
Fevereiro de 2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
ANIMAL

*Análises transcritômicas do ferrão
de *Potamotrygon falkneri* e
Potamotrygon motoro: o primeiro
estudo transcritômico do ferrão de
espécies de arraia*

Dissertação de Mestrado do Programa de Biologia
Animal-Universidade de Brasília

Autor – Nelson Gomes de Oliveira Júnior

Orientadora – Dra. Márcia Renata Mortari

Co-orientador – Dr. Octávio Luiz Franco



Brasília - DF
Fevereiro de 2014



“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos”.

(Albert Einstein)

Agradecimentos

A Deus

Às grandes e mais importantes mulheres da minha vida, minha avó Luzia, minha mãe Nilza e minha irmã Fabiana; por todo o apoio incondicional e sabedoria que me foi passada em toda minha vida.

Ao meu pai; pelo seu tímido apoio, mesmo com seu jeito peculiar de demonstrá-lo e também meu irmão Edgard.

Ao meu orientador Prof. Dr. Octávio Luiz Franco; por seu conhecimento, paciência, preocupação e carinho em todos esses anos juntos.

À minha querida orientadora Prof. Dra. Márcia Mortari; que sempre se dispôs a ajudar a qualquer momento que se mostrasse necessário.

À equipe de colaboradores da bioinformática; Prof. Dr. Gabriel Fernandes e Prof. Dr. Sérgio de Alencar pelo suporte nas análises e montagem do transcritoma.

Ao Dr. Domingos Garrone, pela ajuda e suporte na coleta do material.

Aos meus melhores amigos, Mirna e Thiago; pelo constante apoio emocional e por terem cuidado de mim nos momentos difíceis.

Aos meus grandes “amores” Betty Souza e Marlon Cardoso por toda a ajuda e apois nesses 2 anos de mestrado, principalmente no final dessa etapa, por terem me ajudado como ninguém e impedir meu surto psicológico no momento mais complicado.

Aos meus queridos companheiros de laboratório e outro; Stella, Jeaser, Bernardo, Aline, Ana Paula, Thata, Flávia e Daniel por tantos momentos ótimos, alegrias e carinho.

À minha adorável segunda mãe Kênia Chaves; por todo o suporte dentro do laboratório e sua companhia em todos do dias dessa jornada.

À minha dinda Val; por tanto amor e carinho e pelo seu orgulho que sempre demonstrou por ter um sobrinho que esta seguindo carreira acadêmica.

Ao vínculo com o projeto Capes-Toxinologia de onde este projeto faz parte.

Às instituições CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

E a toda equipe do CAPB; pelo conhecimento transmitido e compartilhado.

Resumo

Potamotrygon falkneri e *Potamotrygon motoro* consistem em espécies de arraias da família Potamotrygonidae. Estas famílias são caracterizadas por terem um ferrão retro-serrilhado coberto por um epitélio glandular produtor de peçonha. A sintomatologia desses acidentes se dá por processos inflamatórios podendo progredir até a necrose e úlceras. O conhecimento acerca dos componentes proteicos desta peçonha ainda é muito limitado. No presente estudo, ferramentas transcritômicas foram utilizadas afim de melhor compreender o conteúdo proteico do ferrão das espécies *P. falkneri* e *P. motoro*. Primeiramente, uma extração de RNA com trizol foi realizada com subsequente análise por eletroforese em gel de agarose. Os RNAs obtidos foram sequenciados através da plataforma Illumina MiSeq. Para as análises do perfil transcritômico, as sequências foram montadas *de novo* através do programa Trinity. Após, para caracterização funcional, os dados foram submetidos à ferramenta BLAST contra base de dados UniProt seguida de subsequente análise na base de dados do KEGG Orthology. Posteriormente, um diagrama de Venn foi elaborado indicando o grau de semelhança entre as espécies. Após análise no KEGG, os transcritos foram divididos em grandes categorias, onde, a mais expressa das categorias correspondeu aos transcritos não relacionados a nenhuma via biológica aparente, representando 30% para *P. falkneri* e 31% para *P. motoro*, em seguida a categoria mais abundante e com grande importância foi a de metabolismo com 15% para *P. falkneri* e 14% para *P. motoro*. Vale ressaltar também a categoria de processos celulares com 10% para ambas as espécies. Após essa separação de classes, análises das vias relacionadas ao metabolismo e possíveis proteínas relacionadas aos sintomas observados nos acidentes ocasionados por arraias, foram discutidas, tais como, fosfolipases, metaloproteinases e desintegrinas. Em suma, as análises transcritoma ajudarão a elucidar como se dá o processo de envenenamento e quais as possíveis moléculas responsáveis pelos danos causados nesses acidentes, esse estudo permitirá ainda, entender como podemos minimizar os danos causados nesses acidentes, amenizando assim, os danos socioeconômicos causados a essas populações ribeirinhas.

Palavras chave: Arraia, ferrão, transcritoma, sequenciamento *de novo*

Abstract

Potamotrygon falkneri and *Potamotrygon motoro* are stingray species from Potamotrygonidae family. This family has a typical aliasing sting covered by glandular epithelium producer venom. The symptomatology of such accidents occurs by inflammatory processes and may lead to necrosis and ulceration. The knowledge about the protein venom components of this, are still very limited. In the present study, transcriptomic tools were used in order to better understand the protein content of *P. falkneri* and *P. motoro* sting. Firstly, a RNA extraction was performed using trizol with subsequent agarose gel electrophoresis analysis. The obtained RNAs were sequenced using the Illumina MiSeq platform. For the transcriptome profile analysis, the sequences were *de novo* assembled by Trinity program. Furthermore, functional characterization was performed, where, data were submitted to BLAST against UniProt database, followed by KEGG Orthology database analysis. Subsequently, a Venn diagram was prepared, indicating the similarity between species. After the KEGG analysis, the transcripts were divided into categories, where the most explicit category was the category with transcripts unrelated to any apparent biological pathways corresponding to 30% for *P. falkneri* and 31% for *P. motoro*, in sequence, the most abundant and very important category was metabolism with 15% for *P. falkneri* and 14% for *P. motoro*, it is also worth mentioning the category of cellular processes with 10% for both species. After this separation, subsequent analysis of pathways related to metabolism and possible proteins related to symptoms observed in accidents caused by stingrays were discussed, such as, phospholipases, metalloproteinases and disintegrins. In short, the transcriptome analyzes will help elucidate how is the process of poisoning, and what the possible molecules responsible for the damage caused in these accidents, in addition, this study also allow, to understand how we can minimize the damage caused in such accidents, thus mitigating the physical and socio-economic damage to these riverine populations.

Keywords: Stingray, sting, transcriptome, *de novo* assembly

Índice de ilustrações

FIGURA 1. EXTRAÇÃO DO FERRÃO DA ARRAIA DA ESPÉCIE <i>P. FALKNERI</i> . FOTO TIRADA POR NELSON JÚNIOR (2012).....	13
FIGURA 2- FIGURA ESQUEMÁTICA DEMONSTRANDO A ANATOMIA DE UM CORTE TRANSVERSAL DO FERRÃO. A. CAUDA COM FERRÃO INDICANDO SENTIDO DO CORTE. B. FERRÃO EM CORTE TRANSVERSAL MOSTRANDO REGIÃO MINERAL NO CENTRO E AS GLÂNDULAS PRODUTORAS DE PEÇONHA RECOBRINDO O MESMO. C. ORGANIZAÇÃO DAS CÉLULAS EPITELIAIS COM A PRESENÇA DE GLÂNDULAS PRODUTORAS DE MUCO. D. ORGANIZAÇÃO DAS CÉLULAS PRODUTORAS DE PEÇONHA ALONGADAS E COMPACTADAS EM VOLTA DA REGIÃO ÓSSEA DO FERRÃO. E. DISTRIBUIÇÃO DAS GLÂNDULAS PRODUTORAS DE PEÇONHA.	14
FIGURA 3- EXEMPLARES E REPRESENTANTES DOS DIFERENTES GÊNEROS DE ARRAIAS ATÉ HOJE DESCRITOS DENTRO DA FAMÍLIA POTAMOTRYGONIDAE. A. <i>HELIOTRYGON GOMESI</i> (HTTP://WWW.WIKIPEIXES.COM.BR/ESPECIES:HELIOTRYGON_GOMESI). B. <i>PARATRYGON AIEREBBA</i> (HTTP://ROCHEN.CHAPSO.DE/PARATRYGON-AIEREBA-S235085.HTML). C. <i>PLESIOTRYGON NANA</i> (HTTP://WWW.ROGGENFORUM.NL/VIEWTOPIC.PHP?F=58&T=4482). D. <i>TEANIURA LYMMA</i> (HTTP://POURQUOI-JE-PLONGE-EN-BRETAGNE.OVER-BLOG.COM/40-INDEX.HTML) E <i>POTAMOTRYGON FALKNERI</i> (FOTO DE NELSON GOMES). AS FIGURAS A, B, C E D FORAM MODIFICADAS DA INTERNET.	16
FIGURA 4. EXEMPLARES DE DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>POTAMOTRYGON</i> . A. ESPÉCIE <i>POTAMOTRYGON FALKNERI</i> . B. ESPÉCIE <i>POTAMOTRYGON MOTORO</i> . (FOTO POR NELSON JÚNIOR).....	18
FIGURA 5. DIAGRAMA DE VENN MOSTRANDO A SOBREPOSIÇÃO DE KOs OBTIDOS PARA AS DUAS ESPÉCIES DE ARRAIAS, BEM COM AS CLASSES DE TRANSCRITOS RELACIONADOS A CADA UMA DAS ESPÉCIES E TAMBÉM PARA AMBAS.....	51
FIGURA 6. DISPOSIÇÃO DAS CLASSES E SUBCLASSES ORIGINADAS A PARTIR DAS ANÁLISES TRANSCRITÔMICAS DE <i>P. FALKNERI</i>	53
FIGURA 7. DISPOSIÇÃO DAS CLASSES E SUBCLASSES ORIGINADAS A PARTIR DAS ANÁLISES TRANSCRITÔMICAS DE <i>P. MOTORO</i>	54

Índice de tabelas

TABELA 1. SEQUENCIAMENTO E MONTAGEM DE NOVO DO TRANSCRITOMA DE <i>P. FALKNERI</i> E <i>P. MOTORO</i> , UTILIZANDO O SEQUENCIADOR ILLUMINA MiSEQ	48
TABELA 2. TRANSCRITOS ENCONTRADOS RELACIONADOS ÀS CLASSES DE FOSFOLIPASES.	62
TABELA 3. TRANSCRITOS ENCONTRADOS RELACIONADOS ÀS CLASSES DE METALOPROTEINASES.	66
TABELA 4. TRANSCRITOS ENCONTRADOS RELACIONADOS ÀS CLASSES DE DESINTEGRINAS.....	71
TABELA 5. TRANSCRITOS ENCONTRADOS RELACIONADOS AS CLASSES DE CASPASES.	73

Lista de abreviações

3FTx – *Tree Fingers Toxins*

ADAM - *A Disintegrin and metalloproteinase*

ADAM10 - *A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*

ADAM12 - *A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 12*

ADAM15 - *A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 15*

ALP – *Adaptor Ligation Plate*

BAC – *Bacterial Artificial Chromosome*

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

CAP – *Clean Up ALP Plate*

CARD – Domínio de Recrutamento de Caspases

CASc – Região Catalítica de Caspases

CDP – cDNA Plate

DED – Domínio Efetor de Morte

DCT- *Diluted Cluster Template*

ECM – Matriz Extracelular

ED – Entner-Doudoroff

EM – Embden-Meyerhof

EST - *Expressed sequence tag*

FPF – *Fragment Prime Finish Mix*

KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

KOs - *KEGG Orthology codes*

liso-PA – Ácido Lisofosfatídico

LP-PLA2 – Lipoproteínas Associadas a Fosfolipases A2

MMP1 – Matriz Metaloproteinase 1

MMP2 - Matriz Metaloproteinase 2

MMP8 - Matriz Metaloproteinase 8

MMP9 - Matriz Metaloproteinase 9

MMP10 - Matriz Metaloproteinase 10

MMP12 - Matriz Metaloproteinase 11

MMP13 - Matriz Metaloproteinase 13

MMP20 - Matriz Metaloproteinase 20
MMP27 - Matriz Metaloproteinase 27
MMP28 - Matriz Metaloproteinase 28
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
NO – Óxido Nítrico
NP – Peptídeos Nutriureticos
ORFs – *Open Reading Frame*
PCR – Reação de Polimerização em Cadeia
PLA1 – Fosfolipase A1
PLA2 – Fosfolipase A2
PLD – Fosfolipase D
RBP – *RNA Bead Plate*
RNA seq - Sequenciamento de RNA de Nova Geração
TF – Fator de Tecido
TSP – *Target Sample Plate*

Sumário

Agradecimentos.....	4
Resumo.....	5
Abstract.....	6
Keywords: Stingray, sting, transcriptome, <i>de novo</i> assembly.....	6
Índice de ilustrações.....	7
Índice de tabelas.....	8
Lista de abreviações.....	9
Sumário.....	11
Introdução.....	13
Taxonomia dos Myliobatiformes.....	13
Epidemiologia de peixes dulciaquícolas.....	17
Abordagem transcritômica como ferramenta na descoberta de novas ferramentas terapêuticas.....	19
Análises transcritômicas de glândulas de peçonha de animais.....	21
Escorpiões.....	21
Aranhas.....	24
Abelhas e Formigas.....	26
Serpentes.....	27
Mamíferos.....	32
Análises transcritômicas de animais peçonhentos aquáticos.....	33
Propriedades bioquímicas das peçonhas de arraias descritas.....	37
Peptídeos atuantes em microcirculação.....	37
Enzimas hidrolases.....	38
Justificativa.....	39
Objetivo Geral.....	40
Objetivos específicos.....	40
Material e Métodos.....	41
Metodologia desenvolvida.....	41
Coleta dos ferrões.....	41
Extração do RNA.....	41
Quantificação e eletroforese de RNA.....	42
Análise da integridade do mRNA extraído.....	42
Construção da biblioteca de RNA e Sequenciamento por RNA-seq.....	43
Processamento dos dados e montagem do transcriptoma.....	47
Perfil transcritômico dos ferrões de <i>P. falkneri</i> e <i>P. motoro</i>	47
Resultados e discussão.....	48
Sequenciamento e montagem dos transcriptomas de <i>Potamotrygon falkneri</i> e <i>Potamotrygon motoro</i>	48
Perfil transcritômico funcional.....	50
Vias biológicas encontradas nos transcritos.....	56
Metabolismo de aminoácidos.....	57
Metabolismo de carboidratos.....	58
Metabolismo de glicanos.....	59
Metabolismo de lipídeos.....	60

Vias de cascata de coagulação	61
Possíveis transcritos presentes na peçonha de arraia	62
Fosfolipases	62
Fosfolipase A2	62
Fosfolipase D	63
Fosfolipase A1	65
Metaloproteínas	66
Colagenases	66
Gelatinases.....	67
Estromalisina.....	68
Outras metaloproteínas	68
MMP secretada.....	69
Metalopeptidase MepB.....	70
As desintegrinas e metaloproteína (ADAM)	70
Desintegrina 10.....	70
Desintegrina 12.....	71
Desintegrina 15.....	72
Caspases.....	72
Caspase 2.....	72
Caspases 6 e 7.....	73
Caspases 9.....	74
Caspases 8 e 10.....	74
Neuromedina U.....	75
Outras proteínas.....	76
1-álquil-2-acetilglicerofosocolina esterase	76
Conclusão.....	77
Referências Bibliográficas.....	78
Tabelas suplementares	93
Figuras suplementares	120

Introdução

Taxonomia dos Myliobatiformes

As arraias são animais da classe dos Chondrychthyes, que constituem um grupo predominantemente marinho, esse nome se dá pelo seu esqueleto cartilaginoso. Juntamente com os tubarões, as arraias são pertencentes à subclasse Elasmobranchii. Porém, estas se diferenciam dos mesmos por apresentarem corpos achatados dorsiventralmente, com nadadeiras peitorais, boca e fendas branquiais localizadas na parte ventral, além de olhos e espiráculos localizados no topo da cabeça na parte dorsal (Rosa, 1985). Na ordem dos Myliobatiformes estão as arraias chamadas de arraias-de-ferrão, onde predominam umas das características mais importantes, calda com presença de um ou mais ferrões retrosserilhados na porção dorsal (Rosa, 1985) (Figura 1).



Figura 1. Extração do ferrão da arraia da espécie *P. falkneri*. Foto tirada por Nelson Júnior (2012).

Estes ferrões consistem em estruturas rígidas que são derivadas de denticulos dérmicos recobertos por um epitélio rico em células produtoras de toxinas (Figura 2) (Haddad *et al.*, 2004). As arraias são animais bentônicos, ficando geralmente no fundo de rios, mares e lagos (Haddad *et al.*, 2004).

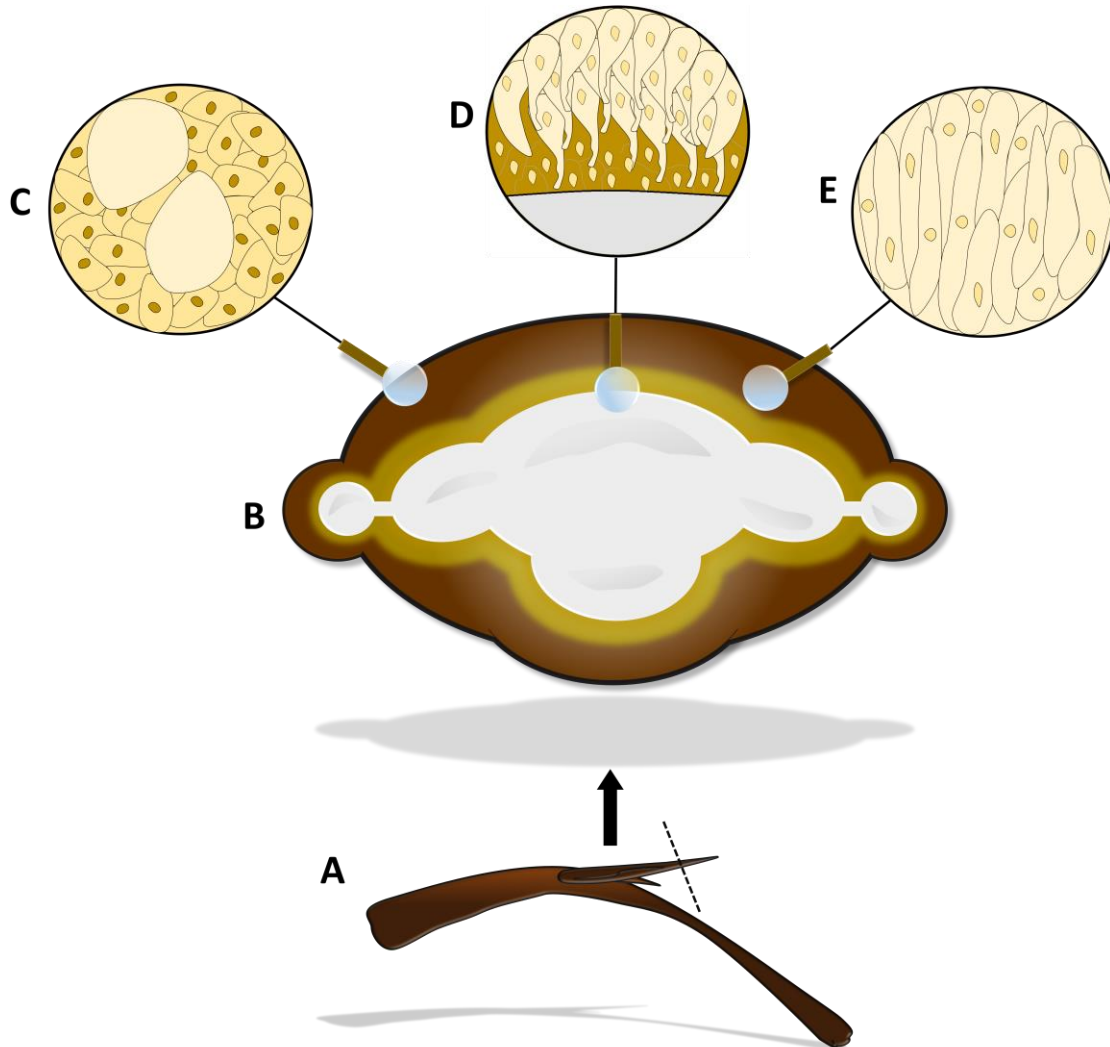


Figura 2- Figura esquemática demonstrando a anatomia de um corte transversal do ferrão. A. Cauda com ferrão indicando sentido do corte. B. Ferrão em corte transversal mostrando região mineral no centro e as glândulas produtoras de peçonha recobrimdo o mesmo. C. Organização das células epiteliais com a presença de glândulas produtoras de muco. D. Organização das células produtoras de peçonha alongadas e compactadas em volta da região óssea do ferrão. E. Distribuição das glândulas produtoras de peçonha.

A família Potamotrygonidae pertence à ordem Myliobatiformes podendo suas espécies e gêneros serem marinhas ou fluviais. Esta família pode ser dividida em cinco gêneros: *Heliotrygon*, *Paratrygon*, *Plesiotrygon*, *Teaniura* e *Potamotrygon* (Figura 3). Estas espécies têm sido encontradas em todo litoral brasileiro, sendo que as de água doce são encontradas com maior frequência em rios das regiões Norte e Centro-Oeste. O gênero *Potamotrygon*, como atualmente reconhecido, tem sido representado por 16 a 18 espécies (Rosa, 1985). No entanto, algumas espécies com ampla distribuição geográfica podem ser subdivididas em novas espécies (ex. *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon orbignyi*) (Rosa, 1985). Estas espécies bentônicas possuem um longo apêndice caudal semelhante a um chicote, onde estão localizados de um a quatro ferrões ósseos serrilhados, recobertos por um epitélio glandular, cujas células produzem peçonha (Compagno and Roberts, 1982).

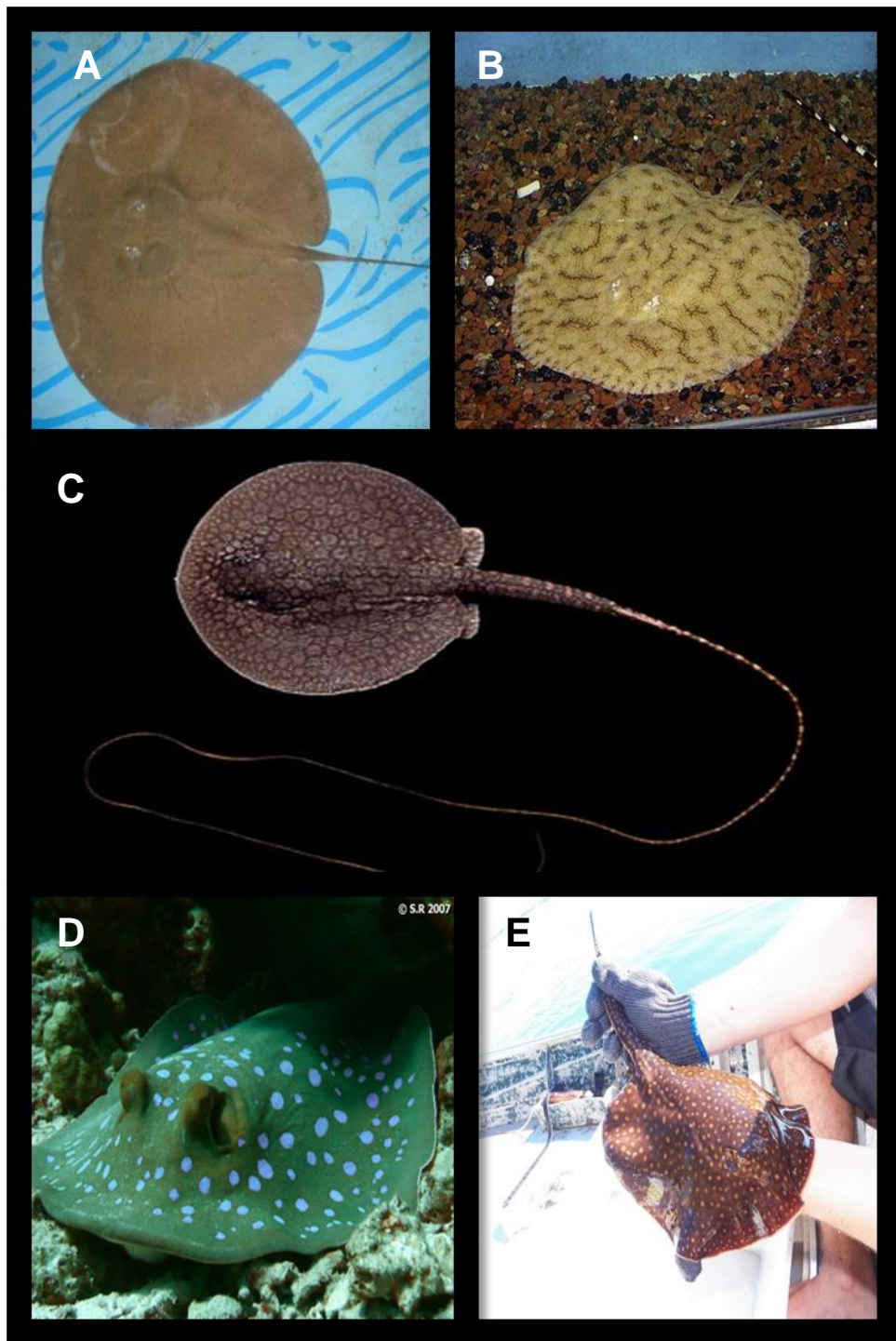


Figura 3- Exemplos e representantes dos diferentes gêneros de arraias até hoje descritos dentro da família Potamotrygonidae. A. *Heliotrygon gomesi* (http://www.wikepeixes.com.br/especies:heliotrygon_gomesi). B. *Paratrygon aiereba* (<http://rochen.chapso.de/paratrygon-aiereba-s235085.html>). C. *Plesiotrygon nana* (<http://www.roggenforum.nl/viewtopic.php?f=58&t=4482>). D. *Teaniura lymma* (<http://pourquoi-je-plonge-en-bretagne.over-blog.com/40-index.html>) e E. *Potamotrygon falkneri* (Foto de Nelson Gomes). As figuras A, B, C e D foram modificadas da internet.

Epidemiologia de peixes dulciaquícolas

Acidentes em humanos provocados por animais marinhos ou fluviais são comuns e podem ser observados em numerosas situações. Esses acidentes são causados por dentes com capacidade de lacerar, como se observa nas mordidas de piranhas ou por dentes perfurantes (serpentes peçonhentas, em que estes agem ainda como instrumentos de inoculação) e ferrões, estruturas ósseas comuns nos peixes da ordem Siluriformes e Myliobatiformes. A maioria dos acidentes ocorrem com pescadores, que podem necessitar de longos períodos para restabelecimento, permanecendo dias sem poder trabalhar, causando-lhes dificuldades socioeconômicas (Haddad *et al.*, 2004).

Para o Pantanal, apesar do alto atrativo turístico e potencial de captura de peixes nobres como pacu (*Piaractus mesopotamicus*), surubim (*Pseudoplatystoma* spp.), dourado (*Salminus brasiliensis*), jaú (*Zungaro jahu*), piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), piraputanga (*Brycon hilarii*), barbado (*Pinirampus pinirampu*), jurupoca (*Hemisorubim platyrhinchos*), jurupencem (*Sorubim lima*) e outros, não há relato de estudos sobre acidentes traumatizantes causados por animais em pescadores da região. Muitas dessas espécies, junto da abundância de piranhas (subfamília Serrasalminae), traíras (*Hoplias malabaricus*), arraias (*Potamotrygon* spp.) (Figura 4), mandis (*Pimelodus* spp., *Pimelodella* spp. e *Rhamdia* spp.), armaus (família Doradidae), cascudos (família Loricadae) e outros, são capazes de provocar acidentes graves por ferrões ou mordidas (Haddad *et al.*, 2004).

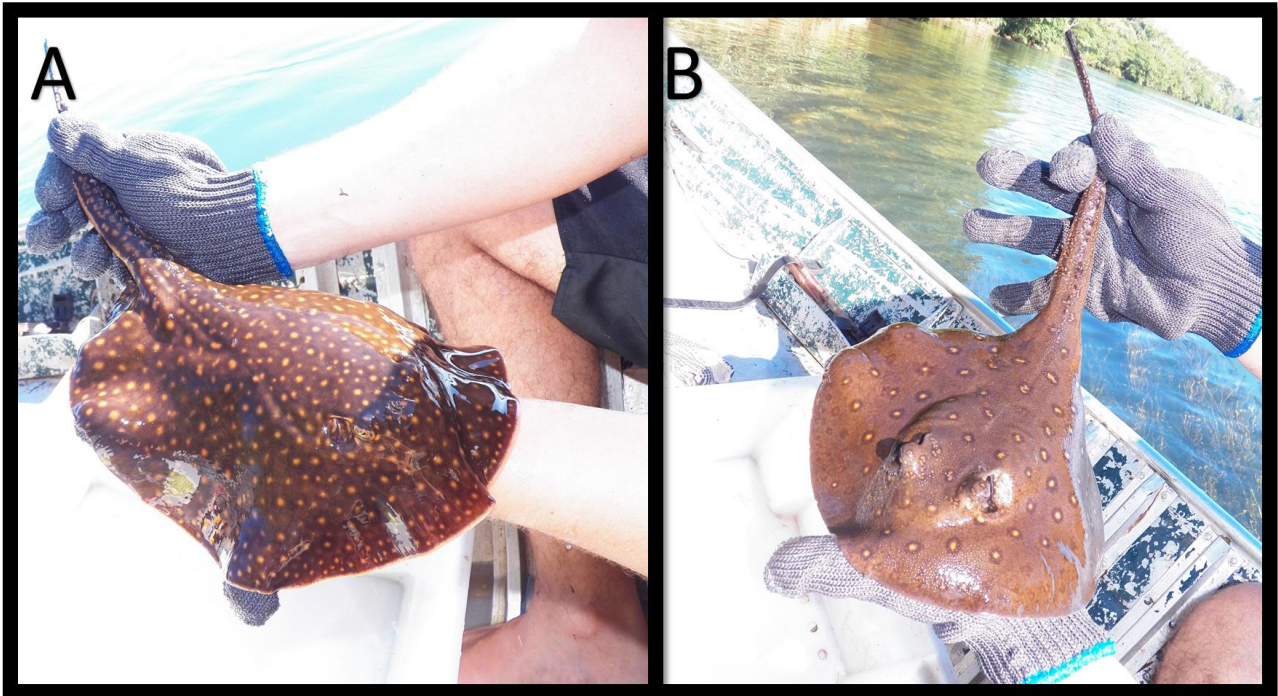


Figura 4. Exemplos de duas espécies do gênero *Potamotrygon*. A. Espécie *Potamotrygon falkneri*. B. Espécie *Potamotrygon motoro*. (Foto por Nelson Júnior)

A ocorrência de acidentes por animais aquáticos tem sido mal mensurada em todo o mundo. A maior parte dos dados disponíveis é regional e completamente esporádica. Por exemplo, somente durante o veraneio/2010 (02 de julho a 1º de agosto 2010), foram registrados, pelo Corpo de Bombeiros Militar do Pará, cerca de 480 acidentes com animais marinhos e de rios, representando um aumento em 7% da ocorrência em comparação a 2009 (Jornal de Capanema, 03/08/2010, <http://paulovasconcellospv.blogspot.com/2010/08/divulgados-numeros-finais-da-operacao.html>).

Quando se avalia o número de acidentes ocasionados por arraias, estes números se tornam ainda mais restritos, pois, pouco tem sido documentado. Geralmente esses acidentes são observados regionalmente, não tendo assim um dado sólido real no Brasil. O estudo mais recente feito por Garrone (2010) relata acidentes com 31 pessoas na região do Alto Rio Paraná na região sudeste do Brasil no período de 2004 a 2009, porém somente 16 vítimas foram encontradas em uma busca ativa. Vale ressaltar que nenhum desses casos foi registrado em nenhum posto de saúde da região. Todas as vítimas relataram

sintomas iguais aos descritos por Haddad (2004), e somente em um caso em particular se observou a necrose de parte de um membro.

As manifestações clínicas mais observadas em acidentes por arraiais e peixes dulciaquícolas se dão pelo desencadeamento de processos dolorosos e lesões, podendo chegar até a úlceras e necrose da área atingida (Haddad *et al.*, 2004). A peçonha da arraia também pode causar sintomas como vômitos, convulsões e paralisia do membro afetado (Fenner *et al.*, 1989).

Nos acidentes provocados por arraiais de água doce, as vítimas também relatam dor intensa e queimação (Haddad *et al.*, 2004). Sinais de eritema, edema e diferentes graus de sangramento ao redor do local da ferroadada aparecem na primeira fase do envenenamento, seguida de uma necrose cianótica central, frouxidão tecidual e formação de uma úlcera de coloração rosada que evolui lentamente, característico desse tipo de envenenamento (Haddad *et al.*, 2004). A peçonha das arraiais de água doce pode causar sintomas sistêmicos, como vômito, convulsões, edema generalizado, paralisia do membro afetado, hipotensão e bradicardia (Fenner *et al.*, 1989).

Abordagem transcritômica como ferramenta na descoberta de novas ferramentas terapêuticas

Mais recentemente, a possibilidade de utilizar estratégias modernas de biologia molecular para clonagem, mutagênese dirigida e expressão de genes que codificam para toxinas específicas ou fragmentos de genes, visando à utilização das toxinas produzidas para verificar sua interação com canais iônicos, tem despertado o interesse de praticamente todos os grupos de pesquisa que estudam toxinas animais .

A grande quantidade de informações fornecidas por cada um desses métodos isoladamente e o cruzamento dos dados obtidos por cada um deles para uma mesma substância tem facilitado o trabalho de detecção, purificação e elucidação estrutural de peptídeos e polipeptídeos. Esses métodos têm sido utilizados principalmente por químicos, biólogos, bioquímicos e farmacólogos, com destaque para aqueles envolvidos em investigações de compostos biologicamente ativos, geralmente produtos naturais. As necessidades e

urgências nos estudos de produtos naturais têm exigido inovações tecnológicas dos métodos físicos de análise (Magalhaes *et al.*, 2006).

Somente uma pequena porcentagem das macromoléculas de origem animal já foi estudada no sentido de elucidação estrutural de algumas de suas moléculas principais. Considerando-se as diferentes fontes de produtos naturais disponíveis (microrganismos, flora e fauna), verifica-se que pouquíssimo desse enorme "estoque" natural de substâncias é conhecido. Muitas dessas moléculas podem vir a ser valiosas na medicina humana, veterinária, na agricultura, etc. Com as constantes mudanças promovidas pelo homem nos sistemas ecológicos do planeta, esse magnífico estoque de substâncias e material genético pode estar se perdendo. Assim, o processo de descoberta de novas substâncias deve ser acelerado, sem prejuízo para a diversidade biológica. Para isso, este arsenal de métodos de caracterização química deve ser usado com sabedoria. O uso combinado de abordagens proteômicas, genômicas e transcritômicas tem contornado obstáculos tecnológicos e reduzido à necessidade de grandes quantidades de material biológico de maneira racional e inteligente.

Técnicas de caracterização química de proteínas, como a espectrometria de massa, são métodos utilizados para identificar proteínas em misturas complexas, como tecidos, fluídos biológicos ou organelas. Análises dos transcritos (RNAm), ou transcritoma, sugerem quais proteínas estão sendo expressas em um determinado tipo de célula ou tecido (Magalhaes *et al.*, 2006; Rabilloud, 2002). Análises dos transcritos de glândulas de peçonha já foram realizadas em serpentes e outros animais, porém, ainda não foi descrito para araias. Nesses estudos, o conhecimento sobre a composição das peçonhas dos animais investigados, bem como sobre a diversidade de estruturas de seus componentes foi grandemente ampliado, reforçando a utilidade dessa estratégia na prospecção de produtos naturais.

Análises transcritômicas de glândulas de peçonha de animais

Escorpiões

Com o advento da tecnologia de sequenciamento de última geração, um amplo espectro para análises se abriu no meio científico. Com esse advento, as pesquisas com venenos ou peçonhas de animais de várias espécies também sofreriam um grande avanço, a transcritômica, então, veio como uma importante ferramenta para análises de glândulas de peçonhas de animais, tais como, escorpiões, aranhas, serpentes e também de insetos.

Peçonhas de escorpiões vêm sendo estudadas durante anos, identificando centenas de proteínas que possuem um grande potencial médico e farmacológico, entretanto, ainda usa-se pouco destas ferramentas, em especial quando se trata de aspectos evolutivos e celulares. Peçonhas consistem em uma importante característica atribuída a esses animais, que se tornaram cruciais na luta pela evolução dos escorpiões por mais de 400 milhões de anos (Ma *et al.*, 2012). Nesse contexto, Ma e colaboradores (2012) estudaram a evolução do arsenal de proteínas e peptídeos dos escorpiões da família Buthidae e Euscorpidae. Quinze classes, incluindo peptídeos e proteínas foram sequenciados através da plataforma ABI3730 *automated sequencers* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), durante as análises da glândula de peçonha de duas espécies de Buthidae (*Lychas mucronatus* e *Isometrus maculatus*) e uma espécie de Euscorpidae (*Scorpiops margerisonae*). Uma grande diversidade vem sendo observada após a tradução de seqüências de aminoácidos desses transcritos para proteínas e peptídeos, nesse aspecto, sete classes de proteínas e peptídeos foram compartilhadas entre os Buthidae e Euscorpidae. As análises de filogenia molecular revelaram que, pelo menos cinco das sete classes de proteínas/peptídeos que se mostraram comuns aos 2 grupos, provavelmente foram recrutadas para o conteúdo proteômico dessas duas linhagens de escorpiões, muito antes da divisão entre Buthidae e Euscorpidae, com seus genes correspondentes passando por eventos de duplicação de genes individuais ou múltiplos (Ma *et al.*, 2012). Os peptídeos e proteínas relatados

são: α -KTxs, β KSPNs (β -KTxs e scorpines), peptídeos aniônicos, peptídeos La1-like, e *scorpion venom serin proteases*-SPSVs (proteínases serínicas de peçonha de escorpião). Vários tipos de peptídeos e proteínas da peçonha demonstraram ser continuamente recrutados para o proteoma durante o processo de evolução individual da linhagens de escorpião. Para tanto, os resultados fornecem pela primeira vez uma visão sobre o padrão de recrutamento do arsenal da peçonha de escorpião (Ma *et al.*, 2012).

Dando continuidade aos trabalhos realizados com glândula de peçonha de escorpião, outra família de escorpiões também foi analisada a partir do seu transcritoma. A família Chaerilidae é filogeneticamente distinta dos Buthidae, seus componentes da peçonha ainda são desconhecidos, assim como a evolução da sua peçonha. Neste aspecto, He e colaboradores (2013) estudaram, por meio de análises transcritômicas, a glândula da peçonha de duas espécies de escorpião da família Chaerilidae (*Chaerilus tricostatus* e *Chaerilus tryznai*). Nesse estudo, quatorze classes de peptídeos foram descobertos para as duas espécies, sendo que, dez peptídeos foram compartilhados entre essas duas espécies. Particularmente, para as peçonhas de Chaerilidae foram encontrados quatro classes de peptídeos (NaTx, β -KTx, Scamp e peptídeos bpp-like), que anteriormente pensava-se serem específicos da família Buthidae (He *et al.*, 2013b). Além disso, os peptídeos mais abundantes encontrados para *C. tricostatus* e *C. tryznai*, foram peptídeos citolíticos. Entretanto 39 e 35 novas moléculas atípicas foram identificadas para *C. tricostatus* e *C. tryznai*, respectivamente. Por fim, uma análise evolutiva indicou que os peptídeos NaTx, β -KTx, e bpp-like toxin foram recrutados para o proteoma da peçonha dessas espécies antes da separação das famílias dos Buthidae e os não-Buthidae (He *et al.*, 2013b). Este estudo forneceu um melhor entendimento da família Chaerilidae e mostrou que essa família possui arsenal proteômico específico que é intermediário entre os Buthidae e os não-Buthidae. Tais afirmações sugerem uma evolução dinâmica dos componentes da peçonha de escorpião das espécies avaliadas (He *et al.*, 2013b).

No trabalho desenvolvido por Rendon-Anaya e colaboradores (2012) foi realizado um estudo de análises transcritômicas de um escorpião mexicano da espécie *Centruroides noxius* Hoffmann, utilizando uma plataforma de pirosequenciamento por 454 através das plataformas GS20, GS-FLX e FLX-

Titanium. Neste trabalho, três formas distintas de experimentos de sequenciamento foram realizadas, utilizando três bibliotecas de cDNA diferentes construídas de RNA extraídos também de três maneiras diferentes, uma utilizando todo o corpo do escorpião após a extração do telson, e as outras duas formas utilizaram a extração da glândula de peçonha em dois momentos distintos; primeiramente sem a retirada da peçonha e em outro momento foi realizado após a extração da peçonha. Mais de três milhões de sequências foram obtidas dessas análises e quase 19,000 iso-grupos foram obtidos. Nos resultados para as sequências obtidas específicas para o telson, 72 iso-grupos (um total de 0,4% das transcrições originais) foram encontrados apresentando similaridades com toxinas já descritas anteriormente em outras espécies de escorpiões, além de espécies de anêmonas do mar e também de aranhas. Para sequências do corpo inteiro do escorpião sem o telson foram obtidas 777,532 sequências, entretanto para o telson ativo (onde a peçonha foi retirada e foi aguardado 5 dias para extração de RNA) foram obtidas 981,028 sequências e para o telson sem a retirada da peçonha foram obtidas 1,249,489 sequências. Após as análises, foram identificadas proteínas de várias classes diferentes, dentre elas, toxinas que se ligam a canais iônicos específicos, metalo-proteínases dependentes de zinco, fosfolipases, proteínases serínicas, lipases, peptídeos antimicrobianos e outros componentes da peçonha. Uma análise filogenômica de genes realizada demonstrou uma taxa de evolução na espécie em estudo, principalmente em proteínas ribossomais e componentes do proteossoma. Além disso, uma análise estatística de comparação de abundância de transcritos realizada para as amostras antes e depois da extração da peçonha do telson mostrou que 3% e 2% dos transcritos montados tiveram um aumento de expressão no telson ativo e no telson em descanso, respectivamente. Portanto, as estratégias de sequenciamento e de anotações utilizadas forneceram uma visão global dos processos celulares e moleculares que ocorrem nesses artrópodes. Adicionalmente, essas análises podem fornecer dados de respostas regulatórias e metabólicas relacionadas à produção da peçonha do escorpião.

Outro trabalho também realizado com um escorpião mexicano endêmico do estado de Colima, a espécie *Centruroides tecomanus*, um grande causador de acidentes nessa área, foi realizado por Valdez-Velázquez e colaboradores

(2013). Nesse trabalho foram utilizados para as análises transcritômicas e construção da biblioteca de cDNA dois pares de glândulas de peçonha do escorpião, a partir da biblioteca vários clones foram escolhidos, a partir do qual, 130 sequências foram identificadas e agrupadas em 28 *contigs* contendo cada um dois ou mais *expressed sequence tags* (ESTs) e 49 *singlets* com apenas uma EST. As análises de sequências mostraram que dentre os 53% de transcritos encontrados para toxinas, 81% que correspondem a 24 sequências, que são semelhantes a peptídeos tóxicos que afetam a atividade dos canais de sódio (Na⁺), enquanto os outros 19% das sequências (7 sequências) são similares a toxinas específicas atuantes nos canais de potássio (K⁺), o restante das sequências estão relacionadas a sequência de processos celulares, peptídeos antimicrobianos e proteínas sem função definida (Valdez-Velazquez *et al.*, 2013). Esses resultados confirmam e corroboram o perigo dessa espécie de escorpião para humanos residentes nessa região do México.

Aranhas

Trabalhos realizados com aranhas também vêm recebendo um enfoque das técnicas de transcrito. Um trabalho foi desenvolvido por He e colaboradores (2013), com a glândula de peçonha da aranha *Latrodectus tredecimguttatus*, que é comumente chamada de viúva negra, e também é bem conhecida por sua picada altamente perigosa. Apesar da peçonha desta espécie vir sendo incansavelmente estudada e caracterizada, algumas questões fundamentais ainda não foram esclarecidas (He *et al.*, 2013a). Neste estudo foram combinados o sequenciamento de nova geração e o sequenciamento convencional de DNA para a elaboração do transcrito da glândula de peçonha dessa espécie de aranha. Análises resultaram em uma identificação de 9,666 e 480 transcritos de alta confiabilidade dentre as 34,334 sequências e 1, 024 sequências de cDNA respectivamente, através de montagem, tradução, filtragem, a quantificação e anotação (He *et al.*, 2013a). Uma análise funcional dos transcritos identificados indicaram que os mRNAs envolvidos no transporte do RNA e spliceossomo, bem como, tradução de proteínas, processamento e transporte são altamente enriquecidos na glândula, o que é consistente com a função específica das glândulas de peçonha, ou

seja, produção de toxinas. Além disso, foram identificadas 146 proteínas distribuídas em 12 famílias, dentre essas, 6 famílias novas de proteínas foram identificadas nesta aranha, onde, a família 2 de α -LTX-Lt1a é a primeira identificada como uma subfamília das α -LTX-Lt1a (He *et al.*, 2013a). As proteínas foram classificadas de acordo com suas atividades em cinco categorias. Interessantemente, poucos canais iônicos são expressos pelas glândulas de peçonha, sugerindo um possível mecanismo de proteção contra o ataque de suas próprias proteínas, o estudo por fim, forneceu um perfil transcritômico da glândula e ampliou nossa compreensão toxinômica de aranhas e mostrou um mecanismo de coordenação para produção de toxinas em quantidade de expressão proteica (He *et al.*, 2013a).

Peçonhas de aranhas possuem um amplo repertório em sua composição, quando se trata de peptídeos bioativos (Jiang *et al.*, 2013). Uma das grandes importâncias para a aranha em possuir esta gama de toxinas se deve ao fato de que as aranhas devem ser capazes de capturar animais terrestres para sua alimentação, além disso, elas devem também ser capazes de se defender contra predadores. Nesse contexto, o entendimento da ação da peçonha da aranha em animais terrestres se mostra amplo, por outro lado, a ação dessa peçonha em peixes ainda é pouquíssimo conhecida, uma vez que poucas aranhas são predadoras de peixes (Jiang *et al.*, 2013). Um trabalho desenvolvido por Jiang e colaboradores (2013), deu enfoque em uma espécie de aranha, onde sua principal presa são peixes. A aranha utilizada no estudo é a aranha da espécie *Dolomedes mizhoanus*, e neste trabalho um total de 356 ESTs de alta qualidade foram obtidos e analisados a partir da biblioteca de cDNA das glândulas da peçonha dessa espécie. Esses transcritos foram posteriormente classificados em 45 *clusters* (19 *contigs* e 26 *singletons*), sendo que sua grande maioria era composta por *cystine knot toxins* (CKTs) e *non-CKTs*. Os ESTs que codificaram 53 novos precursores de CKTs foram abundantes nas glândulas de *Dolomedes mizhoanus*, correspondendo cerca de 76 % do total de ESTs, os precursores foram agrupados dentro de seis famílias baseados em análises de identidade das sequências e de análises filogenéticas, além disso, os *non-CKTs*, que corresponderam 21% do total de ESTs foram agrupados entre termos de ontologia gênica e grupos ortólogos eucarióticos (Jiang *et al.*, 2013). Esse trabalho mostrou até hoje o maior

conjunto de ESTs (273 ESTs) de uma espécie de aranha no que diz respeito a precursores de CKTs (55 precursores), mostrando que os resultados podem contribuir para um melhor entendimento das peçonhas de aranhas e também na descoberta de novos fármacos em potencial, além de mostrar uma relação evolutiva das toxinas das aranhas (Jiang *et al.*, 2013).

Abelhas e Formigas

Insetos são os seres mais abundantes da terra, muitos deles apresentam uma glândula produtora de peçonha que serve para proteção contra predadores e captura de presas, entretanto os estudos com insetos na área de transcritômica também são extremamente escassos. Neste contexto, Liu e colaboradores (2012) realizaram um estudo com a espécie *Scolopendra subspinipes dehaani*, um quilópode dotado de glândulas produtoras de peçonha no seu primeiro par de membros. Esses animais possuem peçonhas com uma gama de componentes com diferentes propriedades químicas e farmacológicas, no entanto, o conhecimento sobre a composição e função de seus componentes, em sua grande parte ainda é desconhecida. O estudo realizado por Liu (2012) avaliou sistematicamente por meio de análises transcritômicas aliada a proteômica e ensaios de função biológica, a peçonha e suas glândulas produtoras. Após um rastreio, aproximadamente 1,500 clones independentes, 1,122 sequência completas de cDNA que codificam 543 proteínas diferentes foram clonadas de uma biblioteca de cDNA, utilizando as glândulas de peçonha da espécie em estudo (Liu *et al.*, 2012). As principais proteínas reveladas pelas análises transcritômicas foram as neurotoxinas, componentes de atuação em canais iônicos, e alérgenos. Além disso, as análises farmacológicas indicaram a atividade de várias outras proteínas de interesse farmacológico como, por exemplo, fosfolipases A2, atividades anticoagulantes, agregação plaquetária, entre outras (Liu *et al.*, 2012). A maior parte das identificações não mostrou nenhuma semelhança significativa com outras sequências de proteínas depositadas na base de dados públicos. Este trabalho por sua vez apresentou pela primeira vez a natureza das toxinas da lacraia *S. subspinipes dehaani* (Liu *et al.*, 2012).

Há ainda pouca informação disponível sobre a composição da peçonha das formigas, mesmo elas sendo um representante do maior e mais diverso grupo zoológico do planeta (Bouزيد *et al.*, 2013). Bouزيد e colaboradores (2013) executaram um trabalho com a espécie de formiga *Tetramorium bicarinatum*, começando por uma seleção randômica de 400 clones de uma biblioteca de cDNA, onde foram sequenciados um total de 364 ESTs de alta qualidade. Baseados nos dados obtidos que foram previamente analisados utilizando o software BLAST, essas sequências foram agrupadas e montadas em 83 *contigs* (22 de sequência múltipla) e 61 *singletons* (Bouزيد *et al.*, 2013). Cerca de 74% dos *contigs* combinados no BLASTx tiveram uma diversidade interessante relatando a expressão gênica e a regulação (29%), refletindo assim, a especialização deste tecido na formiga. Adicionalmente, cerca de 18% dos ESTs foram classificados como componentes de peçonhas de Hymenoptera, e sua maior parte (62%) representando compostos alergênicos, além disso, cerca de 26% das sequências não possuíam nenhuma semelhança com sequências conhecidas (Bouزيد *et al.*, 2013). Portanto, esse estudo forneceu uma visão primária da glândula de peçonha de *T. bicarinatum* contribuindo para uma futura exploração mais abrangente sobre a origem e diversidade dessas proteínas produzidas por essas formigas e de uma forma mais ampla para os himenópteros (Bouزيد *et al.*, 2013).

Serpentes

Trabalhos também de grande relevância com peçonhas de animais são os trabalhos com as serpentes. Peçonhas de serpentes tem um impacto significativo sobre populações humanas, devido a morbidade e mortalidade associadas às picadas por serpentes, por outro lado, também possuem importância na área médica, pois, peçonhas de serpentes são uma fonte enorme de ferramentas farmacológicas (Rokyta *et al.*, 2012). Peçonhas de serpentes geralmente apresentam uma grande variação entre e dentro das espécies. Neste sentido, algumas cascavéis sofreram mudanças extraordinariamente rápidas no que se trata de composição, letalidade, e, sobretudo farmacologia das suas peçonhas (Rokyta *et al.*, 2013). Tais mudanças ocorreram dentre diversas espécies, principalmente em Mojave com

as *Caudisona scutulatus*, as sul-americanas (*Caudisona durissus*), e cascavéis madeira (*Caudisona horridus*), tais diferenciações resultaram em populações de cascavéis com peçonhas extremamente potentes, neurotóxicas e sem os efeitos clássicos de hemorragia que são ligados às peçonhas de serpentes (Rokyta *et al.*, 2013). Para um melhor entendimento das modificações evolucionárias que ocorreram com as serpentes resultando em uma peçonha de grande potência, Rokyta e colaboradores (2013) realizaram um estudo com a serpente *C. horridus* que habita o nordeste da Flórida.

A glândula de peçonha desta serpente foi sequenciada em comparação com um trabalho anteriormente realizado que descrevia as análises do transcrito da glândula de peçonha da espécie *Caudisona adamanteus* que é uma congênera com uma peçonha de cascavel mais tipicamente visualizada. Os transcritos de *C. adamanteus* analisados consistiam principalmente de metaloproteinases, lectinas tipo C, proteinases séricas e miotoxina A, por sua vez, os transcritos encontrados na *C. horridus*, eram bem mais simples em sua composição, onde, consistiu basicamente de proteinases séricas, fosfolipases A2, potencializador de bradicinina e peptídeos natriuréticos tipo C. Curiosamente, nos transcritos da serpente *C. horridus*, não estavam presentes metaloproteinases hemorrágicas e nem lectinas tipo C. Pode-se observar então que, a evolução das famílias de toxinas compartilhadas envolvem expansão diferencial e a perda de classes de toxinas dentro de cada espécie, indicando uma diferença nos parálogos de toxinas altamente expressos, os genes de toxinas mostraram taxas significativamente maiores em substituição não-sinônimas do que em genes que não são de toxinas. Portanto, os padrões de genes codificantes de moléculas não tóxicas se mostraram conservados entre as espécies apesar de uma enorme diferença entre os genes codificantes de proteínas tóxicas (Rokyta *et al.*, 2013). Por fim, o trabalho representa a primeira comparação completa baseada em sequências entre peçonhas de serpentes de espécies estreitamente relacionadas, mostrando sem precedentes a rápida evolução das peçonhas de serpentes, assim, os resultados mostram as alterações maciças na genética do fenótipo da peçonha, enfatizando a instabilidade evolucionária e flexibilidade desta característica ecologicamente crítica (Rokyta *et al.*, 2013).

Outro trabalho visando analisar o transcrito de glândulas de peçonha de serpentes, desenvolvido por Rokyta e colaboradores (2012), descreveram análises de montagem *de novo* do transcrito da glândula da serpente *C. adamanteus* (a espécie mais perigosa e endêmica dos Estados Unidos da América), baseando em 95,643,958 pares de alta qualidade, e leituras com tamanho de 100 pares de bases gerados pelo equipamento Illumina. Foram identificadas 123 sequências de proteínas que foram reunidas em 78 grupos com uma divergência de menos de 1% de nucleotídeos e 2,879 sequências não pertencentes a toxinas. Onde, as sequências de toxinas foram responsáveis por 35,4% do total de leituras. As proteínas mais expressas identificadas foram pequenas miotoxinas relacionadas a crotaminas que representam 5,9% do total de leituras. As metalo-proteinasas são responsáveis pela maior porcentagem do mapeamento das classes das toxinas correspondendo 24,4%, seguido das lectinas tipo C com 22,2% e proteinasas-séricas com 20%. As classes de toxinas mais diversas foram as lectinas tipo C (21 clusters), as metalo-proteinasas de peçonha de serpente (16 clusters), e as proteinasas séricas (14 clusters) (Rokyta *et al.*, 2012). A maior abundância de transcritos de proteínas não tóxicas foram relacionadas a proteínas de dobramento e tradução (Rokyta *et al.*, 2012).

Trabalhos comparando a diferença entre o conteúdo da peçonha dentro de uma mesma espécie, porém com idades diferentes foram realizados. Envenenamento por serpentes é um problema de saúde pública negligenciado em vários países, principalmente em áreas rurais (Zelanis *et al.*, 2012). A espécie *Bothrops jararaca*, causa grandes acidentes por todo o Brasil, e estudos anteriores já demonstraram a atividade farmacológica exibida pela sua peçonha, mostrando também uma variação dessa atividade de acordo com a ontogenicidade, apesar de similares o proteoma de indivíduos jovens e adultos possuem uma diferença significativa, devido a sua dieta associada quando jovem (animais ectodérmicos) e adultos (animais endotérmicos). Levando isso em consideração, os soros fabricados para indivíduos adultos são pouco efetivos no tratamento com acidentes de indivíduos jovens. Devido a esse fato, Zelanis e colaboradores (2012) realizaram um trabalho de comparação entre glândulas de peçonha da espécie *B. jararaca*, de indivíduos adultos e indivíduos jovens. Foram avaliadas as bibliotecas de cDNA de ambos, para tal,

as análises revelaram que a variação entre os transcritomas das glândulas de *B. jararaca* adultos e jovem é quantitativa, indicando uma maior quantidade de metaloproteinases em indivíduos jovens. Nos adultos, entretanto, o teor de precursores de metaloproteinases diminuíram drasticamente, contudo houve um aumento no número de transcritos para proteinases serínicas, lectinas tipo C e peptídeos potencializadores de bradicinina (Zelanis *et al.*, 2012). Além disso, comparando as ESTs que codificam toxinas em machos adultos e em fêmeas adultas também apresentaram diferenças relacionadas com o gênero, por fim, deve-se dar mais atenção a certas diferenças ontológicas dentro de uma mesma espécie quando se trata de estudos relacionados às atividades farmacológicas (Zelanis *et al.*, 2012).

Assim como trabalhos com transcritômica utilizando plataformas de sequenciamento de última geração são utilizados para Viperídeos, essas plataformas também vêm sendo utilizadas para estudo de Elapídeos. Kraits (Gênero *Bungarus*) e cobras (Gênero *Najas*) são dois representantes dos elapídeos do “Velho Mundo”. Entretanto, os dois gêneros possuem uma relação de gênero muito próxima e as peçonhas de ambos são extremamente perigosas, porém a composição é muito diferente, com o intuito de desvendar as suas peçonhas detalhadamente, assim como seus padrões evolutivos, bibliotecas de cDNA e a genômica do cromossomo artificial bacteriano (BAC) para *Bungarus multicinctus* e *Naja atra* foram construídos por Jiang e colaboradores (2011). Foram sequenciados cerca de 1,500 clones de cDNA para cada uma das bibliotecas de cDNA de peçonha, e rastreadas bibliotecas BAC das duas serpentes utilizando quatro tipos de sondas para toxinas [*three-finger toxin* (3FTx), fosfolipase A2 (PLA2), inibidor de proteinase do tipo Kunitz (Kunitz), e peptídeos natriuréticos (NP)] (Jiang *et al.*, 2011). Um total de 1,092 ESTs para *B. multicinctus* e 116 para *N. atra* foram gerados, 70% dessas ESTs podem ser descritas como proteínas de toxinas de peçonha de serpente. As 3FTx (64,5%) e as β -bungarotoxin (25,1%) compreenderam a maior parte das toxinas em *B. multicinctus*, enquanto para *N. atra*, as 3FTx (95,8%) foram as predominantes, além disso foram observadas várias proteínas menos abundantes em *B. multicinctus* e *N. atra*, tais como, PLA2, lectinas tipo C, e Kunitz, peculiarmente, um grupo de precursores de NPs, com NPs em sequência, foram encontrados em *B. multicinctus*. Um total de 71 clones

positivos para toxinas de *B. multicinctus* e *N. atra* foram identificados usando quatro tipos de toxinas prováveis (3FTx, PLA2, Kunitz, and NP), dentre estas, 39 BACs positivos para 3FTx foram sequenciados para revelar as estruturas gênicas para 3FTx (Jiang *et al.*, 2011). Baseados então nas ESTs de toxinas e nas sequências gênicas de 3FTx, os maiores componentes do transcrito da glândula de peçonha de *B. multicinctus* são neurotoxinas, incluindo as alfa neurotoxinas de cadeia longa (α -ntx) e as recentes β -bungarotoxinas, por outro lado, para o transcrito das glândulas de peçonha de *N. atra*, se observou principalmente 3FTx citotóxicas e α -ntx de cadeia curta neurotóxicas. Os dados obtidos também revelaram que não só famílias de toxinas multigênicas, mas também toxinas menos abundantes podem ter sido originadas em uma rápida diversificação evolutiva (Jiang *et al.*, 2011).

As serpentes corais são representadas por um grupo de três gêneros e mais de 120 espécies e subespécies que são capazes de causar grande morbidade e mortalidade, a peçonha da cobra coral ainda é pouco estudada em comparação com os elapídeos do “Velho Mundo”, porém, sequenciamentos de alto desempenho são capazes de identificar milhares de *locus* enquanto fornecem caracterizações de padrões de expressão e forças evolutivas moleculares que atuam dentro das glândulas de peçonha (Margres *et al.*, 2013). Neste contexto, Margres e colaboradores (2013) descreveram um estudo de sequenciamento *de novo* do transcrito da glândula de uma serpente coral *Micrurus fulvius*. Foram identificados nesse estudo 1,950 transcritos não tóxicos e 116 transcritos de toxinas, esses transcritos correspondem a 57,1% do total de leituras, com toxinas correspondendo a uma contagem de 45,8% do total de leituras. Dentre essas leituras, as fosfolipases A2 e as 3TFx somam 86% dos leituras de toxinas. Um total de 15 famílias foram identificadas, revelando uma complexidade anteriormente não conhecida para serpentes corais do “Novo Mundo” (Margres *et al.*, 2013). Os transcritos de toxinas mostraram um elevado nível de heterozigose em relação aos transcritos agentes não tóxicos e uma sobredominância que pode favorecer a duplicação gênica levando a fixação de alelos favoráveis (Margres *et al.*, 2013). Os resultados mostraram que as fosfolipases A2 estão distribuídas por toda a classe, enquanto as 3TFx são dominadas por várias transcrições e que também por uma análise filogenética foi capaz de mostrar que a divergência

das toxinas podem ter ocorrido após a especiação. Por fim, a seleção positiva foi detectada em três das quatro classes de toxinas mais diversas, o que sugere que a diversificação da peçonha é impulsionada por seleção direcional recorrente (Margres *et al.*, 2013).

Mamíferos

Somente cinco espécies de mamíferos são conhecidas por serem peçonhentos, enquanto vários estudos são desenvolvidos com peçonhas de répteis. Um trabalho de revisão desenvolvido por Whittington e colaboradores (2009) mostrou a importância de pesquisas com a glândula da peçonha de ornitorrinco, um mamífero australiano que faz postura de ovos. O estudo propôs uma análise transcritômica global de uma pequena amostra da glândula de peçonha em conjunto com técnicas proteômicas, propondo a elucidação de toda a gama de componentes da peçonha para este mamífero, com uma perspectiva dessa peçonha isolada do ornitorrinco ser utilizada como fonte para novas moléculas que possam ser utilizadas como novos fármacos (Whittington *et al.*, 2009).

Pouco se sabe sobre os estudos transcritômicos de animais monotremados (equidnas e ornitorrincos). Estes são mamíferos depositores de ovos, uma das características únicas desses animais é a presença de uma glândula de peçonha, somente nos machos e que são ativas sazonalmente (Wong *et al.*, 2013). Os ornitorrincos machos produzem peçonha na época da amamentação de suas fêmeas, esta peçonha é inoculada através de esporas e auxilia na competição contra outros machos (Wong *et al.*, 2013). As equidnas por outro lado não são capazes de levantar suas esporas, porém uma secreção leitosa é produzida durante a época de reprodução, a composição do veneno ainda é desconhecida. No trabalho desenvolvido por Wong e colaboradores (2013), eles compararam o transcritoma da glândula de veneno de um equidna durante a temporada crural ao de um ornitorrinco, procurando prováveis genes de venenos ou peçonhas com intuito de fornecer pistas sobre o papel do veneno do equidna na história evolutiva dos monotremados (Wong *et al.*, 2013). Foi descoberto pelo estudo que, os transcritos da glândula do equidna são notavelmente diferentes dos transcritos do ornitorrinco numa correlação

entre os 50 genes mais expressos, quatro peptídeos da peçonha do ornitorrinco foram encontrados também nos de equidna, entretanto esses genes não se mostram altamente expressos em equidna, sugerindo uma história evolutiva remanescente de ancestrais (Wong *et al.*, 2013). A ontologia gênica dos 100 genes mais expressos em equidna mostraram funções associadas a ácidos graxos e esteroides, sugerindo que o veneno de equidna pode desempenhar um papel na comunicação durante a estação reprodutiva. Por fim, a perda da força de erguer a espora e outras forças evolutivas desconhecidas que atuam na linhagem do equidna, resultou na decadência gradual dos componentes do veneno e incrementou a evolução de um novo papel para a glândula crural (Wong *et al.*, 2013).

Análises transcritômicas de animais peçonhentos aquáticos

Assim como a proteômica, trabalhos com a transcritômica de animais de ambientes aquáticos ainda são pouco abordados no meio científico. Contudo, um trabalho desenvolvido por Magalhães (2006) fez uma análise transcritômica da glândula de peçonha de um peixe brasileiro *Thalassophryne nattereri* (Niquim), utilizando bibliotecas de cDNAs e não por sequenciamento de RNAm total. A peçonha deste peixe apresenta características parecidas com envenenamento por arraias, que são caracterizados por formação de edema, nocicepção e efeitos citotóxicos e miotóxicos (Magalhaes *et al.*, 2006). Magalhães e colaboradores (2006) descreveram 516 sequências precursoras, das quais, 288 já foram encontradas em outras espécies, incluindo peixes. Das sequências encontradas cujas funções já foram descritas, somente 18,8% correspondem a toxinas, as demais estão subdivididas entre proteínas de metabolismo, transporte e outras. As proteínas chamadas de naterinas representam 18% do total de toxinas encontradas, representando a maior parte de proteínas contidas na peçonha do peixe (Magalhaes *et al.*, 2006). Três sequências de lectinas tipo c também foram encontradas. Essas proteínas são de origem animal, cálcio-dependentes, se ligam a carboidratos e estão envolvidas na organização da matriz extracelular, endocitose e mediação do reconhecimento de patógenos (Weis *et al.*, 1998). Além de sequências de chaperonas, tioredoxina, enzima que age na redução de sulfidril, foram

encontradas também sequências de clusterinas que consistem em um grupo de glicoproteínas secretadas no plasma, leite e urina. Apesar de sua função ainda não ser muito bem descrita, sabe-se que ela é capaz de formar complexos com lipídios e heparinas (Poon *et al.*, 2000). Apesar da técnica empregada ter sido eficaz, pouco se encontrou de toxinas responsáveis pelos danos causados pelo envenenamento desse peixe.

Caracóis aquáticos do gênero *Conus* também vêm atraindo a atenção de muitos pesquisadores devido a sua ampla gama de peptídeos, esses caracóis também podem se tornar um sistema de modelo de estudo da evolução das famílias multigênicas e diversidade (Pi *et al.*, 2006). Estes caracóis são os mais mortais em todo o planeta terra, onde, sem uma intervenção médica, 70 % dos casos de envenenamentos são fatais (Hu *et al.*, 2012). Apesar de a sua peçonha ser conhecida por sua ampla gama de peptídeos ligantes de canais iônicos e receptores de canais iônicos, a maior parte dos seus constituintes, seus locais de fabricação, sua abundância e como eles funcionam coletivamente, ainda permanecem desconhecidos (Hu *et al.*, 2012). Uma maior compreensão da evolução da especialização ecológica é de grande importância para fazer inferências sobre a biodiversidade. Os membros deste predador gastrópode exibem uma habilidade impressionante na captura de presas, onde, sua peçonha possui uma gama de toxinas neurotóxicas denominadas conotoxinas (Remigio and Duda, 2008).

Um estudo desenvolvido por Pi e colaboradores (2006) analisou um conjunto de 897 ESTs derivadas do ducto da peçonha da espécie *Conus litteratus*, a fim de esclarecer a diversidade e a evolução do mecanismo de ação das conotoxinas. Quase metade dessas ESTs representam sequências codantes de conotoxinas, as quais foram agrupadas em 42 novas sequências de conotoxinas (sete superfamílias), com a superfamília *T-superfamily* como a dominante. Mais estritamente, foi identificada uma nova superfamília de conotoxina. Esses resultados deram uma visão inicial do transcrito de *C. litteratus* que pode vir a contribuir para um melhor entendimento da evolução das conotoxinas (Pi *et al.*, 2006).

Um trabalho realizado por Remigio e Duda (2008), identificou conotoxinas da espécie *Conus leopardus*, que é uma espécie predadora exclusiva de hemicordados e comparou o seu transcrito do ducto de

peçonha com outras quatro espécies de *Conus*, para avaliar se uma dieta especializada também está associada às mudanças na composição da peçonha dessas espécies. Também foram avaliadas as estruturas secundárias das sequências de aminoácidos que foram previstos nas transcrições de conotoxinas de *C. leopardus* com finalidade de identificar mudanças que possam estar ligadas a essa dieta de hemicordados. Logo, foram identificadas sete sequências de conotoxinas distintos em *C. leopardus* que parecem representar setes locos distintos (Remigio and Duda, 2008). Os níveis de expressão e a diversidade de conotoxinas expressas nessa espécie de *Conus* são consideravelmente menores quando comparadas a outras espécies de *Conus*. Além disso os produtos dos genes de dois transcritos se apresentaram únicos para essa espécie, isso demonstra que uma restrição na dieta tem uma relação também em uma menor diversidade dos componentes das peçonhas de *Conus* (Remigio and Duda, 2008).

Hu e colaboradores (2012) usaram sequenciamento transcritômico para elucidar sistematicamente o conteúdo do ducto da peçonha da espécie *Conus geographus*, dividindo este ducto em quatro segmentos para se investigar os RNAs de cada segmento. Nesse âmbito, três tipos diferentes de canais de cálcio, e pelo menos dois receptores nicotínicos diferentes parecem ser alvos desses peptídeos. Além disso, o componente que se mostrou mais expresso não é paralisante, porém causa uma desorientação sensorial e foi expresso em um segmento diferente do ducto, ao qual se acredita causar uma disrupção sensorial, por outro lado, novas toxinas de interesse farmacológico para a pesquisa em neurociências também foram identificadas. Hu e colaboradores (2012) acreditam, através de seus dados, que a desorientação da presa é o foco central da estratégia de envenenamento uma vez que, o *C. geographus* caça se escondendo em fendas de recifes durante a noite, além disso, os resultados demonstrados sugerem que há uma estratificação da produção das toxinas dentro do ducto, com toxinas causadoras de paralisia e desorientação, sendo expressas em regiões diferentes. Sendo assim, as análises dos dados transcritômicos apresentados por Hu (2012) apresentam uma nova compreensão das estratégias moleculares de envenenamento nesses caracóis.

Conotoxinas vêm sendo investigadas ao longo das últimas décadas, entretanto pouco se sabe sobre uma abordagem geral de conopeptídeos e

proteínas, principalmente no âmbito do transcrito (Terrat *et al.*, 2012). Se a maioria dos estudos anteriores com foco em um número limitado de sequências tem contribuído para uma melhor compreensão das superfamílias de conopeptídeos, eles ainda não deram acesso ao panorama completo do ducto de peçonha, além disso, as transcrições raras geralmente não foram identificadas devido ao efeito de amostragem utilizado (Terrat *et al.*, 2012). O trabalho desenvolvido por Terrat e colaboradores (2012) apresenta dados da análise de um grande número de sequências obtidas de um sequenciamento por 454 de última geração, usando ductos de peçonha de *Conus consors*, um caracol piscívoro da região indo-pacífico. Um total de 213,561 sequências expressas (ESTs) com um comprimento médio de 218 pares de base (pb) foi obtido, estas leituras foram reunidas em 65,536 sequências de DNA contíguas (*contigs*), e em seguida, em 5,039 *clusters*. Os dados revelaram 11 superfamílias de conopeptídeos representando um total de 53 novas isoformas, onde a diversidade de isoformas é considerável e grandes diferenças no nível de transcrição podem ser notadas entre superfamílias. As superfamílias A, S e M se apresentaram as mais diversas. As isoformas da superfamília A somaram mais de 70% dos conopeptídeos, além das superfamílias e famílias tradicionais, alguns transcritos menores, incluindo peptídeos livres de cisteínas e peptídeos ricos em cisteínas puderam ser detectados, alguns deles representando novos subtipos de conopeptídeos (Terrat *et al.*, 2012). Finalmente, vários grupos de transcritos relacionados a proteínas, geralmente recrutados pela peçonha, puderam ser identificados no ducto de *Conus*. Portanto, o trabalho desenvolvido por Terrat (2012) apresenta um dos primeiros estudos de ESTs em larga escala do ducto de peçonha das espécies de *Conus*, utilizando sequenciamento de nova geração para ampliação das análises de transcrito global mostrando que, além dos peptídeos ricos em cisteínas, caso das proteínas detectadas envolvidas na maturação pós-translacional e dobramento, pode-se revelar componentes hemolíticos clássicos e mecanismos de penetração da peçonha na presa. Por fim, uma futura comparação com a proteômica e genômica pode levar a um melhor entendimento da diversidade dos conopeptídeos e os mecanismos subjacentes envolvidos na evolução destas moléculas (Terrat *et al.*, 2012).

Por conseguinte, a falta de estudos transcritômicos em animais de ambientes aquáticos se mostra ainda muito grande, e uma vez que esses animais podem representar uma fonte extensa de moléculas para aplicação médica e biotecnológica, um foco maior deve ser dado a esse tipo de animais. Vale ressaltar, que o ambiente em que eles vivem, é um local altamente competitivo e por esse motivo eles apresentam um amplo desenvolvimento do arsenal tóxico para caça e defesa.

Propriedades bioquímicas das peçonhas de arraias descritas

Peptídeos atuantes em microcirculação

O primeiro estudo, investigando as propriedades bioquímicas e farmacológicas da peçonha das arraias, foi realizado por Russell e Van Harreveld (1954), onde foram demonstrados os efeitos da peçonha de *Urobatris helleri* no sistema cardiovascular. Os mesmos autores (1954) também demonstraram a presença de polipeptídios de alta massa molecular, serotonina e fosfodiesterases em peçonhas de arraias marinhas. Mais recentemente, Conceição (2006) isolou um peptídeo da peçonha do ferrão de *Potamotrygon orbignyi* através de métodos cromatográficos, o padrão proteico dessa peçonha apresentou 10 frações bem definidas e seus efeitos foram testados na microcirculação *in vivo* em camundongos. A fração com maior atividade foi usada na caracterização bioquímica; essa fração continha somente o peptídeo, então denominado de Orpotrina com massa de 1001,53 Da. O peptídeo causou uma diminuição no diâmetro das arteríolas dos grupos tratados, porém nenhuma mudança foi observada no diâmetro das vênulas. Com base nos alinhamentos dos resíduos de aminoácidos, o peptídeo Orpotrina apresentou similaridade às sequências de creatinina quinase (CK) que atuam no centro do controle energético celular (Conceicao *et al.*, 2006).

Outro trabalho desenvolvido por Conceição *et al.* (2009) isolou um peptídeo de *P. orbignyi* também por meio de métodos cromatográficos. O peptídeo foi analisado por MS/MS e denominado Porflan, com massa de 2006 Da. Para investigar a atividade desse peptídeo e outros análogos (Porflan N e

C), os autores testaram o efeito dos mesmos na microcirculação e constataram que tanto o Porflan quanto o Porflan N aumentavam a quantidade de leucócitos, porém nenhum deles mostrou uma mudança na capilaridade e na permeabilidade vascular (Conceicao *et al.*, 2009). O peptídeo Porflan C não provocou alteração no número de leucócitos, mas exibiu uma atividade citotóxica imediatamente após a aplicação nos camundongos (Conceicao *et al.*, 2009).

Enzimas hidrolases

As hidrolases correspondem a um grande grupo de enzimas que catalisam reações utilizando água como nucleófilo, sem necessidade de um co-fator, essas enzimas têm contribuído muito nas indústrias de agroquímicos e produtos farmacêuticos (Busto *et al.*, 2010). Um trabalho desenvolvido por Magalhães (2008) isolou uma hialuronidase da peçonha de *P. motoro*. A toxina foi isolada por meio de cromatografias de exclusão molecular dando origem a 1 fração onde continha a hialuronidase. A enzima apresentou uma atividade ótima em pH 4.2 e sua temperatura ideal foi a 40°C no pH de 4.2. Um gel de poliacrilamida realizado com a enzima isolada no estudo demonstrou que a proteína apresenta uma massa de aproximadamente 74 kDa (Magalhaes *et al.*, 2008). Hialuronidases são enzimas que quebram ácido hialurônico, um dos principais componentes da matriz extracelular dos vertebrados. Essas enzimas, portanto, facilitam a absorção e difusão da peçonha nos tecidos das vítimas, aumentando o envenenamento sistêmico. Atividade proteolítica também foi demonstrada para as peçonhas de *Potamotrygon cf. scobina* e *P. gr. orbignyi* (Magalhaes *et al.*, 2006).

A grande maioria dos estudos disponíveis, focado na peçonha de peixes dulciaquícolas, incluindo as arraias, aborda os aspectos relativos ao envenenamento causado por esses animais (Haddad *et al.*, 2004). Porém, pouco se sabe sobre os demais constituintes destas peçonhas, especialmente com relação aos peptídeos e suas possíveis interações farmacológicas. Desse modo, estudos com estas peçonhas podem evidenciar uma importante fonte de novos agentes terapêuticos.

Justificativa

O envenenamento pela peçonha de animais aquáticos em áreas ribeirinhas, principalmente em pescadores, não tem sido devidamente relatado nas estatísticas de divulgação nacional. Entretanto, o envenenamento por arraias pode causar danos permanentes às vítimas, como amputações de membros e necrose local, levando a uma lenta recuperação da vítima após o acidente, acarretando dificuldades socioeconômicas. Neste contexto, o transcritoma do ferrão que contém a peçonha das arraias *P. falkneri* e *P. motoro* se torna um interessante alvo de estudo a fim melhor compreender o mecanismo de ação dessa peçonha, uma vez que essa ferramenta tem sido constantemente utilizada para estudos com peçonhas, visando futuramente, amenizar os mecanismos fisiopatológicos associados a esse tipo de envenenamento e também um possível achado que pode ser utilizado a favor da biotecnologia.

Objetivo Geral

O trabalho tem como objetivo a análise de perfil funcional comparativo do transcrito do ferrão de duas espécies de arraias de água doce *P. falkneri* e *P. motoro*, objetivando a elucidação das possíveis moléculas que possam estar relacionadas aos danos causados pelo envenenamento.

Objetivos específicos

- Coletar as amostras de *P. falkneri* e *P. motoro* para as análises transcritômicas, bem como a extração de RNA do ferrão de ambas as espécies;
- Identificar os transcritos associados às lesões proporcionadas pela peçonha de *P. falkneri* e *P. motoro* através do sequenciamento do transcrito dos ferrões.
- Identificar possíveis proteínas e peptídeos que possam ser de interesse biotecnológico.

Material e Métodos

Metodologia desenvolvida

Coleta dos ferrões

Os ferrões foram extraídos de arraiais da espécie *P. falkneri* (n=3) e *P. motoro* (n=3) após a coleta no Rio Salobra, Mato Grosso do Sul (-20° 46' 59.52", -51° 37' 41.17"), sobe licença do ICNBio 31241-2. Para as análises de RNA, o ferrão foi imediatamente colocado em uma solução conservante (RNA Lateral - QIAGEN™). Após 24h, a solução foi descartada e os ferrões foram mantidos a -80°C até o uso. Foram utilizadas um pool dos ferrões coletados na mesma época, não sendo diferenciado idade, nem sexo.

Extração do RNA

Para as análises de RNA do ferrão de *P. falkneri*, o mesmo foi raspado com a ajuda de uma espátula e 100 mg do material foi usado para extração de RNA com trizol. O material raspado do ferrão (100 mg) foi acrescido primeiramente de 1 mL do reagente trizol (*TRIzol® Reagent by life technologies*), homogeneizado e centrifugado a 12,000 x g a 4°C por 10 minutos, após, o sobrenadante foi acrescido de 200 µL de clorofórmio para cada 1mL de trizol utilizado. Em seguida, a solução foi homogeneizada, e incubada por 3 minutos à temperatura ambiente com seguinte centrifugação por 15 minutos a 12,000 x g a 4°C para a separação de fase. Após a separação, a fase aquosa foi retirada e colocada em um novo tubo. Foram adicionados 500 µL de isopropanol 100% para cada 1 mL de trizol utilizado, incubado por 10 minutos e centrifugando conforme o passo anterior. O precipitado foi lavado com etanol 75% e centrifugado por 5 minutos a 12,000 x g a 4°C e ressuspendido em água *RNase free* e posteriormente estocado a -80°C para futuras análises.

Quantificação e eletroforese de RNA

A quantificação do material para as análises de RNA foi realizada por fluorimetria, por meio do *Qubit® RNA Assay Kit* (Invitrogen™). Para tal, foi preparada uma solução com 199 µL de tampão do fabricante e 1 µL do fluorímetro de acordo com a amostra, em seguida 1 µL dessa solução foi descartada e 1 µL da amostra foi adicionada, a solução foi agitada e permaneceu em repouso por quinze minutos para a solução de quantificação proteína e dois minutos para a solução de quantificação de RNA e por fim, os tubos foram colocados no quantificador e foi medida sua absorbância. Para a avaliação da integridade de RNA da amostra foram realizadas análises eletroforéticas em gel de agarose a 1%. Às alíquotas das amostras foram adicionados 5 µL de tampão de Amostra (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno de cianol FF, 15% ficol em água) e, então, aplicadas nos poços do gel. Após adição do tampão de corrida (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM) na cuba, a corrida foi feita a 80 V e 60 mA, por cerca de 50 minutos. Os géis foram corados com brometo de etídeo (20 mg.mL⁻¹).

Análise da integridade do mRNA extraído

A integridade do RNA livre de rRNA, denominado nesse trabalho de RNAm, por se tratar do tipo de RNA mais presente nas amostras após a realização da remoção do RNA ribossomal, foi avaliada antes da construção da biblioteca de cDNA, através do Agilent 2100 Bioanalyser (*Agilent Technologies*). O gel para análise do mRNA foi preparado, conforme descrito no kit *Agilent RNA Pico*, pipetando 2 µL do corante e 40 µL da matriz do gel em um frasco de 0,5 mL livre de RNase. Em seguida, a amostra foi homogeneizada e centrifugada a 1,300 g por 10 min a T. A. Foram pipetados 9 µL da mistura preparada no poço correspondente do chip *Agilent RNA-1000* e posteriormente com auxílio do aplicador, o restante dos poços do chip foram preenchidos. Foram pipetados 9 µL de solução RNA Pico conditioning nos poços marcados e 5 µL do marcador RNA Pico nos poços do marcador e das amostras. Foram pipetados 1 µL de marcador de RNA no poço correspondente e 1 µL do mRNA de cada amostra. O chip foi homogeneizado por vórtex durante 60 s a 2,400 rpm e utilizado para carregar o equipamento.

Construção da biblioteca de RNA e Sequenciamento por RNA-seq

Síntese da primeira fita de cDNA

A construção das bibliotecas de DNA complementar (cDNA) foi realizada conforme descrito no kit *TruSeq® Stranded mRNA Sample Preparation* (Illumina). Foram utilizados 5 µL de RNA livre de rRNA de cada amostra, contendo de 6 a 40 ng do RNA pré-isolado. Esse material foi homogeneizado nos poços da placa RBP (*RNA Bead Plate*, iniciais do inglês) com 13 µL do tampão FPF (*Fragment Prime Finish Mix*, iniciais do inglês). A placa RBP foi selada com plástico adesivo e incubada a 94 °C por 1 min no termociclador. Após esse período, a placa foi centrifugada rapidamente e incubada no suporte magnético a Temperatura Ambiente por 5 min. O selo da placa foi retirado e transferiu-se 17 µL do sobrenadante de cada poço para os poços da placa CDP (*cDNA plate*, do inglês). Foi preparada uma mistura contendo os tampões *SuperScript II* e *First Strand Synthesis Act D* (1:9) e adicionou-se 8 µL dessa mistura de tampões a cada poço da placa CDP contendo os mRNA fragmentados. As amostras foram homogeneizadas, a placa CDP foi selada com plástico adesivo, centrifugada rapidamente e incubada no termociclador a 25°C por 10 min, a 42°C por 15 min e por último a 70°C por 15 min.

Síntese da segunda fita de cDNA

Após o período de incubação, a placa foi retirada, o plástico adesivo descartado e foram adicionados 5 µL de tampão de ressuspensão a cada poço da placa CDP e 20 µL do tampão *Second Strand Marking Master Mix*. As amostras foram homogeneizadas, a placa novamente selada e incubada no termociclador a 16°C por 1 h. Após incubação, o selo adesivo foi retirado e a placa permaneceu em repouso até atingir a T.A. Posteriormente, foram adicionados 90 µL de *AMPure XP* beads a cada poço da placa CDP que continha os 50 µL de cDNA dupla fita (ds cDNA). Após homogeneização, a

placa CDP foi incubada a T. A. por 15 min. Em seguida, a placa foi transferida para o suporte magnético e permaneceu incubada a T. A. por 5 min. O sobrenadante foi descartado, foram adicionados 200 µL de etanol 80% para lavagem das micropérolas magnéticas e a placa CDP foi incubada por 30 s a T. A. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, essa etapa de lavagem foi repetida e a placa CDP permaneceu incubada a T. A. por 15 min para secar. A placa CDP foi retirada do suporte magnético, adicionou-se 17,5 µL do tampão de ressuspensão a cada poço da placa e após homogeneização a placa foi incubada a T. A. por 2 min. Em seguida, a placa foi incubada no suporte magnético por 5 min a T. A. e foram transferidos 15 µL do sobrenadante (ds cDNA) para os poços da placa ALP (*Adapter Ligation Plate*).

Adenilação da extremidade 3' dos fragmentos e ligação de adaptadores

Foram adicionados 2,5 µL de tampão de ressuspensão e 12,5 µL de *A-Tailing Mix* a cada poço da placa ALP. A placa foi homogeneizada, selada e incubada a 37°C por 30 min e em seguida a 70°C por 5 min. Após a adenilação, cada amostra foi ligada a um adaptador contendo uma sequência diferente (index) para a identificação após a corrida. O plástico adesivo foi removido, foram adicionados 2,5 µL de tampão de ressuspensão, 2,5 µL de tampão de ligação e 2,5 µL de RNA *Adapter Index* a cada poço da placa ALP, a placa foi homogeneizada, selada, centrifugada a 280 g por 1 min e incubada a 30°C por 10 min. Após a incubação, o adesivo plástico foi removido, foram adicionados 5 µL de tampão *Stop Ligation* em cada poço da placa para inativar a ligação. Adicionou-se 42 µL de *AMPure XP beads* a cada poço, a placa ALP foi homogeneizada, incubada por 15 min a T. A. e em seguida, incubada no suporte magnético a T. A. por 5 min. Foram descartados 79,5 µL de sobrenadante de cada poço, adicionados 200 µL de etanol 80% e a placa foi incubada por 30 s a T. A. O sobrenadante foi descartado, essa etapa foi repetida mais uma vez e o sedimento permaneceu incubado a T. A. por 15 min para secagem. O sedimento foi, então, ressuspendido com 52,5 µL de tampão de ressuspensão, homogeneizado, incubado por 2 min a T. A. e também por 5 min a T. A. no suporte magnético. Foram transferidos 50 µL do sobrenadante

para a placa CAP (*Clean Up ALP Plate*, iniciais do inglês) e adicionados 50 µL do *AMPure XP beads*. A placa CAP foi homogeneizada, incubada a T. A. por 15 min e posteriormente incubada no suporte magnético por 5 min a T. A. Foram descartados 95 µL do sobrenadante de cada poço, adicionados 200 µL de etanol 80% e a placa foi incubada por 30 s a T. A. Todo o sobrenadante foi removido, a lavagem com etanol repetida por mais uma vez e o sedimento de cada poço foi ressuspensionado em 22,5 µL de tampão de ressuspensão. Após homogeneização, a placa CAP foi incubada primeiramente a T. A. por 2 min e depois por 5 min no suporte magnético para a recuperação do sobrenadante.

Enriquecimento dos fragmentos de cDNA

Foram transferidos 20 µL do sobrenadante de cada poço para a placa PCR (*Polymerase Chain Reaction*, iniciais do inglês), 5 µL de *PCR Primer Cocktail* e 25 µL de *PCR Master Mix* para cada poço. Os poços foram homogeneizados, a placa selada e incubada no termociclador para a reação de amplificação. O ciclo consistiu na desnaturação a 98°C por 40 s, seguida de anelamento dos oligos por 30 s a 60°C e a polimerização e extensão foram executadas a 72°C por 30 s. Foram realizados no total 15 ciclos por reação e uma etapa final de extensão a 72°C por 5 min. Após a PCR, o selo da placa foi removido, 50 µL de *AMPure XP beads* foram adicionados, homogeneizados e a placa foi incubada a T.A. por 15 min. Em seguida, a placa foi incubada no suporte magnético por 5 min, foram descartados 95 µL de sobrenadante de cada poço e adicionados 200 µL de etanol 80%. A placa foi incubada por 30 s a T. A., todo o sobrenadante foi removido e essa etapa de lavagem novamente repetida por mais uma vez. O sedimento foi então ressuspensionado em 32,5 µL de tampão de ressuspensão, a placa foi incubada por 2 min a T. A., posteriormente incubada no suporte magnético por 5 min e foram transferidos 30 µL do sobrenadante de cada poço para a placa TSP (*Target Sample Plate*, iniciais do inglês), que correspondem à biblioteca de cDNA. Esse material foi utilizado para validação, conforme descrito abaixo e armazenado no - 20°C até sua utilização.

Validação e mistura das bibliotecas de cDNA

A biblioteca de cDNA foi validada utilizando o *Agilent 2100 Bioanalyser* (Agilent Technologies). O gel foi preparado, conforme descrito no kit *Agilent High Sensitivity DNA*, adicionando-se 15 µL do corante de DNA concentrado de alta sensibilidade ao frasco contendo a matriz do gel de DNA de alta sensibilidade. Em seguida, a amostra foi homogeneizada em vórtex, centrifugada rapidamente, transferida para o filtro e centrifugada a 2240 x g por 10 min. Foram pipetados 9 µL da mistura preparada no poço correspondente do *chip Agilent DNA-1000* e posteriormente com auxílio do aplicador, o restante dos poços do chip foram preenchidos, conforme as orientações do fabricante. Foram pipetados 5 µL de marcador em todos os poços do chip. Foram pipetados 1 µL de marcador de peso molecular no poço correspondente e 1 µL da biblioteca de cada amostra da placa TSP. O chip foi homogeneizado por vórtex durante 1 min a 2400 rpm, incubado por 5 min a T. A. e carregado no equipamento. A pureza e o tamanho dos fragmentos de cDNA foram analisados e após a validação da biblioteca, foram transferidos 10 µL da biblioteca de cada amostra para os poços da placa DCT (*Diluted Cluster Template*) e a concentração das amostras foi normalizada para 10 nM com uma solução contendo Tris-HCl 10 nM, pH 8,5 e Tween 20 0,1%. Em seguida, 10 µl de cada amostra a 10 nM foram misturadas em um único pool para a corrida de sequenciamento.

Sequenciamento das amostras

Após a validação e mistura das bibliotecas de cDNA das triplicatas de cada amostra (*P. falkneri* e *P. motoro*) foi realizado o sequenciamento de segunda geração e obtenção das sequências para análise. Foram realizadas 2 corridas na plataforma MiSeq® (Illumina) em leituras *paired-end* de 2x250 pb. Para a aplicação no sequenciador, o pool de amostras foi desnaturado com uma solução de NaOH a 0,2 N e diluída a fim de se alcançar a quantidade ideal de moléculas de DNA para serem ligadas na *flowcell* e amplificadas na PCR em ponte. A primeira corrida foi feita com 12 pM da mistura de bibliotecas e a segunda corrida foi feita com 10 pM. Após o sequenciamento, as amostras

foram individualizadas de acordo com os index e convertidas para o formato fastq utilizando o programa *MiSeq Reports* (Illumina).

Processamento dos dados e montagem do transcrito

Os dados brutos provenientes do sequenciamento Illumina foram submetidos a um pré-processamento utilizando-se a ferramenta *Trimmomatic* para eliminar adaptadores de sequência, utilizando-se um arquivo fasta contendo todos os adaptadores Illumina já conhecidos, para uma melhoria nas análises as sequências de baixa qualidade foram removidas através de uma exploração das sequências com uma janela deslizante a cada 5 bases, no qual aquelas sequências com qualidade média abaixo de 15 bp foram excluídas (Lohse *et al.*, 2012). As sequências resultantes, com tamanho médio abaixo de 36 bp foram excluídas, além disso, uma normalização dos dados foi realizada pelo próprio Trinity fazendo com que houvesse uma melhor montagem e caracterização dos transcritos. A montagem do transcriptoma foi realizada pela metodologia *de novo* através do *Trinity assembler* (Meryl k-mer cunter) (Grabherr *et al.*, 2011), utilizando-se sequências de alta qualidade *paired-end* como entradas.

Perfil transcritômico dos ferrões de *P. falkneri* e *P. motoro*

Nem todos os transcritos montados pelo Trinity são codificantes. Para a identificação dos transcritos traduzidos foi utilizado o TransDecoder que seleciona as 500 maiores ORFs identificadas nos transcritos para estabelecer um modelo de predição de genes dentro dos demais transcritos. A análise funcional dos unigenes foi realizada através de alinhamento com a base de dados não redundante de proteínas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI NR, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>) (Kanehisa and Goto, 2000), baseando-se na anotação, por meio de BLASTX (Limiar de significância: *e-value* <1.0e-5).

Resultados e discussão

Sequenciamento e montagem dos transcritomas de *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro*

A fim de obter um maior conhecimento acerca das proteínas que são expressas pelo ferrão das duas espécies de arraias (*P. falkneri* e *P. motoro*) utilizou-se a técnica de transcritômica pela plataforma *Illumina MiSeq truseq*. O sequenciamento desenvolvido gerou um total de 29,325 genes preditos para as amostras do ferrão de *P. falkneri*, onde 3,945 foram genes preditos onde somente a parte da fita 3' foi encontrada e 7,652 foram do genes preditos onde somente a parte da fita 5' foram encontradas, além disso foram obtidos 12,894 genes completos, possuindo ATG e códon de parada e 4,834 genes parciais sem a sequência ATG e o códon de parada. Por outro lado, foram encontrados um total de 34,723 genes preditos para o ferrão de *P. motoro*, onde 3,762 foram genes preditos onde somente a parte da fita 3' e 8,251 foram do genes preditos onde somente a parte da fita 5', genes completos com ATG e códon de parada foram encontrados 18,724 genes e 3,986 genes incompletos sem o códon *stop*. Após a montagem *de novo* dos transcritomas pelo programa *Trinity* (Grabherr *et al.*, 2011), um total de 101,144 transcritos foram encontrados para *P. falkneri*, além de 76,222 componentes e um total de 149,780 transcritos foram encontrados para *P. motoro*, além de 121,750 componentes, o tamanho médio de *contigs* foi de N50:1,781 e 1,704 para *P. motoro* e *P. falkneri* respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Sequenciamento e montagem de novo do transcritoma de *P. falkneri* e *P. motoro*, utilizando o sequenciador *Illumina MiSeq*

Sumário de sequenciamento e montagem		
	<i>P. falkneri</i>	<i>P. motoro</i>
Pares de leituras totais	15,327,582	14,123,757
Leituras após refinamento	15,166,975	13,990,001
Total de sequências <i>Paired-ends</i>	30,655,164	28,247,514
Total de sequência <i>paired-ends</i> após refinamento	30,333,950	27,980,002
<i>Contigs</i> N50	1,704	1,781
Total de transcritos montados através do <i>Trinity</i>	101,144	149,780
Total de genes assinalados	29,325	34,723

Trabalhos desenvolvidos com sequenciamento de nova geração (RNA seq) com arraias de qualquer ambiente, seja marinhas ou dulciaquícolas, são desconhecidos. Até o presente momento, nenhum trabalho dessa natureza foi publicado, até mesmo para outros animais peçonhentos de ambiente aquático é extremamente raro se encontrar trabalhos dessa natureza. Por outro lado, o sequenciamento vem sendo utilizado no estudo de glândulas de peçonhas ou venenos de diversas espécies de animais, principalmente animais terrestres. Contudo, Hu e colaboradores (2012) utilizaram o sequenciamento de nova geração 454 *Sequencer FLX Titanium* para resolução do transcrito do ducto da peçonha de *Conus* (*C. geographus*). Neste trabalho com *Conus* foram gerados em média 200,000 leituras de alta qualidade com um N50 de 580 bp, para o transcrito de referência foram gerados através do programa Mira 3 (Chevreux *et al.*, 2004) um total de 60,305 *contigs* e após um refinamento das análises, para retirada de *contigs* redundantes, restaram 49,515 *contigs* para o transcrito de referência (Hu *et al.*, 2012).

Outro trabalho relacionando análise transcritômica de glândulas de peçonha e sequenciamento de nova geração com animais terrestres foi desenvolvido por He e colaboradores (2013). Eles utilizaram a glândula de peçonha de aranhas fêmeas de *Latrodectus tredecimguttatus*. Nesse trabalho, foi utilizado a plataforma Illumina HiSeq 2000. Foram encontradas para a glândula de *Latrodectus tredecimguttatus* um total de 27,605,467 *paired-end* leituras com uma média de 90 pb, no que diz respeito a transcritos foram encontrados 34,334 apresentando um comprimento médio de 628bp (He *et al.*, 2013a). Todas as leituras foram montadas através do programa *Trinity* (Grabherr *et al.*, 2011).

Por fim, um trabalho realizado com glândulas de peçonha de duas espécies de serpentes *Ovophis okinavensis* e *Protobothrops flavoviridis* foram realizadas por Aird e colaboradores (2013), utilizando a plataforma Illumina GAI. Após o refinamento das análises, foram obtidos 13,572,340 e 12,184,487 *paired-end* leituras, bem como, 2,079,603 e 3,110,164 *single-end* leituras para *O. okinavensis* e *P. flavoviridis*, respectivamente. Após uma filtragem dos transcritos de baixa qualidade, estes foram reduzidos de 46,631 e 58,199

transcrições para de 13,998 e 19,970 transcritos para *O. okinavensis* e *P. flavoviridis*, respectivamente (Aird *et al.*, 2013).

Quando observado, os dados obtidos neste trabalho com a literatura apresentada, podemos observar que a diferença de quantidade de informação varia de forma considerável, salientando que para o nosso trabalho, obtivemos uma maior quantidade de dados quanto comparado ao dados apresentados na literatura aqui apresentada.

Perfil transcritômico funcional

Para a caracterização funcional das proteínas preditas, os dados foram submetidos a uma busca no BLAST contra a base de dados UniProt. Para uma construção do perfil funcional o conjunto de dados transcritômicos gerados provenientes de uma montagem *de novo* foi comparada a uma base de dados do KEGG Orthology gerando KOs para as proteínas preditas. Para avaliação de igualdade das amostras no que diz respeito aos KOs obtidos para cada uma delas, um diagrama de Venn foi criado, mostrando que foram obtidos para as amostras de *P. falkneri* 382 KOs exclusivos, e para as amostras de *P. motoro* 597 KOs exclusivos, porém KOs que foram compartilhados entre as espécies mostrou um soma de 4,631 (Figura 5).

No diagrama de Venn apresentado, também foram indicadas as classes que compõem os KOs exclusivos para as duas espécies de arraiais, bem como a sobreposição delas, mostrando os KOs que estão presentes em ambas (Figura 5).

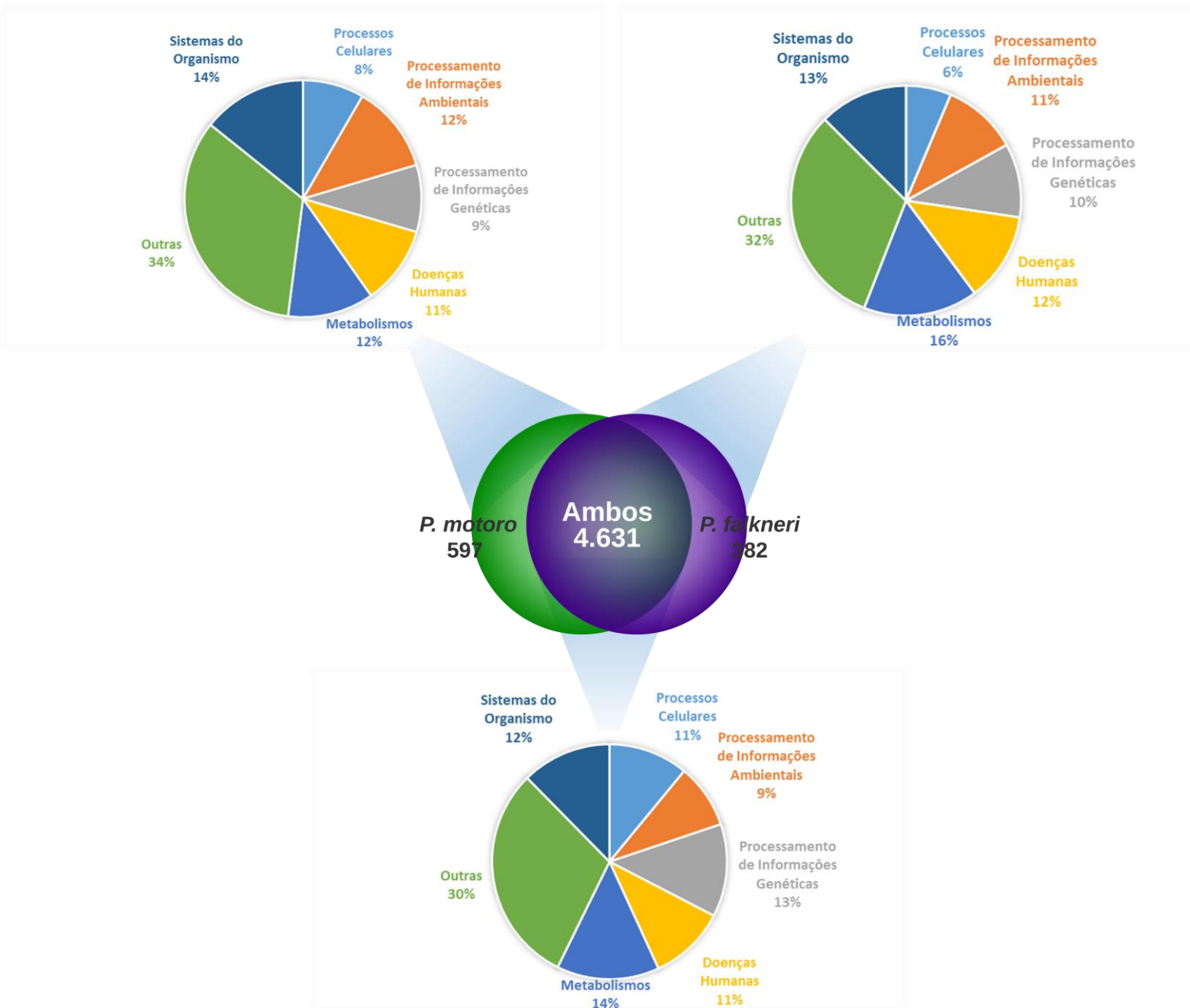


Figura 5. Diagrama de Venn mostrando a sobreposição de KOs obtidos para as duas espécies de arraias, bem com as classes de transcritos relacionados a cada uma das espécies e também para ambas.

Para a amostra de *P.falkneri* foram obtidos 17,822 genes com *hits* proporcionando um total de 5,013 KOs diferentes, por outro lado, para a amostra de *P. motoro* foram obtidos 20,162 genes com *hits*, proporcionando um total de 5,228 KOs diferentes. Para esses KOs de ambas as amostras, os transcritos foram divididos em 7 classes diferentes que podem ser visualizadas nas Figuras 6 e 7, essas classes estão contando também os genes e os KOs que se apresentam repetidos uma vez que genes diferentes podem originar KOs que estão envolvidos em mais de uma classe, logo, os dados podem sofrer sobreposição. Dentre essas classes de transcritos, a que se apresentou com uma maior porcentagem de transcritos foi a classe de transcritos denominada miscelânea (KOs que não se enquadraram em nenhuma das classes do transcritos encontrados), ao qual para *P. falkneri* se obteve 30% de KOs e para *P. motoro* se obteve 31% de KOs que não estão relacionadas com nenhuma via biológica. Este dado pode ter ocorrido dado que a montagem aconteceu sem um genoma referência, dificultando a atribuição de uma via para grande parte dos transcritos, por este motivo também não foi possível à obtenção de transcritos relacionados especificadamente com toxinas (Figuras 6 e 7), podendo também essa quantidade estar relacionada a artefatos gerados na montagem.

Segundo as análises, a segunda classe de transcritos que obteve uma maior porcentagem de KOs foi a classe dos transcritos de metabolismo celular, onde se obteve 15% para *P. falkneri* e 14% para *P. motoro*, seguido por 12% e 13% de KOs de sistemas do organismo para *P. falkneri* e *P. motoro*, respectivamente. Para ambas as amostras obteve-se para a categoria de KOs relacionadas a doenças humanas uma porcentagem de 11%. Essa classe se deu pelo fato dos transcritos não terem sido contrastados contra um genoma de referência, e sim pelo *transdecoder*, que utilizou as 500 maiores ORFs como modelo para fazer a predição gênica. Por fim, a classe de processos celulares correspondeu a 10% para ambas as espécies, e ainda, para a classe de processamento de informação ambiental foram obtidos 9% também para ambas as espécies. Finalizando, a última classe de proteínas geradas a partir dos dados obtidos foi a classe de processamento de informações genéticas, onde se obteve 13% para *P. falkneri* e 12% para *P. motoro* (Figuras 6 e 7).

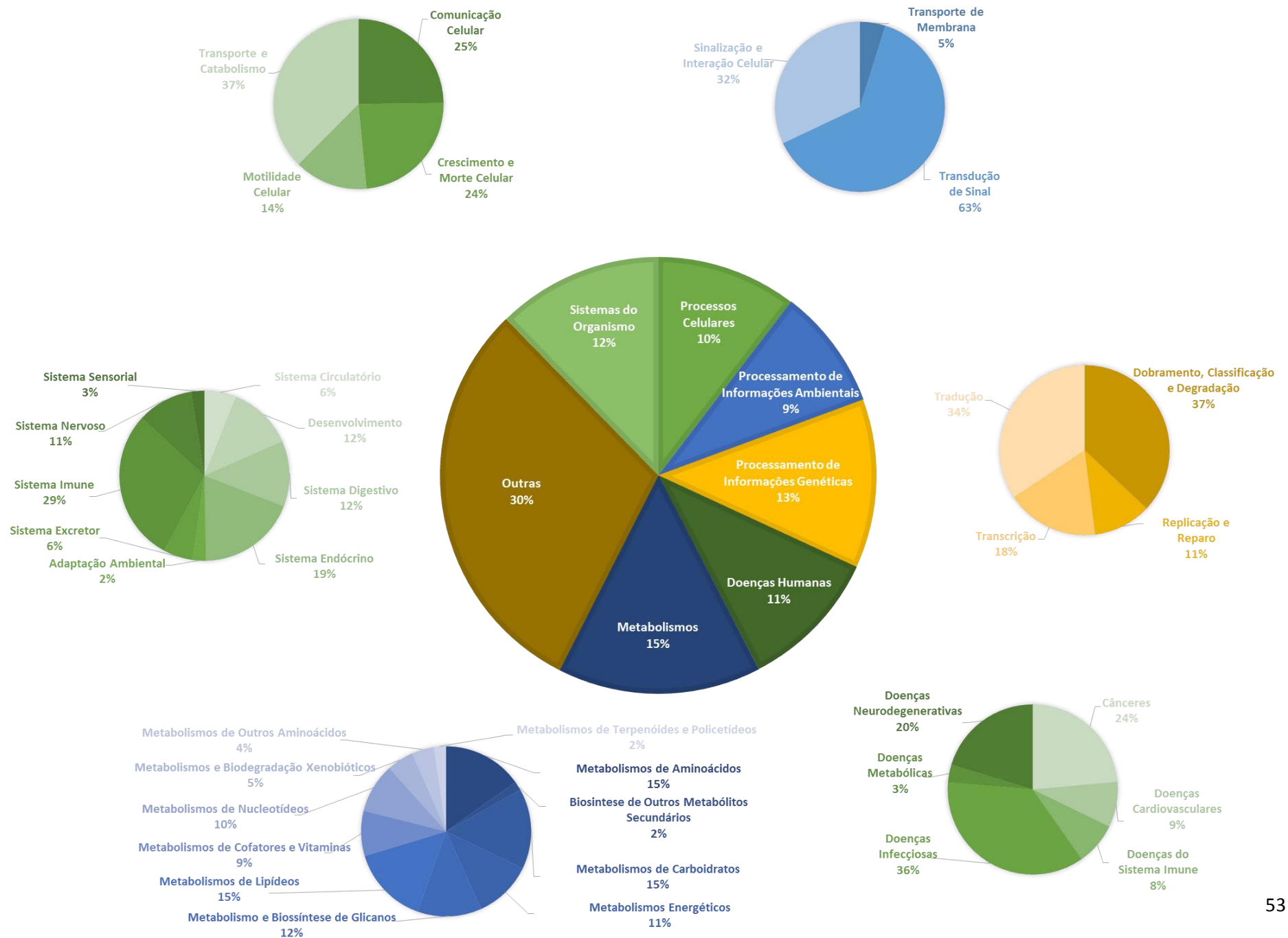


Figura 6. Disposição das classes e subclasses originadas a partir das análises transcritômicas de *P. falkneri*.

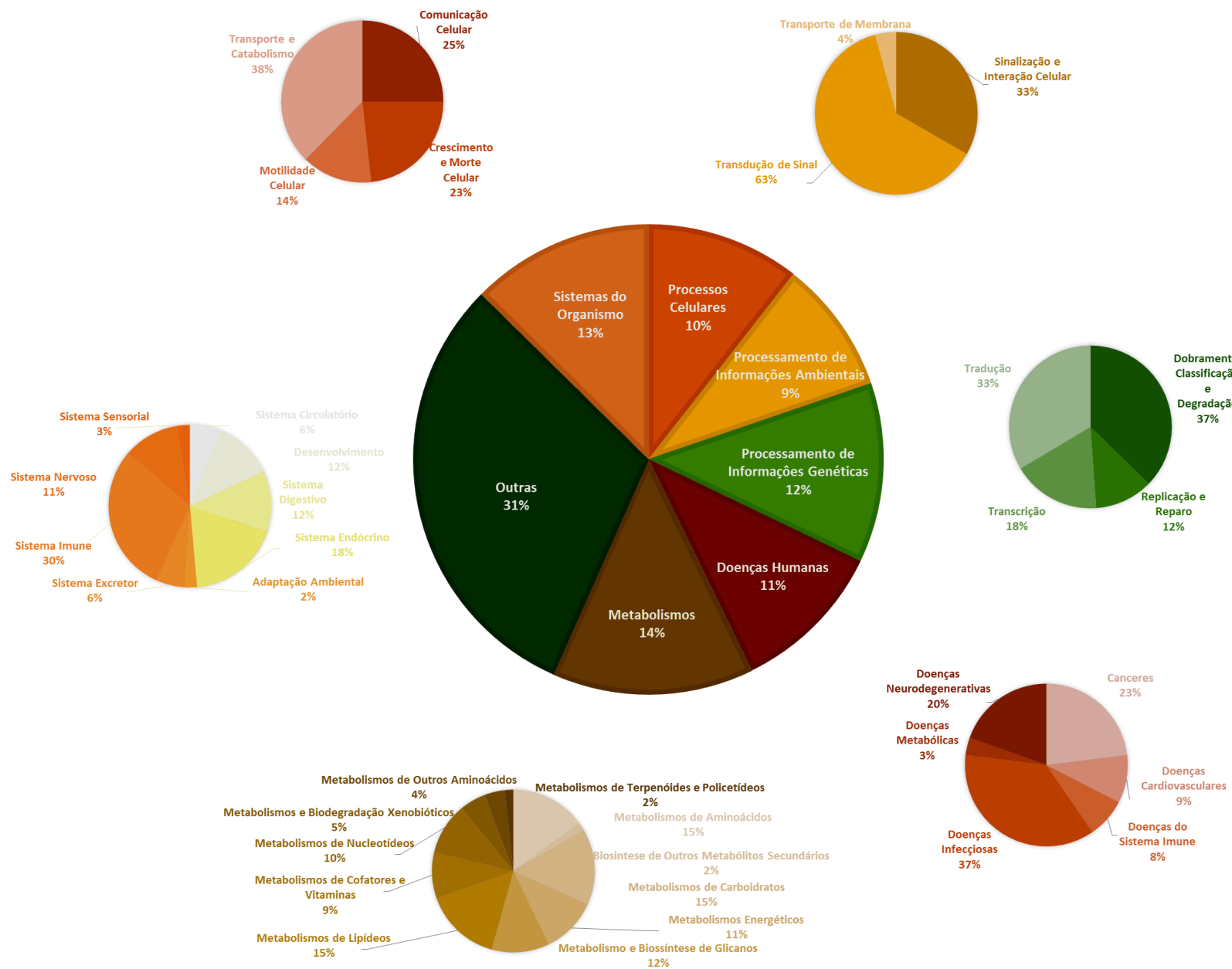


Figura 7. Disposição das classes e subclasses originadas a partir das análises transcritômicas de *P. motoro*.

Vários trabalhos com transcrito de glândulas de peçonha de diversos animais vêm recebendo atenção desde que se criou a técnica de RNASeq. Um trabalho recente realizado por Valez-Velazquez e colaboradores (2013) desenvolveu um estudo utilizando a glândula de peçonha do escorpião *Centruroides tecomanus*, onde se obteve o transcrito utilizando a plataforma ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer. Após a montagem dos transcritos, foi observada uma maior quantidade dos transcritos relacionados a Toxinas (53%), seguido de 19% de transcritos de processos celulares, e assim como neste trabalho grande parte das proteínas foram caracterizadas como desconhecidas e sem função definida, que foram 20% dos transcritos. Além disso, 4 % foram identificadas como outros componentes proteicos e mais 4% de peptídeos antimicrobianos (Valdez-Velazquez *et al.*, 2013). Os dados gerados foram contrastados com um banco de dados utilizando os algoritmos blastx e blastn, porém o banco de dados não foi informado.

Outro trabalho utilizando sequenciamento de nova geração foi desenvolvido por Rendon-Anaya e colaboradores (2012), com a glândula de peçonha do escorpião da espécie *Centruroides noxius*, neste trabalho foi utilizado a plataforma 454, e os dados foram avaliados contra o banco de dados de *Drosophila melanogaster* e toxinas depositadas no ToxProt (http://www.expasy.ch/sprot/tox-prot/tox-prot_stat.html). Após as análises das proteínas identificadas, se obteve uma separação de classes de proteínas, onde, as 5 principais categorias foram as relacionadas a processos celulares com 22% das proteínas identificadas, 18% de processos metabólicos, 9% de regulação biológica, seguido por 8% de processos multicelulares do organismo e 7% para processos de desenvolvimento. As análises para a glândula de veneno de *C. noxius* não apresentou nenhuma proteínas sem função relacionada (Rendon-Anaya *et al.*, 2012).

Grande parte de trabalhos que tratam de análises transcritômicas de glândulas de peçonhas tem sua concentração em serpentes de gêneros distintos. Rodrigues e colaboradores (2012) utilizaram a plataforma de análises MEGA-BACE1000 automated DNA sequencer para analisar o perfil transcritômico da glândula da serpente da espécie *Bothropoides pauloensis*, utilizando a anotação do BLASTX e BLASTN contra o GeneBank NCBI database. Para tais análises foram identificados três grandes grupos proteicos,

onde, 41,9% foram identificados como toxinas, 30,9% relacionados a proteínas celulares, e 27,2% não foram identificados.

Além do sequenciamento de última geração ser utilizado em organismos que já são corriqueiramente estudados, o mesmo pode também ser utilizado para o estudo de novos organismos assim como feito no presente trabalho. Nesse sentido, Bouzid e colaboradores (2013) realizaram um trabalho que foi o primeiro transcrito realizado em espécies de formiga, utilizando a glândula de peçonha da espécie *Tetramorium bicarinatum*. Nesse trabalho foi utilizado a plataforma *ABI Prism BigDye Terminator v3.1*, onde, dados foram contrastados contra o algoritmo BLASTx, usando o gene de referência de insetos extraídos do UniProtKB. Após análises de dados, os transcritos foram classificados em cinco grupos, nesse sentido, o maior dos grupos foi o grupo de funções biológicas que correspondeu em cerca de 40% dos transcritos, seguidos de 18% de transcritos de componentes de peçonhas de Hymenoptera, 26% de transcritos sem identificação, 13% de função desconhecida e, por fim, 5% de candidatos a toxinas (Bouzid *et al.*, 2013). Por fim, pode-se observar que grande parte dos trabalhos mesmo contendo genoma de referência e utilizando várias plataformas de análises e vários programas de busca, uma grande parte dos transcritos podem não ser identificados ou não serem atribuídos a processos celulares conhecidos.

Vias biológicas encontradas nos transcritos

As vias metabólicas representaram grande parte das classes de transcritos encontrados para ambas as espécies de araias, apresentando um total de 1,233 KOs para as análises de *P. falkneri* e 1,235 para as análises de *P. motoro*. Dentro da classe de metabolismo, as de aminoácidos, carboidratos e lipídeos correspondem a 15% do total para ambas as espécies, seguido por biossíntese de glicanos correspondendo a 12%, metabolismo energético com 11%, metabolismo de nucleotídeos com 10%, metabolismo de cofatores e vitaminas com 9%, metabolismo e biodegradação de xenobióticos com 5%, metabolismo de outros aminoácidos com 4% e por fim, metabolismo de terpenóides e policetídeos e metabolismo de biossíntese de outros metabólitos secundários com 2% para ambos (Figuras 6 e 7).

Metabolismo de aminoácidos

Dentre o metabolismo de aminoácidos, 6 KOs foram encontradas para as vias de biossíntese de aminoácidos exclusivas para *P. falkneri*, além de 10 KOs para *P. motoro*, além disso 113 KOs foram compartilhadas por ambas, podendo ser citadas, as de biossíntese de aminoácidos, degradação de lisina, metabolismo de aminoácidos como arginina, prolina, cisteína, metionina, glicina, serina e treonina (Tabela suplementar 1 e Figuras suplementares 1-5).

Nos últimos 20 anos, grandes esforços têm sido voltados para a definição de requisitos ideais de aminoácidos para espécies de animais, incluindo suínos (Wu *et al.*, 2007), ruminantes (Firkins *et al.*, 2006), aves (Baker, 2009), peixes (Li *et al.*, 2009) e humanos (Elango *et al.*, 2009), sobre várias condições, tais como, nutricionais, de desenvolvimento, ambientais e patológicas. Além disso, há um interesse crescente sobre funções de L- e D-aminoácidos em aspectos fisiológicos (Kim and Wu, 2009), bem com mecanismos celulares e moleculares subjacentes (Katane *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). Embora cada aminoácido tenha sua própria via catabólica única, o catabolismo em vários organismos exibe um número comum de características, tais como, redução, hidrólise, oxidação, entre outros (Wu, 2009). Metabólitos importantes de aminoácidos incluem amônia, CO₂, ácidos graxos de cadeia longa e ácidos graxos de cadeia curta, glicose, H₂S, corpos cetônicos, óxido nítrico (NO), uréia, ácido úrico, poliaminas, e outras substâncias nitrogenadas com enorme importância biológica (Blachier *et al.*, 2007; Montañez *et al.*, 2008; Morris, 2007).

Os aminoácidos são os compostos essenciais para a produção de proteínas. A síntese e a degradação contínua de proteínas num ambiente celular são coletivamente denominadas de *turnover* de proteína intracelular, esse processo por sua vez vai determinar o equilíbrio de proteínas nos tecidos (Wu, 2009). Esse *turnover* de proteínas requer grande quantidade de energia, ou seja, trifosfato de adenosina (ATP), que corresponde a cerca de 20-25% de toda a energia gasta num corpo humano adulto. Entretanto, esse ciclo metabólico de alto custo cumpre funções que são essenciais, incluindo a homeostase proteica, renovação celular, remoção de proteínas danificadas,

proteínas imunológicas, cicatrização de feridas, alterações patológicas e respostas imunes (Wu, 2009). Outro aspecto que pode ser ressaltado quando falamos de metabolismo de aminoácidos, que futuramente levará a produção de proteínas, e que, por consequência levará a processos celulares, consiste na produção de proteínas utilizadas na defesa e predação. Peçonhas são misturas complexas de compostos proteicos e não proteicos (Morgenstern and King, 2013). As proteínas encontradas em peçonhas são o resultado de um processo de recrutamento, onde, uma proteína normal, tipicamente envolvida num processo regulatório chave, é duplicada, e o novo gene é expresso seletivamente na glândula (Fry *et al.*, 2009). Em muitos casos, esses genes de toxinas foram amplificados para se obter famílias multigênicas com uma extensiva neurofuncionalização (Fry, 2005), seguida por uma deleção de algumas cópias gênicas e a degradação de outras cópias não funcionais (Fry *et al.*, 2003). Essas famílias de toxinas multigênicas recém-criadas a partir de genes de proteínas anteriormente com funções basais da célula, na maioria das vezes mantiveram os padrões moleculares (incluindo estrutura terciária) de seus ancestrais proteicos (proteínas de função basal), entretanto, alguns resíduos funcionais que estão fora desses padrões, foram modificados gerando uma infinidade de novas atividades (Fry, 2005; Fry *et al.*, 2003; Possani *et al.*, 1999).

Metabolismo de carboidratos

Vias metabólicas de carboidratos também foram identificadas a partir dos KOs gerados, correspondendo a grande parte do metabolismo em que os KOs foram enquadrados. 14 KOs exclusivos foram relacionados às vias de *P. falkneri* e 11 KOs para as vias exclusivas de *P. motoro*, além disso foram encontradas 175 KOs compartilhados entre ambas (Tabela suplementar 2), podendo ser citadas ainda vias como ciclo do citrato, glicólise, metabolismo de amido e sucrose, metabolismo de açúcar amido, frutose e manose (Figura suplementar 6-10). Os polissacarídeos (carboidratos) são a maior fonte de carbono para os organismos heterotróficos, nos três domínios da vida: bactérias, arqueobactérias, e eucariotos. Sua utilização geralmente envolve a hidrólise de polissacarídeos extracelulares com posterior absorção dos

oligossacarídeos formados, através de transportadores específicos, e a sua hidrólise intracelular para gerar hexoses (por exemplo, glucose, galactose, manose e frutose) e pentoses (por exemplo, xilose e arabinose). Posteriormente, esses monossacarídeos podem ser oxidados através de um conjunto conservado na região central das vias metabólicas (Verhees *et al.*, 2003). Os carboidratos (polissacarídeos/monossacarídeos) se mostram uma grande fonte de reserva de energia na natureza (Roach *et al.*, 2012). A glicose polimerizada em glicogênio serve como meio de armazenamento na célula para uso em caso de necessidade (Roach *et al.*, 2012). Sendo assim, uma grande variedade de vias está envolvida na degradação da glicose em piruvato para a geração de energia, podendo ressaltar a via da glicólise (Verhees *et al.*, 2003). A via de Embden-Meyerhof (EM), mais conhecida como glicólise, é a via geral para a degradação de glicose e todos os domínios da vida. Além disso alguns organismos são capazes de utilizar rotas alternativas para a degradação da glicose, isto é, a via Entner-Doudoroff (ED) (Verhees *et al.*, 2003). A via clássica de EM se mostra bem conservada em eucariotos e bactérias, onde, dez enzimas catalisam a oxidação de glicose para piruvato. Uma vez que as vias de glicólise são as vias de metabolismo energético, sua importância na produção de peçonhas por glândulas utilizando energia (ATP) é inegável.

Metabolismo de glicanos

A biossíntese e metabolismo de glicanos foi o segundo grupo mais expressivo dentro das classes de metabolismos. As análises mostraram 14 KOs exclusivos nesta via para *P. falkneri*. Entretanto, para *P. motoro*, foram obtidos somente 7 KOs exclusivos. Para ambas as espécies foram encontrados 123 KOs para essa via metabólica (Tabela Suplementar 3), para exemplificar, foram encontradas vias de biossíntese de glicosaminoglicanas heparanas, biossíntese de N glicanos, biossíntese de outros tipos de O glicanos, vias de degradação de glicosaminoglicanos e metabolismo de glicerofosfolipídeos (Figuras Suplementares 11-15).

Desde o surgimento do termo glicobiologia (Rademacher *et al.*, 1988) tem se apreciado a glicosilação como um espectro do processo biológico fundamental (Dalziel *et al.*, 2014). Os avanços nos trabalhos com

sequenciamento de glicanos vem mostrando que glicoproteínas e glicolipídios existem em muitas variantes glicosiladas, ou glicofomas, podendo variar consideravelmente em suas funções e também propriedades bioquímicas. O controle biossintético individual de estruturas glicanas, permite a regulação tanto de materiais como o desenvolvimento da glicosilação de acordo com os requisitos celulares (Dalziel *et al.*, 2014). Os glicanos possuem estruturas muito diversas, podendo incorporar uma vasta gama de resíduos de monossacarídeos e ligações glicosídicas, eles também são sintetizados por uma enorme variedade de enzimas biossintéticas localizadas ao longo do retículo endoplasmático (RE) e aparelho de Golgi.

Metabolismo de lipídeos

Vias metabólicas envolvendo lipídeos também se mostraram em grande porcentagem nos transcritos aqui apresentados. Dentre essas vias 11 são KOs exclusivos para *P. falkneri* e 16 KOs para *P. motoro*, além disso 143 KOs compartilhados em ambas as espécies (Tabela suplementar 4), para metabolismo de lipídeos, vias metabólicas também podem ser citadas, tais como, vias de degradação de ácidos graxos e metabolismo de ácidos graxos, metabolismo de esfingolipídeos e glicerofosfolipídeos, bem como metabolismo de glicerofosfatidilinositol (Figuras suplementares 16-20).

Os ácidos graxos (AG) desenvolvem várias funções em seres humanos e outros organismos (Tvrzicka *et al.*, 2011). A composição de ácidos graxos sofre variações de acordo com as espécies, assim como tecidos nos organismos. Em tecidos de origem animal e vegetal, os ácidos graxos possuem 16 e 18 átomos de carbono, ou seja, palmítico, esteárico, oleico e linoleico. Olhando de um ponto de vista químico, os lipídeos são ésteres de AG com alcoóis orgânicos (colesterol, glicerol e esfingozina). Lipídeos são encontrados na corrente sanguínea sobre a forma de lipoproteínas, os quais são compostos por ésteres colesteróis, triacilglicerois e fosfolipídios (Tvrzicka *et al.*, 2011). Os AG sob a forma de fosfolipídios (principalmente de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiéline) formam todas as membranas celulares e são essenciais para a sua fluidez e a funcionalidade, nesse sentido, o metabolismo envolvendo a degradação desses ácidos graxos se mostra

importante, uma vez que a matriz celular é um dos principais alvos de proteínas de peçonhas e estes ácidos a compõem.

Vias de cascata de coagulação

KOs envolvidos em vias de cascata de coagulação também foram identificados nesse estudo. Foram encontrados para a espécie *P. falkneri* 5 KOs exclusivos envolvidos em vias de cascata de coagulação e 7 para *P. motoro*, por outro lado, foram encontrados 18 KOs envolvidos nessas vias que se mostraram compartilhadas em ambas (Tabela Suplementar 5 e Figura Suplementar 21). Esta via merece uma maior ênfase neste trabalho, uma vez que a peçonha de vários organismos atua na cascata de coagulação.

Em um indivíduo saudável, o sangue circula com grande fluidez, no entanto, a ocorrência de lesão vascular requer que o sangue gelifique rapidamente (hemostasia), formando um coágulo, a fim de evitar hemorragia. Quando o endotélio sofre algum dano, as plaquetas aderem ao subendotélio e ativam a cascata da coagulação, induzindo a produção de fibrina, que faz uma malha para a retenção das plaquetas, selando do local da lesão (Norris, 2003). Apesar da ativação quase instantânea do sistema hemostático ser necessária, para evitar a formação de coágulos de forma inadequada, resultando em complicações trombóticas, a capacidade de coagulação do sangue têm de ser cuidadosamente regulada. A ativação da cascata de coagulação é desencadeada através da liberação de fatores de tecido a partir do local da lesão e, na presença de superfícies de células pró-coagulantes, a produção de fibrina pode ser alcançada em poucos segundos (Norris, 2003). Tradicionalmente, duas vias principais têm sido descritos para a coagulação do sangue: a via intrínseca ou extrínseca de contato e a via do fator tecidual. A via intrínseca pode ser ativada quando o sangue entra em contato com uma superfície carregada negativamente, resultando na ativação do fator XII. No entanto, as deficiências em fator de XII não estão associadas com hemorragia e pode até mesmo ser associada com trombooses (Lammle *et al.*, 1991). Além disso, a ativação do fator IX pode ser alcançado tanto pelas vias extrínsecas quanto intrínsecas. A principal função do sistema intrínseco pode ser amplificar a ativação da coagulação desencadeada através da via do fator de tecido. A

via do fator de tecido é desencadeada quando a proteína do fator de tecido ligada à membrana (TF) entra em contato com o plasma que contém o fator VII (Bugge *et al.*, 1996). O fator de tecido não é normalmente expresso em células que entram em contato com o plasma, no entanto, após a lesão vascular, as células que expressam o fator tecidual estão expostas ao plasma e podem ligar-se o fator VII (Norris, 2003).

Possíveis transcritos presentes na peçonha de arraia

Fosfolipases

Fosfolipase A2

Grande parte dos transcritos identificados em ambas as amostras do ferrão das arraias foram identificadas como fosfolipases A2 (Tabela 2).

Tabela 2. Transcritos encontrados relacionados às classes de fosfolipases.

		<i>Fosfolipases</i>	
		<i>Potamotrygon motoro</i>	<i>Potamotrygon falkneri</i>
<i>Transcritos</i>	KO		
<i>Fosfolipases A2</i>	K01047	X	X
<i>Fosfolipases D</i>	K01115	X	X
<i>Fosfolipases A1</i>	K13619	X	X

Fosfolipases A2 são enzimas que hidrolisam glicerofosfolídeos na posição sn-2 e são distribuídas em muitos grupos na natureza (Schaloske and Dennis, 2006). Elas são proteínas ricas em cisteínas que contém 119-134 aminoácidos e dividem estruturas e funções similares, cerca de 50% dos resíduos de aminoácidos são incorporados em α -hélices e cerca de 10% em folhas betas e quatorze cisteínas conservadas formando 7 pontes dissulfeto mantendo a estrutura tridimensional estável (Samy *et al.*, 2012). Os primeiros esforços na caracterização dessas enzimas podem ser encontrados nas primeiras décadas do século passado, onde, grandes avanços foram realizados por grupos distribuídos por todo o mundo para desvendar o mecanismo de

ação dessas enzimas, principalmente em relação ao bloqueio das transmissões neuromusculares e na indução de lesão muscular aguda, que são as duas grandes manifestações clínicas em humanos envolvendo acidentes com animais que possuem fosfolipases A2 em seu arsenal (Warrell, 2012). Quase todas as fosfolipases A2 contêm um grupo conservado de um *loop* ligante Ca^{2+} (XCGXGG) e um sítio catalítico (DXCCXXHD) (Dennis *et al.*, 2011). A superfamília de fosfolipases A2 geralmente incluem seis tipos (secretadas, citosolicas, independentes de cálcio, hidrolases PAF-acetil, associadas a lipoproteínas e lisossomais). As fosfolipases de serpentes foram as primeiras descritas, e existem 3 grandes grupos de fosfolipases de animais baseadas em suas distribuições de pontes dissulfeto (Lomonte and Rangel, 2012).

Todas as fosfolipases A2 do grupo 1 são encontradas em serpentes elapídicas, por outro lado as do grupo 2 quase que em sua totalidade são encontradas em serpentes viperídicas, esse grupo difere na posição de uma ponte dissulfeto das sete presentes e pela presença de uma extensão curta no C terminal (Lomonte and Rangel, 2012). Por outro lado, o grupo 3 possui uma grande diferença em relação ao grupo 1 e 2 (Scott *et al.*, 1990), e incluem enzimas presentes em peçonhas de artrópodes, como abelhas e escorpiões. O grupo 1 de fosfolipases que são pertencentes aos elapídeos e secreção pancreática de mamíferos possuem sete pontes dissulfeto, Cys11-72, Cys27-Cys119, Cys29-Cys45, Cys44-Cys100, Cys51-Cys93, Cys61-Cys86 e Cys79-Cys91 (Kang *et al.*, 2011). Até o presente, as estruturas cristalinas dos vários grupos de fosfolipases já foram elucidadas, as estruturas consistem em um N terminal com uma hélice H1 (dos resíduos 2-12), hélice H2 (dos resíduos 40-55) e hélice H3 (dos resíduos 86-103). Além disso, as outras duas hélices curtas envolvem os resíduos 19-22 (SH4) e 108-110 (SH5) (Kang *et al.*, 2011). Existem também uma β -wings com duas cadeias curtas de folhas beta antiparalelas (70-74 e 76-79) (Kang *et al.*, 2011).

Fosfolipase D

Essa classe de fosfolipases foram encontradas em ambas as amostras (Tabela 2).

As fosfolipases D foram descobertas primeiramente em plantas com uma atividade distinta de fosfodiesterase fosfolípido específica, que hidrolisa fosfatidilcolina (PC) em ácido fosfatídico e colina, no entanto, o interesse nessa enzima só teve atenção quando se demonstrou, em experimentos com cultura celular, sua rápida ativação e rápida resposta a estímulos celulares (Cockcroft, 1984). Esses estudos foram revisados por Exton (1990) e Billah and Anthes (1990) indicando que as PLD são fosfolipases genuinamente ativadoras de sinais. Como tal, elas foram agrupadas junto com as fosfolipases C, fosfolipases A2 e as esfingomielinases, todas estas sendo enzimas que degradam fosfolídeos que geram produtos biologicamente ativos, e que desempenham funções importantes na regulação da célula (Liscovitch and Cantley, 1994). As fosfolipases ativadoras de sinal junto com as quinases lipídicas representam a base molecular para um rápido crescimento na área de sinalização lipídica (Liscovitch and Cantley, 1994). A atividade destas enzimas é estimulada quando se dá a ligação do receptor pelos agonistas, resultando na alteração de vários componentes lipídicos da membrana, quer pela degradação ou por fosforilação, e a geração de um ou mais produtos “mensageiros” que são capazes de recrutar ou modular proteínas-alvo específicas (Liscovitch *et al.*, 2000).

As PLDs são relativamente pouco estudadas, mas um grande interesse pode ser dado as PLDs que utilizam lisofosfolípidios como substrato. PLDs dependentes de Mg^{2+} que degradam lisofosfolídeos foram primeiramente identificadas em microssomas de cérebro de ratos, e posteriormente, em microssomas de outros tecidos (Wykle *et al.*, 1977). Um PLD dependente de Ca^{2+} foi encontrado em microssomas de medula renal de coelhos (Kawasaki and Snyder, 1987). Ambas as enzimas hidrolisam um éster específico ligado a lisofosfatidilcolina e lisofosfatidiletolamina. As propriedades destas enzimas e as suas possíveis funções do metabolismo fosfoacilglicerol foram revistos (Wykle and Strum, 1991). Além disso, até agora não houve nenhuma evidência de ativação liso-PLD por estímulos extracelulares. O produto de liso-PLD é o ácido lisofosfatídico (liso-PA), um hormônio extracelular multifuncional cujos mecanismos de formação não são totalmente claros. Liso-PLDs pode muito bem contribuir para a geração de liso-PA no corpo, mas a confirmação dessa especulação exige uma melhor investigação (Liscovitch *et al.*, 2000).

Fosfolipase A1

Esta classe de fosfolipases foi encontrada em ambas as amostras (Tabela 2). As fosfolipases A1 (PLA1) também conhecidas como fosfolipases DDHD1 também são pouco abordadas no meio científico, elas hidrolisam as ligações éster dos fosfolipídios na posição sn-1 produzindo 2 - acil-lisofosfolípidos e ácidos graxos (Aoki *et al.*, 2007). Além de ter atividade na hidrolise de fosfatidil colina (PC) e lisofosfatidil colina (Aoki *et al.*, 2002). As PLA1 tiveram suas atividades detectadas em muitos tipos celulares e tecidos diferentes, tais como, plaquetas de ratos (Sato *et al.*, 1997), cérebro bovino (Pete *et al.*, 1994) e unicamente até o presente, em peçonhas de himenopteras (Soldatova *et al.*, 1993). Em contraste com outras fosfolipases como a C e a A2, as PLA1 são restritamente conhecidas. Recentemente, várias isoenzimas PLA1 foram identificadas e muito se aprendeu sobre a estrutura e função molecular de PLA1s. Todas as PLA1s extracelulares pertencem ao gene das famílias das lipases pancreáticas, esse gene se mantém conservado em organismos de insetos a mamíferos (Carriere *et al.*, 1998). Os estudos cristalográfico de lipases pancreáticas humanas, mostram que cada lipase é composta de dois domínios (domínios amino-(N-) e carboxy (C-) terminais), os domínios N terminais são essenciais para as atividades catalíticas, uma vez que, os resíduos de aminoácidos responsáveis pela catálise (Ser, Asp e His) estão dispostos no N-terminal, curiosamente, todas as moléculas de lipase semelhantes às observadas em insetos (*Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori* e zangão) tem apenas o domínio N terminal (Soldatova *et al.*, 1993). Adicionalmente, resíduos de cisteínas conservadas são localizadas nos domínios N terminais, formando pontes disulfeto. Embora o N terminal seja bem conhecido, o C terminal ainda é pouco conhecido, no entanto, os domínios C-terminais de algumas lipases têm sido implicados na regulação da atividade catalítica (Aoki *et al.*, 2007). A estrutura terciária das PLA1 tem um *loop* chamado de *lids* e *loops* β 9. Esses *loops* são curtos (resíduos de 7-12) nos *lids* e (resíduos de 12-13) nos β 9. Em comparação com lipases que possuem longos *lids* e β 9, as PLA1 demonstram ser, através de seus curtos *loops*, a chave da atividade desta enzima (Carriere *et al.*, 1998).

Metaloproteinasas

Colagenases

Esse grupo de metaloproteinasas é composto por 3 grupos (matriz metaloproteínase 1 (MMP-1), 8 (MMP-8) e 13 (MMP-13)) que foram nomeados como colagenases 1, 2 e 3, respectivamente. Esta classe de metaloproteinasas foi encontrada em ambas as espécies, esses grupos de metaloproteinasas possuem a capacidade de clivar colágenos de tripla hélice em fragmentos característicos de 3/4 e 1/4 (Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010). Dois desse grupos foram identificados nesse trabalho, no entanto, somente a MMP-1 (Colagenase 1) foi identificada nas análises de *P. falkneri*, e as MMP-13 (Colagenases 3) foram identificadas em ambas as espécies, *P. falkneri* e *P. motoro* (Tabela 3).

Tabela 3. Transcritos encontrados relacionados às classes de metaloproteinasas.

Metaloproteinasas			
		<i>Potamotrygon falkneri</i>	<i>Potamotrygon motoro</i>
Transcritos	KO		
<i>Colagenase 1</i>	K01388	X	-
<i>Colagenase 3</i>	K07994	X	X
<i>Estromelina 2</i>	K01396	X	-
<i>Macrofago elastase</i>	K01413	X	-
<i>Enamelinas</i>	K07999	X	-
<i>Metaloproteínase 27</i>	K08005	X	-
<i>Gelatinase A</i>	K01398	X	X
<i>Gelatinase B</i>	K01403	X	X
<i>Epilinas</i>	K08006	X	X
<i>Metalopeptidase MepB</i>	K13726	X	X

As colagenases 1 são as colagenases principais capazes de degradar fibras de colágeno tipo III, I e II em um sítio específico 3/4 a partir do N terminal, esse tipo de colagenase é produzida por diversos tipos celulares, como fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, macrófagos, hepatócitos, condrócitos e osteoblastos (Visse and Nagase, 2003). Além da capacidade de clivagem, as colagenases são capazes de processar proteoliticamente outras

proteínas da matriz extracelular (ECM), assim como uma série de moléculas bioativas, como interleucina 8 (Tester *et al.*, 2007), fatores de necrose tumoral (TNF- α) (Gearing *et al.*, 1994), ativadores do receptor 1 de proteinases (Boire *et al.*, 2005) e vários fatores de ligação de proteínas do tipo insulina (Overall, 2002). Com a retirada do domínio hemopexina dessas MMPs, elas se transformam em enzimas capazes de degradar colágeno nativo, sugerindo que a cooperação entre o domínio catalítico e a hemopexina são essenciais para a sua atividade colagenolítica (Murphy and Knauper, 1997). Por outro lado, colagenases do tipo III clivam colágenos do tipo II mais eficientemente que colágenos do tipo I e III. Além disso, eles apresentam uma maior atividade gelatinolítica quando comparado a MMP-1 e MMP-8 (Amalinei *et al.*, 2007).

Gelatinases

Outras metaloproteinases encontradas nesse estudo para ambas as espécies foram as metaloproteinases matrizes -2 (MMP-2) e -9 (MMP-9) também conhecidas como gelatinase A e gelatinase B, respectivamente, (Tabela 3). Ambas são constitutivamente expressas por diversos tipos celulares, incluindo fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, condrócitos e monócitos no caso da MMP-2, e macrófagos alveolares, leucócitos polimorfonucleares e osteoclastos no caso da MMP-9 (Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010). Essas duas MMPs possuem um domínio de fibronectina localizado dentro do domínio catalítico, esse domínio permite a ligação e o processamento de gelatina ou colágeno desnaturados. (Gomis-Ruth, 2009), sugerindo também que essas MMPs podem remodelar os colágenos das ECM. Essas gelatinases tem a capacidade de degradação de uma gama de moléculas da matrix extracelular (ECM), tais como; colágenos do tipo I, IV, V, VII, IX, X, elastinas, fibronectina, agrecanas, vitronectinas e laminas (Overall, 2002). Elas não são capazes de degradar somente componentes de ECM, elas também podem degradar Pro-TNF- α (Gearing *et al.*, 1994), pro-IL-1 β , pro-IL-8 e proteínas de monócitos quimioatrativos (Fu *et al.*, 2009). Desta forma, essas enzimas são capazes de liberar vários fatores com propriedades pro ou anti angiogênicos (Egeblad and Werb, 2002). Além disso, ambas as gelatinases têm sido associadas a diversas patologias, incluindo cancro, doenças ósseas,

doenças inflamatórias e vasculares, tais como aterosclerose, aneurisma da aorta e enfarte do miocárdio (Hu *et al.*, 2007).

Estromalisina

Estromalisina 2 é um outro tipo de metaloproteinase identificada neste trabalho somente para a espécie *P. falkneri*, e são conhecidas também como metaloproteinase matriz -10 (Tabela 3). Essas estromalisinas mostram basicamente o mesmo desenho estrutural das colagenases, podendo degradar muitos componentes da ECM, entretanto elas não possuem a capacidade de degradar colágeno nativo (Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010). Apesar disso, elas degradam colágeno tipo IV, V, IX e X, além de proteoglicanas, gelatina, fibronectina, laminina e fibrilina-1 (Amalinei *et al.*, 2007). De certa forma, as estromalisinas tem participação na ativação das pro MMP, através da sua capacidade de remover o domínio propeptídeo de três procolagenases (Barksby *et al.*, 2006) e pro MMP-9 (Geurts *et al.*, 2008), gerando a forma totalmente ativa dessa enzima. As estromalisinas são expressas por fibroblastos e células epiteliais, e são secretadas para o espaço extracelular, onde desempenham um importante papel em processos biológicos, como desenvolvimento de glândulas mamárias, imunidade e cicatrização de feridas (Page-McCaw *et al.*, 2007).

Outras metaloproteinases

Outros integrantes das classes de metaloproteinases encontradas nesse trabalho, porém, somente para *P. falkneri*, foram as metaloproteinases matrizes -12 (MMP-12), também conhecidas como macrófago elastases (Tabela 3). Essa MMP12 não é classificada dentro de um grande subgrupo de MMPs devido a sua divergência de sequência e especificidade de substrato (Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010). As MMP-12 ainda são conhecidas como metaloelastases e são as que apresentam a maior atividade elastolítica, assim como as outras MMPs, estas também são capazes de degradar diversos outros componentes da ECM, tais como, agrecanas, fibronectinas, lamininas e colágeno tipo IV (Overall, 2002), além de elastina, vitronectina, proteoglicanas,

proteína de mielina básica e α 1-antitripsina (Amalinei *et al.*, 2007). Essas MMPs-12 são comumente expressas por macrófagos (Shapiro *et al.*, 1993), porém são produzidas também por condrócitos hipertróficos e osteoclastos (Hou *et al.*, 2004).

As metaloproteinases matrizes -20 (MMP-20) (Enamelisinas) também foram identificadas neste trabalho para *P. falkneri* (Tabela 9). Essas MMPs foram nomeadas assim, pois sua primeira identificação foram no órgão suíno enamel (órgão dental), essas MMPs são secretadas por ameloblastos e odontoblastos da papila dental e estão envolvidas na formação do esmalte dental (Llano *et al.*, 1997). São capazes de degradar amelogenina (Amalinei *et al.*, 2007).

Metaloproteinases Matrizes -27 (MMP-27) também foram identificadas neste trabalho para *P. falkneri*. Foram primeiramente clonadas de fibroblastos embrionários de galinhas (Yang and Kurkinen, 1998). Vem sendo reportadas que essas enzimas possuem a capacidade de degradar gelatina e caseína. Estas podem ser expressas em tecidos intactos como testículos, intestino, pulmão e pele, sugerindo que o papel dessas MMPs nesses tecidos pode manter a homeostase (Amalinei *et al.*, 2007). Especulações dizem que essas MMPs participam da defesa desses tecidos, através do processamento de peptídeos antimicrobianos (Amalinei *et al.*, 2007).

MMP secretada

Por fim, as últimas MMPs descritas nesse trabalho foram as metaloproteinases matrizes -28 (MMP-28), também conhecidas como epilisinas, essas foram identificadas para ambas as espécies (Tabela 3). Ao contrário das outras MMPs secretadas, as MMPs-28 tem seu processamento intracelularmente através de proteinases de furina e secretadas posteriormente, em sua forma ativa (Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010). MMPs-28 são expressão em vários tecidos diferentes, como, testículos, pulmão, coração, cólon, intestino, cérebro e epiderme (Lohi *et al.*, 2001). Alguns trabalhos reportam que essas MMPs estão envolvidas como mediadores de certas doenças do sistema nervoso central, como a esclerose múltipla, desempenhando um papel na desmielinização (Werner *et al.*, 2008).

Metalopeptidase MepB

Neste trabalho, pôde também ser identificada, através dos transcritos, a proteína metalopeptidase MepB, em ambas as espécies de arraias (Tabela 3). Essa metalopeptidase MepB é uma enzima primeiramente purificada por Ibrahim-Granet e colaboradores (1997), como sendo uma metaloproteínase intracelular de 85 kDa capaz de hidrolisar colágeno tipo I nativo. Uma atividade semelhante foi identificada por uma ampla variedade de fungos patogênicos, sugerindo que essas proteínas possam estar envolvidas em mecanismos celulares conservados (Ibrahim-Granet *et al.*, 1996). Devido a essa habilidade de clivar colágeno nativo, foi especulado durante algum tempo que estas proteínas poderiam estar envolvidas no catabolismo fisiológico de colágeno durante infecção, e além disso elas pertencem à família das collagenases intersticiais (Rawlings and Barrett, 1995). Essa família é uma das maiores famílias de metalopeptidases, incluindo uma grande variedade de enzimas derivadas de bactérias, plantas e animais (Ibrahim-Granet and D'Enfert, 1997). Essas endopeptidases secretadas em animais são chamadas de matrixinas, e estão envolvidas na degradação proteolítica de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular (Dioszegi *et al.*, 1995).

As desintegrinas e metaloproteína (ADAM)

Desintegrina 10

Essas desintegrinas 10 (ADAM 10) possuem uma estreita relação com as enzimas de peçonhas de serpentes que demonstram ser capazes de clivar colágeno tipo IV. Elas foram encontradas em ambas as espécies (Tabela 4).

Tabela 4. Transcritos encontrados relacionados às classes de desintegrinas.

Desintegrina e metaloproteína (ADAM)

		<i>Potamotrygon falkneri</i>	<i>Potamotrygon motoro</i>
Transcritos	KO		
<i>Desintegrina 10</i>	K06704	X	X
<i>Desintegrina 12</i>	K06835	X	X
<i>Desintegrina 15</i>	K06836	X	X

O trabalho desenvolvido por Millichip e colaboradores (1998) isolou uma ADAM 10 do rim de bovinos que demonstrou ser capaz de clivar colágeno tipo IV da membrana basal. Essa proteína foi isolada por eletroforese com um epítipo específico para colágeno tipo IV. A demonstração de que uma metalodesintegrina exibe uma atividade de collagenase tipo IV pode ser relevante para a metástase de tumores e podem também ter relevância geral para remodelação extracelular na patologia renal, além disso, podem também ser importante para outros estados patológicos, em que há o comprometimento da membrana basal (Millichip *et al.*, 1998). Por sua vez, essas proteínas podem ajudar também no comprometimento de acidentes causados por arraias.

Desintegrina 12

As desintegrinas e metaloproteínas 12 (ADAM 12) são membros da família desintegrinas contendo metaloproteinases, que são associadas a várias doenças. Essas proteínas também possuem a capacidade de degradar algumas proteínas de membrana como demonstrado por Roy e colaboradores (2004), e foram identificadas em ambas as espécies.

Roy isolou uma ADAM 12 de pacientes com câncer na mama, onde quatro fragmentos foram identificados como pertencentes a essas desintegrinas, posteriormente, análises de *imunoblotting* foram realizadas para a detecção da ADAM 12 que se encontrava numa banda de 68 kDa em um gel unidimensional. Posteriormente, essas desintegrinas e metaloproteínas 12 foram testadas contra substratos diferentes, mostrando que tais proteínas apresentam ação proteolítica contra gelatina, colágeno tipo IV, e fibronectina,

porém não mostrou atividade contra caseína e colágeno tipo I (Roy *et al.*, 2004). Sendo assim, essas proteínas podem estar responsáveis também pela ação na matriz celular *in vivo* causando danos nos acidentes com araias.

Desintegrina 15

Essa desintegrina somente foi encontrada nas análises dos transcritos de *P. falkneri* (Tabela 4). As desintegrinas 15 (ADAM 15) são os únicos membros da família ADAM com a ligação integrina Arg-Gly-Asp (RGD) no seu domínio tipo integrina (Lu *et al.*, 2010). Estas integrinas com esses domínios também são encontradas na maioria das desintegrinas de peçonha de serpentes e outras proteínas semelhantes a desintegrina. Essa proteínas também estão relacionadas a vários tipos de doenças, porém Sun e colaboradores (2010) mostraram que essas proteínas regulam a permeabilidade endotelial e podem ser consideradas uma chave nos processos celulares e para o desenvolvimento de desordem inflamatória, ou seja, pode mtambém estar envolvida no processo inflamatório causado pelos acidentes com araias.

Caspases

Caspase 2

As caspases 2 foram identificadas nos transcritos de ambas as espécies de araias (Tabela 5). As capazes são proteinases que catalisam ligações peptídicas após o resíduo de ácido aspártico.

Tabela 5. Transcritos encontrados relacionados as classes de caspases.

		Caspases	
		<i>Potamotrygon falkneri</i>	<i>Potamotrygon motoro</i>
Transcritos	KO		
Caspases 2	K02186	X	X
Caspases 6	K04396	X	X
Caspases 7	K04397	X	X
Caspases 8	K04398	X	X
Caspases 9	K04399	X	X
Caspases 10	K04400	-	X

As caspases 2 foram primeiramente identificadas em mamíferos. Esta enzima se mostra única por suas características como iniciadoras e efetoras de caspases. A caspase 2 parece ser iniciadora necessária para o desencadeamento da apoptose causada por vários insultos, incluindo danos no DNA, administração de TNF e diferentes patógenos e vírus (Zhivotovsky and Orrenius, 2005). As caspases 2 são altamente distribuídas em vários tecidos e tipos celulares diferentes, podendo ser encontrada no núcleo, citoplasma e em grande quantidade no complexo de Golgi (Fan *et al.*, 2005). Sendo assim, estudos demonstram que as caspases 2 atuam como um indutor de apoptose em vários tipos celulares (Fan *et al.*, 2005). Um estudo desenvolvido por Paroni e colaboradores (2002), mostrou que, na fase inicial da apoptose, as caspases 2 no interior do núcleo, poderiam ocasionar uma disfunção mitocondrial sem estar presentes no citosol da célula (Paroni *et al.*, 2002). No entanto, a caspase-2 não é necessária para a apoptose neuronal ou de timócitos, sendo provável que outra caspase complemente o papel da caspase-2 nestas células (O'Reilly *et al.*, 2002).

Caspases 6 e 7

Ambas as bibliotecas apresentaram essas duas caspases (Tabela 5). A característica estrutural dessas caspases é compartilhada. Elas possuem um predomínio curto conectado com uma região catalítica de caspases (CAsC).

Esta propriedade sugere que eles são incapazes de formar um complexo com outras moléculas através do seu pró-domínio, e para assumir suas formas ativas, outras caspases devem processá-las (Fan *et al.*, 2005). Essas moléculas atuam principalmente como executores da apoptose. Embora as capazes 6 atuem juntamente com as caspases iniciadoras, os substratos dessas enzimas são restritos a poucas proteínas, incluindo a laminina A (Takahashi *et al.*, 1996; Wolf and Green, 1999). As lamininas nucleares, o principal componente estrutural do citoesqueleto do núcleo, são clivados pela caspase-6 durante o processo de apoptose (Lazebnik *et al.*, 1995).

Caspases 9

Essa caspase foi identificada para ambas as amostras (Tabela 5). As caspases 9 foram isoladas como caspases iniciadora contendo um domínio de recrutamento de caspase (CARD) no N-terminal. Essas caspases desempenham um importante papel na via de morte celular mediada por mitocôndrias (via intrínseca) (Li *et al.*, 1997), gerando caspases efetoras ativas através da cascata. Por outro lado, as caspases 9 parecem desempenhar um papel importante na apoptose induzida por dexametasona, agentes quimioterapêuticos e γ -irradiação, mas não em apoptose ativada por estimulação de receptor de morte (Kuida *et al.*, 1998).

Caspases 8 e 10

Para essas caspases, neste estudo foram identificados transcritos de caspase 8 para ambas as espécies e caspase 10 somente nos transcritos de *P. motoro* (Tabela 5). As caspases 8 carregam um domínio efetor de morte (DED) em *tandem* no seu domínio amino terminal e um domínio CASc no seu carboxi terminal (Boldin *et al.*, 1996). Essas caspases são proteinases chaves na indução da apoptose mediada por receptores de morte da superfície celular como por exemplo os Fas (APO-1/CD95) em mamíferos (Fan *et al.*, 2005). Assim como as caspases 8, as caspases 10 também possuem os domínios DED e CASc, e sua estrutura é semelhante às das caspases 8. Embora as caspases 8 possuam um papel já estabelecido na indução de apoptose

mediada por receptores de morte, a função da caspase 10 ainda não se mostrou bem estabelecida (Fischer *et al.*, 2006). Apesar da sobreposição de aparente função entre essas duas caspases, foi demonstrado que em células T elas desempenham papéis diferentes (Chun *et al.*, 2002), além disso, há hipóteses de que essas duas caspases são moléculas filogeneticamente relacionadas.

Neuromedina U

Para este peptídeo foi encontrado somente um transcrito nas amostras de *P. motoro*. Os peptídeos neuromedinas U (NmU), são neuropeptídeos multifuncionais que foram primeiramente isolados da medula espinal de suínos e foi nomeado assim devido a sua potente atividade como indutor de contração uterina (Budhiraja and Chugh, 2009). Eles pertencem a uma nova classe de neuropeptídeos chamados de neuromedinas, as quais estão inseridas as neuromedinas B, C, K, L, N e U (Budhiraja and Chugh, 2009). A neuromedina é um peptídeo altamente conservado em cérebro e intestino e presente em uma grande variedade de animais, de mamíferos a anfíbios. Tal peptídeo apresenta uma enorme homologia em sua sequência de aminoácidos, em diferentes espécies, indicando que seu papel pode ser essencial (Budhiraja and Chugh, 2009; Holmgren and Jensen, 2001). Uma gama de atividades tem sido atribuídas ao NmU, tendo como atividades dos sistema nervoso periférico, contração do músculo liso, elevação da pressão arterial, nocicepção, inflamação, formação óssea, e modificação de transporte de íons intestinal, por outro lado, como atividades sistema nervoso central, o NmU suprime a alimentação e afeta a liberação de hormônios, como por exemplo o hormônio luteinizante (LH) (Budhiraja and Chugh, 2009). NmU, pode além disso, desempenhar um papel em doenças como a dor neuropática, câncer, obesidade, disfunção do sistema imunológico, condições de estresse, *jet lag*, osteoporose e distúrbios da contração do músculo liso no trato gastrointestinal e geniturinário.

Outras proteínas

1-alkil-2-acetilglicerofosfocolina esterase

A enzima 1-alkyl-2-acetyl glycerophosphocholine esterase foi identificada, neste trabalho, para ambas as espécies. Essas proteínas também são conhecidas como lipoproteínas associadas à fosfolipases A2 (Lp-PLA2), PAFAD; PAFAH; LDL-PLA2. Estas proteínas são o único membro da superfamília PLA2 que possuem quinze grupos separados e identificados além de numerosos subgrupos. Essas enzimas também são caracterizadas por sua habilidade de hidrolisar as ligações sn-2 de fosfolipídios, e são atribuídas a determinados grupos de acordo com seu padrão de massa molecular, padrões de ligação de dissulfeto, exigência de Ca^{2+} , e outras características (Rosenson and Stafforini, 2012). Dentro dos grupos de PLA2, as LP-PLA2 foram classificadas como o grupo VIIA (PLAG7). Essa enzima hidrolisa grupos acetil na posição sn-2 de fatores de agregação plaquetária (PAF), gerando liso-PAF e acetato (Farr *et al.*, 1980). Lp-PLA2 é produzido principalmente pelos macrófagos e circula no plasma na forma ativa como um complexo com LDL e HDL (Stafforini *et al.*, 1987). Essas enzimas Lp-PLA2 Ca^{2+} independentes, possuem 45 kDa. A análise do gene PLAG7 que codifica a LP-PLA2 revelou a presença de um motivo GX SXG, que é característico de lipases neutras e serino esterases. Essa enzima também abriga uma tríade catalítica constituída por serina / aspartato / histidina cuja orientação linear e espaçamento se mostra consistente com a conformação α/β hidrolases de lipases neutras e serino esterases (Tjoelker *et al.*, 1995). Em contraste com a maioria das atividades PLA2 que iniciam a transdução de sinal e são reguladas pelo estado de ativação celular, as Lp -PLA2 não são reguladas de forma aguda (Prescott *et al.*, 2000). Esta característica, combinada com a independência Ca^{2+} , poderia ameaçar a integridade dos componentes de fosfolipídios das membranas celulares e lipoproteínas (Stafforini, 2009). Uma outra característica dessas Lp-PLA2 é a sua associação com lipoproteínas incluindo HDL e LDL, porém a ligação da Lp-PLA2 ao LDL requer um W115 e L116, que estão alocados na região composta pelos aminoácidos mais hidrofóbicos (Papavasiliou *et al.*, 2006; Stafforini *et al.*, 1999). Estudos recentes mostram

que esses resíduos de aminoácidos mediam a entrada dessa enzima na superfície da membrana lipídica, e que eles são de grande importância para a ligação das Lp-PLA2s às superfícies hidrofóbicas (Cao *et al.*, 2011). Além disso, a tirosina 205, um resíduo que se mostra conservado entre ortólogos de Lp-PLA2, que se associam com partículas endógenas de LDL, também é necessário para a associação com o LDL (Stafforini *et al.*, 1999). Em estudos recentes, observou-se que, a região carboxi terminal de aminoácidos (H367–K370) únicos para Lp-PLA2 em humanos são necessários para a associação com HDL (Gardner *et al.*, 2008).

Conclusão

Neste trabalho, foi utilizado o sequenciamento de última geração, para exploração do conteúdo produzido pelo ferrão de duas espécies de arraias de água doce, *P. falkneri* e *P. motoro*. Os dados obtidos puderam corroborar com outros trabalhos que esta técnica é de grande valia para as análises de uma fonte produtora de toxinas, mesmo essa, não possuindo um banco de dados com uma espécie de referência. Os resultados puderam demonstrar que os transcritos dos ferrões de ambas as espécies são muito parecidos, indicando que há uma diferença diminuta entre essas duas espécies, onde, todas as classes se mostraram com uma distribuição muito aproximada em questão de porcentagem de expressão. Apesar da classe de transcritos que não podia ser classificada em uma via biológica exata ter sido a mais expressa no trabalho, em especial devido ao fato da falta de uma referência adequada, o metabolismo, que se mostra de grande importância, também se mostrou muito aparente. Assim, isto pode nos levar a inferência de que esse metabolismo pode estar envolvido na produção de toxinas, uma vez que, no tecido em análise, as glândulas produtoras de toxinas se apresentam em grande maioria. Por fim, transcritos identificados como sendo característicos de toxinas em outros tipos de animais também puderam ser identificados, corroborando com a sintomatologia típica de acidentes causados por essas espécies de animais. Onde as proteínas apresentadas são responsáveis por dano tecidual, como necrose, levando conseqüentemente a uma dor elevada

Referências Bibliográficas

- Aird, S.D., Watanabe, Y., Villar-Briones, A., Roy, M.C., Terada, K., Mikheyev, A.S., 2013. Quantitative high-throughput profiling of snake venom gland transcriptomes and proteomes (*Ovophis okinavensis* and *Protobothrops flavoviridis*). *BMC genomics* 14, 790.
- Amalinei, C., Caruntu, I.D., Balan, R.A., 2007. Biology of metalloproteinases. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* 48, 323-334.
- Aoki, J., Inoue, A., Makide, K., Saiki, N., Arai, H., 2007. Structure and function of extracellular phospholipase A1 belonging to the pancreatic lipase gene family. *Biochimie* 89, 197-204.
- Aoki, J., Nagai, Y., Hosono, H., Inoue, K., Arai, H., 2002. Structure and function of phosphatidylserine-specific phospholipase A1. *Biochimica et biophysica acta* 1582, 26-32.
- Baker, D., 2009. Advances in protein–amino acid nutrition of poultry. *Amino acids* 37, 29-41.
- Barksby, H.E., Milner, J.M., Patterson, A.M., Peake, N.J., Hui, W., Robson, T., Lakey, R., Middleton, J., Cawston, T.E., Richards, C.D., Rowan, A.D., 2006. Matrix metalloproteinase 10 promotion of collagenolysis via procollagenase activation: implications for cartilage degradation in arthritis. *Arthritis and rheumatism* 54, 3244-3253.
- Billah, M.M., Anthes, J.C., 1990. The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. *The Biochemical journal* 269, 281-291.
- Blachier, F., Mariotti, F., Huneau, J.F., Tome, D., 2007. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino acids* 33, 547-562.
- Boire, A., Covic, L., Agarwal, A., Jacques, S., Sherifi, S., Kuliopulos, A., 2005. PAR1 is a matrix metalloproteinase-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* 120, 303-313.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., Wallach, D., 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.

- Bouzid, W., Klopp, C., Verdenaud, M., Ducancel, F., Vetillard, A., 2013. Profiling the venom gland transcriptome of *Tetramorium bicarinatum* (Hymenoptera: *Formicidae*): the first transcriptome analysis of an ant species. *Toxicon* 70, 70-81.
- Budhiraja, S., Chugh, A., 2009. Neuromedin U: physiology, pharmacology and therapeutic potential. *Fundamental & clinical pharmacology* 23, 149-157.
- Bugge, T.H., Xiao, Q., Kombrinck, K.W., Flick, M.J., Holmback, K., Danton, M.J., Colbert, M.C., Witte, D.P., Fujikawa, K., Davie, E.W., Degen, J.L., 1996. Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 6258-6263.
- Busto, E., Gotor-Fernandez, V., Gotor, V., 2010. Hydrolases: catalytically promiscuous enzymes for non-conventional reactions in organic synthesis. *Chemical Society reviews* 39, 4504-4523.
- Cao, J., Hsu, Y.H., Li, S., Woods, V.L., Dennis, E.A., 2011. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) interacts with phospholipid vesicles via a surface-disposed hydrophobic alpha-helix. *Biochemistry* 50, 5314-5321.
- Carriere, F., Withers-Martinez, C., van Tilbeurgh, H., Roussel, A., Cambillau, C., Verger, R., 1998. Structural basis for the substrate selectivity of pancreatic lipases and some related proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1376, 417-432.
- Chevreux, B., Pfisterer, T., Drescher, B., Driesel, A.J., Muller, W.E., Wetter, T., Suhai, S., 2004. Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. *Genome research* 14, 1147-1159.
- Chun, H.J., Zheng, L., Ahmad, M., Wang, J., Speirs, C.K., Siegel, R.M., Dale, J.K., Puck, J., Davis, J., Hall, C.G., Skoda-Smith, S., Atkinson, T.P., Straus, S.E., Lenardo, M.J., 2002. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419, 395-399.

- Cockcroft, S., 1984. Ca²⁺-dependent conversion of phosphatidylinositol to phosphatidate in neutrophils stimulated with fMet-Leu-Phe or ionophore A23187. *Biochimica et biophysica acta* 795, 37-46.
- Compagno, L., Roberts, T., 1982. Freshwater stingrays (*Dasyatidae*) of Southeast Asia and New Guinea, with description of a new species of *Himantura* and reports of unidentified species. *Environmental Biology of Fishes* 7, 321-339.
- Conceicao, K., Konno, K., Melo, R.L., Marques, E.E., Hiruma-Lima, C.A., Lima, C., Richardson, M., Pimenta, D.C., Lopes-Ferreira, M., 2006. Orpotrin: a novel vasoconstrictor peptide from the venom of the Brazilian stingray *Potamotrygon gr. orbignyi*. *Peptides* 27, 3039-3046.
- Conceicao, K., Santos, J.M., Bruni, F.M., Klitzke, C.F., Marques, E.E., Borges, M.H., Melo, R.L., Fernandez, J.H., Lopes-Ferreira, M., 2009. Characterization of a new bioactive peptide from *Potamotrygon gr. orbignyi* freshwater stingray venom. *Peptides* 30, 2191-2199.
- Dalziel, M., Crispin, M., Scanlan, C.N., Zitzmann, N., Dwek, R.A., 2014. Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation. *Science* 343, 1235681.
- Demain, A.L., Fang, A., 2000. The natural functions of secondary metabolites. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 69, 1-39.
- Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.H., Magrioti, V., Kokotos, G., 2011. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chemical reviews* 111, 6130-6185.
- Dioszegi, M., Cannon, P., Van Wart, H.E., 1995. Vertebrate collagenases. *Methods in enzymology* 248, 413-431.
- Egeblad, M., Werb, Z., 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature reviews. Cancer* 2, 161-174.
- Elango, R., Ball, R., Pencharz, P., 2009. Amino acid requirements in humans: with a special emphasis on the metabolic availability of amino acids. *Amino acids* 37, 19-27.

- Exton, J.H., 1990. Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *The Journal of biological chemistry* 265, 1-4.
- Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., Liang, J., 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 37, 719-727.
- Fanjul-Fernandez, M., Folgueras, A.R., Cabrera, S., Lopez-Otin, C., 2010. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochimica et biophysica acta* 1803, 3-19.
- Farr, R.S., Cox, C.P., Wardlow, M.L., Jorgensen, R., 1980. Preliminary studies of an acid-labile factor (ALF) in human sera that inactivates platelet-activating factor (PAF). *Clinical Immunology and Immunopathology* 15, 318-330.
- Fenner, P.J., Williamson, J.A., Skinner, R.A., 1989. Fatal and non-fatal stingray envenomation. *Med J Aust* 151, 621-625.
- Firkins, J.L., Hristov, A.N., Hall, M.B., Varga, G.A., St-Pierre, N.R., 2006. Integration of ruminal metabolism in dairy cattle. *Journal of dairy science* 89 Suppl 1, E31-51.
- Fischer, U., Stroh, C., Schulze-Osthoff, K., 2006. Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10. *Oncogene* 25, 152-159.
- Fry, B.G., 2005. From genome to "venome": molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome research* 15, 403-420.
- Fry, B.G., Roelants, K., Champagne, D.E., Scheib, H., Tyndall, J.D., King, G.F., Nevalainen, T.J., Norman, J.A., Lewis, R.J., Norton, R.S., Renjifo, C., de la Vega, R.C., 2009. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annual review of genomics and human genetics* 10, 483-511.
- Fry, B.G., Wuster, W., Kini, R.M., Brusich, V., Khan, A., Venkataraman, D., Rooney, A.P., 2003. Molecular evolution and phylogeny of elapid

- snake venom three-finger toxins. *Journal of molecular evolution* 57, 110-129.
- Fu, L., Das, B., Mathew, S., Shi, Y.B., 2009. Genome-wide identification of *Xenopus* matrix metalloproteinases: conservation and unique duplications in amphibians. *BMC genomics* 10, 81.
 - Gardner, A.A., Reichert, E.C., Topham, M.K., Stafforini, D.M., 2008. Identification of a domain that mediates association of platelet-activating factor acetylhydrolase with high density lipoprotein. *The Journal of biological chemistry* 283, 17099-17106.
 - Garrone, D., N, Haddad, V., Jr., 2010. Arraias em rios da região Sudeste do Brasil: locais de ocorrência e impactos sobre a população. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43, 82-88.
 - Gearing, A.J., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J., Davidson, A.H., Drummond, A.H., Galloway, W.A., Gilbert, R., Gordon, J.L., et al., 1994. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* 370, 555-557.
 - Geurts, N., Martens, E., Van Aelst, I., Proost, P., Opdenakker, G., Van den Steen, P.E., 2008. Beta-hematin interaction with the hemopexin domain of gelatinase B/MMP-9 provokes autocatalytic processing of the propeptide, thereby priming activation by MMP-3. *Biochemistry* 47, 2689-2699.
 - Gomis-Ruth, F.X., 2009. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *The Journal of biological chemistry* 284, 15353-15357.
 - Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B.W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N., Regev, A., 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology* 29, 644-652.
 - Haddad, V., Jr., Neto, D.G., de Paula Neto, J.B., de Luna Marques, F.P., Barbaro, K.C., 2004. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. *Toxicon* 43, 287-294.

- He, Q., Duan, Z., Yu, Y., Liu, Z., Liang, S., 2013a. The Venom Gland Transcriptome of *Latrodectus tredecimguttatus* Revealed by Deep Sequencing and cDNA Library Analysis. *PLoS one* 8, e81357.
- He, Y., Zhao, R., Di, Z., Li, Z., Xu, X., Hong, W., Wu, Y., Zhao, H., Li, W., Cao, Z., 2013b. Molecular diversity of Chaerilidae venom peptides reveals the dynamic evolution of scorpion venom components from Buthidae to non-Buthidae. *Journal of proteomics* 89, 1-14.
- Holmgren, S., Jensen, J., 2001. Evolution of vertebrate neuropeptides. *Brain research bulletin* 55, 723-735.
- Hou, P., Troen, T., Ovejero, M.C., Kirkegaard, T., Andersen, T.L., Byrjalsen, I., Ferreras, M., Sato, T., Shapiro, S.D., Foged, N.T., Delaisse, J.M., 2004. Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) in osteoclasts: new lesson on the involvement of MMPs in bone resorption. *Bone* 34, 37-47.
- Hu, H., Bandyopadhyay, P.K., Olivera, B.M., Yandell, M., 2012. Elucidation of the molecular envenomation strategy of the cone snail *Conus geographus* through transcriptome sequencing of its venom duct. *BMC genomics* 13, 284.
- Hu, J., Van den Steen, P.E., Sang, Q.X., Opdenakker, G., 2007. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nature reviews. Drug discovery* 6, 480-498.
- Ibrahim-Granet, O., D'Enfert, C., 1997. The *Aspergillus fumigatus* mepB gene encodes an 82 kDa intracellular metalloproteinase structurally related to mammalian thimet oligopeptidases. *Microbiology* 143 (Pt 7), 2247-2253.
- Ibrahim-Granet, O., Hernandez, F.H., Chevrier, G., Dupont, B., 1996. Expression of PZ-peptidases by cultures of several pathogenic fungi. Purification and characterization of a collagenase from *Trichophyton schoenleinii*. *Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 34, 83-90.
- Jiang, L., Liu, C., Duan, Z., Deng, M., Tang, X., Liang, S., 2013. Transcriptome analysis of venom glands from a single fishing spider *Dolomedes mizhoanus*. *Toxicon* 73, 23-32.

- Jiang, Y., Li, Y., Lee, W., Xu, X., Zhang, Y., Zhao, R., Wang, W., 2011. Venom gland transcriptomes of two elapid snakes (*Bungarus multicinctus* and *Naja atra*) and evolution of toxin genes. *BMC genomics* 12, 1.
- Kang, T.S., Georgieva, D., Genov, N., Murakami, M.T., Sinha, M., Kumar, R.P., Kaur, P., Kumar, S., Dey, S., Sharma, S., Vrieling, A., Betzel, C., Takeda, S., Arni, R.K., Singh, T.P., Kini, R.M., 2011. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. *The FEBS journal* 278, 4544-4576.
- Katane, M., Hanai, T., Furuchi, T., Sekine, M., Homma, H., 2008. Hyperactive mutants of mouse D-aspartate oxidase: mutagenesis of the active site residue serine 308. *Amino acids* 35, 75-82.
- Kawasaki, T., Snyder, F., 1987. The metabolism of lyso-platelet-activating factor (1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine) by a calcium-dependent lysophospholipase D in rabbit kidney medulla. *Biochimica et biophysica acta* 920, 85-93.
- Kim, S., Wu, G., 2009. Regulatory role for amino acids in mammary gland growth and milk synthesis. *Amino acids* 37, 89-95.
- Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S., Rakic, P., Flavell, R.A., 1998. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94, 325-337.
- Lammler, B., Wuillemin, W.A., Huber, I., Krauskopf, M., Zurcher, C., Pflugshaupt, R., Furlan, M., 1991. Thromboembolism and bleeding tendency in congenital factor XII deficiency--a study on 74 subjects from 14 Swiss families. *Thrombosis and haemostasis* 65, 117-121.
- Lazebnik, Y.A., Takahashi, A., Moir, R.D., Goldman, R.D., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H., Earnshaw, W.C., 1995. Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9042-9046.

- Li, P., Mai, K., Trushenski, J., Wu, G., 2009. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino acids* 37, 43-53.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X., 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Liscovitch, M., Cantley, L.C., 1994. Lipid second messengers. *Cell* 77, 329-334.
- Liscovitch, M., Czarny, M., Fiucci, G., Tang, X., 2000. Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *The Biochemical journal* 345 Pt 3, 401-415.
- Liu, Z.C., Zhang, R., Zhao, F., Chen, Z.M., Liu, H.W., Wang, Y.J., Jiang, P., Zhang, Y., Wu, Y., Ding, J.P., Lee, W.H., 2012. Venomic and transcriptomic analysis of centipede *Scolopendra subspinipes dehaani*. *Journal of proteome research* 11, 6197-6212.
- Llano, E., Pendas, A.M., Knauper, V., Sorsa, T., Salo, T., Salido, E., Murphy, G., Simmer, J.P., Bartlett, J.D., Lopez-Otin, C., 1997. Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20). *Biochemistry* 36, 15101-15108.
- Lohi, J., Wilson, C.L., Roby, J.D., Parks, W.C., 2001. Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *The Journal of biological chemistry* 276, 10134-10144.
- Lohse, M., Bolger, A.M., Nagel, A., Fernie, A.R., Lunn, J.E., Stitt, M., Usadel, B., 2012. RobiNA: a user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. *Nucleic acids research* 40, W622-627.
- Lomonte, B., Rangel, J., 2012. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A(2) to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon* 60, 520-530.
- Lu, D., Scully, M., Kakkar, V., Lu, X., 2010. ADAM-15 disintegrin-like domain structure and function. *Toxins* 2, 2411-2427.

- 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, 1563-1576.
- Magalhaes, G.S., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Lopes-Ferreira, M., Lorenzini, D.M., Ho, P.L., Moura-da-Silva, A.M., 2006. Transcriptome analysis of expressed sequence tags from the venom glands of the fish *Thalassophryne nattereri*. *Biochimie* 88, 693-699.
- Magalhaes, M.R., da Silva, N.J., Jr., Ulhoa, C.J., 2008. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: isolation and characterization. *Toxicon* 51, 1060-1067.
- Margres, M.J., Aronow, K., Loyacano, J., Rokyta, D.R., 2013. The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. *BMC genomics* 14, 531.
- Millichip, M.I., Dallas, D.J., Wu, E., Dale, S., McKie, N., 1998. The Metallo-Disintegrin ADAM10 (MADM) from Bovine Kidney Has Type IV Collagenase Activity in Vitro. *Biochemical and biophysical research communications* 245, 594-598.
- Montañez, R., Rodríguez-Caso, C., Sánchez-Jiménez, F., Medina, M.Á., 2008. In silico analysis of arginine catabolism as a source of nitric oxide or polyamines in endothelial cells. *Amino acids* 34, 223-229.
- Morgenstern, D., King, G.F., 2013. The venom optimization hypothesis revisited. *Toxicon* 63, 120-128.
- Morris, S.M., Jr., 2007. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *The Journal of nutrition* 137, 1602S-1609S.
- Murphy, G., Knauper, V., 1997. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 15, 511-518.
- Nelson, D., L., COX, M., M., 2005. in: Company, F.a. (Ed.), *Principles of Biochemistry*, New York, pp. 787-815.
- Norris, L.A., 2003. Blood coagulation. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* 17, 369-383.

- O'Reilly, L.A., Ekert, P., Harvey, N., Marsden, V., Cullen, L., Vaux, D.L., Hacker, G., Magnusson, C., Pakusch, M., Cecconi, F., Kuida, K., Strasser, A., Huang, D.C., Kumar, S., 2002. Caspase-2 is not required for thymocyte or neuronal apoptosis even though cleavage of caspase-2 is dependent on both Apaf-1 and caspase-9. *Cell death and differentiation* 9, 832-841.
- Overall, C.M., 2002. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Molecular biotechnology* 22, 51-86.
- Page-McCaw, A., Ewald, A.J., Werb, Z., 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 221-233.
- Papavasiliou, E.C., Gouva, C., Siamopoulos, K.C., Tselepis, A.D., 2006. PAF-acetylhydrolase activity in plasma of patients with chronic kidney disease. Effect of long-term therapy with erythropoietin. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 21, 1270-1277.
- Paroni, G., Henderson, C., Schneider, C., Brancolini, C., 2002. Caspase-2 can trigger cytochrome C release and apoptosis from the nucleus. *The Journal of biological chemistry* 277, 15147-15161.
- Pete, M.J., Ross, A.H., Exton, J.H., 1994. Purification and properties of phospholipase A1 from bovine brain. *The Journal of biological chemistry* 269, 19494-19500.
- Pi, C., Liu, J., Peng, C., Liu, Y., Jiang, X., Zhao, Y., Tang, S., Wang, L., Dong, M., Chen, S., Xu, A., 2006. Diversity and evolution of conotoxins based on gene expression profiling of *Conus litteratus*. *Genomics* 88, 809-819.
- Poon, S., Easterbrook-Smith, S.B., Rybchyn, M.S., Carver, J.A., Wilson, M.R., 2000. Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state. *Biochemistry* 39, 15953-15960.

- Possani, L.D., Becerril, B., Delepierre, M., Tytgat, J., 1999. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *European journal of biochemistry / FEBS* 264, 287-300.
- Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., Stafforini, D.M., McIntyre, T.M., 2000. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annual review of biochemistry* 69, 419-445.
- Rabilloud, T., 2002. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* 2, 3-10.
- Rademacher, T.W., Parekh, R.B., Dwek, R.A., 1988. Glycobiology. *Annual review of biochemistry* 57, 785-838.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 1995. Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods in enzymology* 248, 183-228.
- Remigio, E.A., Duda, T.F., Jr., 2008. Evolution of ecological specialization and venom of a predatory marine gastropod. *Molecular ecology* 17, 1156-1162.
- Rendon-Anaya, M., Delaye, L., Possani, L.D., Herrera-Estrella, A., 2012. Global transcriptome analysis of the scorpion *Centruroides noxius*: new toxin families and evolutionary insights from an ancestral scorpion species. *PloS one* 7, e43331.
- Roach, P.J., Depaoli-Roach, A.A., Hurley, T.D., Tagliabracci, V.S., 2012. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *The Biochemical journal* 441, 763-787.
- Rodriguez, A.A., Salceda, E., Garateix, A.G., Zaharenko, A.J., Peigneur, S., Lopez, O., Pons, T., Richardson, M., Diaz, M., Hernandez, Y., Standker, L., Tytgat, J., Soto, E., 2013. A novel sea anemone peptide that inhibits acid-sensing ion channels. *Peptides*.
- Rokyta, D.R., Lemmon, A.R., Margres, M.J., Aronow, K., 2012. The venom-gland transcriptome of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *BMC genomics* 13, 312.
- Rokyta, D.R., Wray, K.P., Margres, M.J., 2013. The genesis of an exceptionally lethal venom in the timber rattlesnake (*Crotalus horridus*)

- revealed through comparative venom-gland transcriptomics. *BMC genomics* 14, 394.
- Rosa, R.D., 1985. A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae), The College of William and Mary in Virginia.
 - Rosenson, R.S., Stafforini, D.M., 2012. Modulation of oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis by lipoprotein-associated phospholipase A2. *Journal of lipid research* 53, 1767-1782.
 - Roy, R., Wewer, U.M., Zurakowski, D., Pories, S.E., Moses, M.A., 2004. ADAM 12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage. *The Journal of biological chemistry* 279, 51323-51330.
 - Russell, F.E., Van Harreveld, A., 1954. Cardiovascular effects of the venom of the round stingray, *Urobatis halleri*. *Arch Int Physiol Biochim* 62, 322-333.
 - Samy, R.P., Gopalakrishnakone, P., Stiles, B.G., Girish, K.S., Swamy, S.N., Hemshekhar, M., Tan, K.S., Rowan, E.G., Sethi, G., Chow, V.T., 2012. Snake venom phospholipases A(2): a novel tool against bacterial diseases. *Current medicinal chemistry* 19, 6150-6162.
 - Sato, T., Aoki, J., Nagai, Y., Dohmae, N., Takio, K., Doi, T., Arai, H., Inoue, K., 1997. Serine phospholipid-specific phospholipase A that is secreted from activated platelets. A new member of the lipase family. *The Journal of biological chemistry* 272, 2192-2198.
 - Schaloske, R.H., Dennis, E.A., 2006. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochimica et biophysica acta* 1761, 1246-1259.
 - Scott, D.L., Otwinowski, Z., Gelb, M.H., Sigler, P.B., 1990. Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. *Science* 250, 1563-1566.
 - Shapiro, S.D., Kobayashi, D.K., Ley, T.J., 1993. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *The Journal of biological chemistry* 268, 23824-23829.

- Soldatova, L., Kochoumian, L., King, T.P., 1993. Sequence similarity of a hornet (*D. maculata*) venom allergen phospholipase A1 with mammalian lipases. *FEBS letters* 320, 145-149.
- Stafforini, D.M., 2009. Biology of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH, lipoprotein associated phospholipase A2). *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 23, 73-83.
- Stafforini, D.M., McIntyre, T.M., Carter, M.E., Prescott, S.M., 1987. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor. *The Journal of biological chemistry* 262, 4215-4222.
- Stafforini, D.M., Tjoelker, L.W., McCormick, S.P., Vaitkus, D., McIntyre, T.M., Gray, P.W., Young, S.G., Prescott, S.M., 1999. Molecular basis of the interaction between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase and low density lipoprotein. *The Journal of biological chemistry* 274, 7018-7024.
- Sun, C., Wu, M.H., Guo, M., Day, M.L., Lee, E.S., Yuan, S.Y., 2010. ADAM15 regulates endothelial permeability and neutrophil migration via Src/ERK1/2 signalling. *Cardiovascular research* 87, 348-355.
- Takahashi, A., Alnemri, E.S., Lazebnik, Y.A., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Moir, R.D., Goldman, R.D., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H., Earnshaw, W.C., 1996. Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8395-8400.
- Terrat, Y., Biass, D., Dutertre, S., Favreau, P., Remm, M., Stocklin, R., Piquemal, D., Ducancel, F., 2012. High-resolution picture of a venom gland transcriptome: case study with the marine snail *Conus consors*. *Toxicon* 59, 34-46.
- Tester, A.M., Cox, J.H., Connor, A.R., Starr, A.E., Dean, R.A., Puente, X.S., Lopez-Otin, C., Overall, C.M., 2007. LPS responsiveness and

- neutrophil chemotaxis in vivo require PMN MMP-8 activity. *PloS one* 2, e312.
- Tjoelker, L.W., Eberhardt, C., Unger, J., Trong, H.L., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., Stafforini, D.M., Prescott, S.M., Gray, P.W., 1995. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad. *The Journal of biological chemistry* 270, 25481-25487.
 - Tvrzicka, E., Kremmyda, L.S., Stankova, B., Zak, A., 2011. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 155, 117-130.
 - Valdez-Velazquez, L.L., Quintero-Hernandez, V., Romero-Gutierrez, M.T., Coronas, F.I., Possani, L.D., 2013. Mass fingerprinting of the venom and transcriptome of venom gland of scorpion *Centruroides tecomanus*. *PloS one* 8, e66486.
 - Verhees, C.H., Kengen, S.W., Tuininga, J.E., Schut, G.J., Adams, M.W., De Vos, W.M., Van Der Oost, J., 2003. The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *The Biochemical journal* 375, 231-246.
 - Visse, R., Nagase, H., 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research* 92, 827-839.
 - Wang, J., Wu, G., Zhou, H., Wang, F., 2009. Emerging technologies for amino acid nutrition research in the post-genome era. *Amino acids* 37, 177-186.
 - Warrell, D.A., 2012. Venomous bites, stings, and poisoning. *Infectious disease clinics of North America* 26, 207-223.
 - Weis, W.I., Taylor, M.E., Drickamer, K., 1998. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunological reviews* 163, 19-34.
 - Werner, S.R., Dotzlaw, J.E., Smith, R.C., 2008. MMP-28 as a regulator of myelination. *BMC neuroscience* 9, 83.
 - Whittington, C.M., Koh, J.M., Warren, W.C., Papenfuss, A.T., Torres, A.M., Kuchel, P.W., Belov, K., 2009. Understanding and utilising

- mammalian venom via a platypus venom transcriptome. *Journal of proteomics* 72, 155-164.
- Wolf, B.B., Green, D.R., 1999. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *The Journal of biological chemistry* 274, 20049-20052.
 - Wong, E.S., Nicol, S., Warren, W.C., Belov, K., 2013. Echidna venom gland transcriptome provides insights into the evolution of monotreme venom. *PloS one* 8, e79092.
 - Wu, G., 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids* 37, 1-17.
 - Wu, G., Bazer, F.W., Davis, T.A., Jaeger, L.A., Johnson, G.A., Kim, S.W., Knabe, D.A., Meininger, C.J., Spencer, T.E., Yin, Y.-L., 2007. Important roles for the arginine family of amino acids in swine nutrition and production. *Livestock Science* 112, 8-22.
 - Wykle, R.L., Kraemer, W.F., Schremmer, J.M., 1977. Studies of lysophospholipase D of rat liver and other tissues. *Archives of biochemistry and biophysics* 184, 149-155.
 - Wykle, R.L., Strum, J.C., 1991. Lysophospholipase D. *Methods in enzymology* 197, 583-590.
 - Yang, M., Kurkinen, M., 1998. Cloning and characterization of a novel matrix metalloproteinase (MMP), CMMP, from chicken embryo fibroblasts. CMMP, Xenopus XMMP, and human MMP19 have a conserved unique cysteine in the catalytic domain. *The Journal of biological chemistry* 273, 17893-17900.
 - Zelanis, A., Andrade-Silva, D., Rocha, M.M., Furtado, M.F., Serrano, S.M., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Ho, P.L., 2012. A transcriptomic view of the proteome variability of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *PLoS neglected tropical diseases* 6, e1554.
 - Zhivotovsky, B., Orrenius, S., 2005. Caspase-2 function in response to DNA damage. *Biochemical and biophysical research communications* 331, 859-867.

Tabelas suplementares

Tabela suplementar 1. Metabolismo de aminoácidos

Metabolismo de Aminoácidos		
Exclusivas de <i>Potamotrygon falkneri</i>		
Vias Metabólicas	KOs	Transcritos
Degradação de lisina	K09188	histone-lysine N-methyltransferase MLL3 [EC:2.1.1.43]
Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato	K01940	argininosuccinate synthase [EC:6.3.4.5]
Metabolismo de cisteína e metionina	K00797	spermidine synthase [EC:2.5.1.16]
Metabolismo de histidina	K00817	histidinol-phosphate aminotransferase [EC:2.6.1.9]
Metabolismo de tirosina	K00151	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconic-semialdehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.60]
Metabolismo de triptofano	K10217	aminomuconate-semialdehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.32]
Exclusivas de <i>Potamotrygon motoro</i>		
Vias Metabólicas	KOs	Transcritos
Biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano	K00891	shikimate kinase [EC:2.7.1.71]
Degradação de lisina	K11425	histone-lysine N-methyltransferase NSD3 [EC:2.1.1.43]
Metabolismo de arginina e prolina	K00819, K12657, K13253	ornithine--oxo-acid transaminase [EC:2.6.1.13], delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase [EC:2.7.2.11 1.2.1.41], nitric-oxide synthase, invertebrate [EC:1.14.13.39]
Metabolismo de cisteína e	K00548	5-methyltetrahydrofolate--homocysteine methyltransferase [EC:2.1.1.13]

metionina

Metabolismo de tirosina	K00455, K00505, K01826	3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.15], tyrosinase [EC:1.14.18.1], 5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate isomerase [EC:5.3.3.10]
Metabolismo de triptofano	K00453	tryptophan 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.11]

Compartilhadas entre ambas as espécies

Vias Metabólicas	KOs	Transcritos
Biossíntese de lisina	K00825, K14157	kynurenine/2-aminoadipate aminotransferase [EC:2.6.1.7 2.6.1.39], alpha-aminoadipic semialdehyde synthase [EC:1.5.1.8 1.5.1.9]
Biossíntese de isoleucina, leucina e valina	K01869, K01870, K01873	leucyl-tRNA synthetase [EC:6.1.1.4], isoleucyl-tRNA synthetase [EC:6.1.1.5], valyl-tRNA synthetase [EC:6.1.1.9]
Degradação de lisina	K00292, K00471, K00473, K00474, K01423, K06101, K09186, K09187, K09189, K11419, K11420, K11421, K11422, K11423, K11424, K11427,	saccharopine dehydrogenase (NAD+, L-glutamate forming) [EC:1.5.1.9], gamma-butyrobetaine dioxygenase [EC:1.14.11.1], procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 [EC:1.14.11.4], trimethyllysine dioxygenase [EC:1.14.11.8], -----, histone-lysine N-methyltransferase ASH1L [EC:2.1.1.43], histone-lysine N-methyltransferase MLL1 [EC:2.1.1.43], histone-lysine N-methyltransferase MLL2 [EC:2.1.1.43], histone-lysine N-methyltransferase MLL5 [EC:2.1.1.43], histone-lysine N-methyltransferase SUV39H [EC:2.1.1.43], euchromatic histone-lysine N-methyltransferase [EC:2.1.1.43], histone-lysine N-methyltransferase SETDB [EC:2.1.1.43], histone-lysine N-methyltransferase SETD1 [EC:2.1.1.43], histone-lysine N-methyltransferase SETD2 [EC:2.1.1.43], histone-lysine N-methyltransferase NSD1/2 [EC:2.1.1.43], histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-79 specific [EC:2.1.1.43],

	K11428, K11429, K11431, K11433, K11703, K13645, K13646, K14959	histone-lysine N-methyltransferase SETD8 [EC:2.1.1.43], histone-lysine N-methyltransferase SUV420H [EC:2.1.1.43], histone-lysine N-methyltransferase SETD7 [EC:2.1.1.43], histone-lysine N-methyltransferase SETMAR [EC:2.1.1.43], collagen beta-1,O-galactosyltransferase [EC:2.4.1.50], procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 [EC:1.14.11.4], lysyl hydroxylase/galactosyltransferase/glucosyltransferase [EC:1.14.11.4 2.4.1.50 2.4.1.66], histone-lysine N-methyltransferase MLL4 [EC:2.1.1.43]
Degradação de valina, leucina e isoleucina	K00020, K00167, K00253, K00826, K01968, K01969, K05607, K08683, K09699, K11538	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase [EC:1.1.1.31], 2-oxoisovalerate dehydrogenase E1 component, beta subunit [EC:1.2.4.4], isovaleryl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.99.10], branched-chain amino acid aminotransferase [EC:2.6.1.42], 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase alpha subunit [EC:6.4.1.4], 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase beta subunit [EC:6.4.1.4], methylglutaconyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.18], 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / 3-hydroxy-2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.35 1.1.1.178], 2-oxoisovalerate dehydrogenase E2 component (dihydrolipoyl transacylase) [EC:2.3.1.168], isobutyryl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.99.-]
Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato	K00272, K00294, K01437, K01755, K13566, K14454, K14455	D-aspartate oxidase [EC:1.4.3.1], 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase [EC:1.5.1.12], aspartoacylase [EC:3.5.1.15], argininosuccinate lyase [EC:4.3.2.1], omega-amidase [EC:3.5.1.3], aspartate aminotransferase, cytoplasmic [EC:2.6.1.1], aspartate aminotransferase, mitochondrial [EC:2.6.1.1]
Metabolismo de arginina e prolina	K00286, K00318, K00472,	pyrroline-5-carboxylate reductase [EC:1.5.1.2], proline dehydrogenase [EC:1.5.99.8], prolyl 4-hydroxylase [EC:1.14.11.2],

	K00611, K00620, K00657, K00933, K01438, K01480, K01581, K01750, K01777, K11067, K11142, K12255, K13240, K13241, K13242, K14677	ornithine carbamoyltransferase [EC:2.1.3.3], glutamate N-acetyltransferase / amino-acid N-acetyltransferase [EC:2.3.1.35 2.3.1.1], diamine N-acetyltransferase [EC:2.3.1.57], creatine kinase [EC:2.7.3.2], acetylorithine deacetylase [EC:3.5.1.16], agmatinase [EC:3.5.3.11], ornithine decarboxylase [EC:4.1.1.17], ornithine cyclodeaminase [EC:4.3.1.12], proline racemase [EC:5.1.1.4], N-acetylglutamate synthase [EC:2.3.1.1], cytosol aminopeptidase [EC:3.4.11.1 3.4.11.5], guanidinobutyrase [EC:3.5.3.7], nitric-oxide synthase, brain [EC:1.14.13.39], nitric-oxide synthase, inducible [EC:1.14.13.39], nitric-oxide synthase, endothelial [EC:1.14.13.39], aminoacylase [EC:3.5.1.14]
Metabolismo de cisteína e metionina	K00456, K00547, K00558, K00772, K00789, K00802, K01011, K01251, K01611, K01762, K08963	cysteine dioxygenase [EC:1.13.11.20], homocysteine S-methyltransferase [EC:2.1.1.10], DNA (cytosine-5-)-methyltransferase [EC:2.1.1.37], 5'-methylthioadenosine phosphorylase [EC:2.4.2.28], S-adenosylmethionine synthetase [EC:2.5.1.6], spermine synthase [EC:2.5.1.22], thiosulfate/3-mercaptopyruvate sulfurtransferase [EC:2.8.1.1 2.8.1.2], adenosylhomocysteinase [EC:3.3.1.1], S-adenosylmethionine decarboxylase [EC:4.1.1.50], 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase [EC:4.4.1.14], methylthioribose-1-phosphate isomerase [EC:5.3.1.23]
Metabolismo de fenilalanina	K00146	phenylacetaldehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.39]
Metabolismo de glicina,	K00060,	threonine 3-dehydrogenase [EC:1.1.1.103],

serina e treonina	K00274, K00276, K00281, K00301, K00306, K00314, K00315, K00542, K00544, K00552, K00639, K00643, K01620, K01697, K01733, K01752, K12235, K13745	monoamine oxidase [EC:1.4.3.4], primary-amine oxidase [EC:1.4.3.21], glycine dehydrogenase [EC:1.4.4.2], sarcosine oxidase [EC:1.5.3.1], sarcosine oxidase / L-pipecolate oxidase [EC:1.5.3.1 1.5.3.7], sarcosine dehydrogenase [EC:1.5.99.1], dimethylglycine dehydrogenase [EC:1.5.99.2], guanidinoacetate N-methyltransferase [EC:2.1.1.2], betaine-homocysteine S-methyltransferase [EC:2.1.1.5], glycine N-methyltransferase [EC:2.1.1.20], glycine C-acetyltransferase [EC:2.3.1.29], 5-aminolevulinate synthase [EC:2.3.1.37], threonine aldolase [EC:4.1.2.5], cystathionine beta-synthase [EC:4.2.1.22], threonine synthase [EC:4.2.3.1], L-serine dehydratase [EC:4.3.1.17], serine racemase [EC:5.1.1.18], L-2,4-diaminobutyrate decarboxylase [EC:4.1.1.86]
Metabolismo de histidina	K00492, K00599, K00603, K01590	-----, -----, glutamate formiminotransferase [EC:2.1.2.5], histidine decarboxylase [EC:4.1.1.22]
Metabolismo de tirosina	K00431, K00457, K00503, K00506, K00680, K01555, K01557,	thyroid peroxidase [EC:1.11.1.8], 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase [EC:1.13.11.27], dopamine beta-monooxygenase [EC:1.14.17.1], tyrosinase-related protein 1 [EC:1.14.18.-], -----, fumarylacetoacetase [EC:3.7.1.2], acylpyruvate hydrolase [EC:3.7.1.5],

	K01800, K01827, K07253	maleylacetoacetate isomerase [EC:5.2.1.2], dopachrome tautomerase [EC:5.3.3.12], phenylpyruvate tautomerase [EC:5.3.2.1]
Metabolismo de triptofano	K00543, K00816, K01867	acetylserotonin N-methyltransferase [EC:2.1.1.4], kynurenine---oxoglutarate transaminase / cysteine-S-conjugate beta-lyase / glutamine--- phenylpyruvate transaminase [EC:2.6.1.7 4.4.1.13 2.6.1.64], tryptophanyl-tRNA synthetase [EC:6.1.1.2]

Tabela Suplementar 2. Metabolismo de carboidratos

Metabolismo de Carboidratos		
Exclusivas de <i>Potamotrygon falkneri</i>		
Vias Metabólicas	KOs	Transcritos
Glicólise e gliconeogenese	K00131, K01834	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP) [EC:1.2.1.9], phosphoglycerate mutase [EC:5.4.2.1]
Interconversão de pentose e glicoronato	K00012	UDPglucose 6-dehydrogenase [EC:1.1.1.22]
Metabolismo de amino-açúcar e nucleotídeo-açúcar	K01639, K02473, K05304	N-acetylneuraminate lyase [EC:4.1.3.3], UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase [EC:5.1.3.7], sialic acid synthase [EC:2.5.1.56 2.5.1.57]
Metabolismo de butanoato	K00135, K00139	succinate-semialdehyde dehydrogenase (NADP+) [EC:1.2.1.16], succinate-semialdehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.24]
Metabolismo de frutose e manose	K01103	6-phosphofructo-2-kinase / fructose-2,6-bisphosphatase [EC:2.7.1.105 3.1.3.46]
Metabolismo de galactose	K01187	alpha-glucosidase [EC:3.2.1.20]
Metabolismo de inositol fosfato	K00010, K00328	myo-inositol 2-dehydrogenase [EC:1.1.1.18], inositol-polyphosphate multikinase [EC:2.7.1.151]

Via de pentose fosfato	K00033, K01057	6-phosphogluconate dehydrogenase [EC:1.1.1.44], 6-phosphogluconolactonase [EC:3.1.1.31]
------------------------	-------------------	--

Exclusivas de *Potamotrygon motoro*

Vias Metabólicas	KOs	Transcritos
Glicólise e gliconeogenese	K01792, K12406	glucose-6-phosphate 1-epimerase [EC:5.1.3.15], pyruvate kinase isozymes R/L [EC:2.7.1.40]
Ciclo do citrato	K00236	succinate dehydrogenase (ubiquinone) cytochrome b subunit [EC:1.3.5.1]
Interconversão de pentose e glicoronato	K00078	dihydrodiol dehydrogenase / D-xylose 1-dehydrogenase (NADP) [EC:1.3.1.20 1.1.1.179]
Metabolismo do ascorbato e aldarato	K14190	GDP-L-galactose phosphorylase [EC:2.7.7.69]
Metabolismo de butanoato	K01907	acetoacetyl-CoA synthetase [EC:6.2.1.16]
Metabolismo de frutose e manose	K00008, K01809, K05305	L-iditol 2-dehydrogenase [EC:1.1.1.14] mannose-6-phosphate isomerase [EC:5.3.1.8] fucokinase [EC:2.7.1.52]
Metabolismo de amido e sacarose	K01179	endoglucanase [EC:3.2.1.4]
Via de pentose fosfato	K00117	quinoprotein glucose dehydrogenase [EC:1.1.5.2]

Compartilhadas entre ambas as espécies

Vias Metabólicas	KOs	Transcritos
Glicólise e gliconeogenese	K00001, K00002, K00016, K00121, K00128, K00129, K00134, K00149, K00161,	alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.1], alcohol dehydrogenase (NADP+) [EC:1.1.1.2], L-lactate dehydrogenase [EC:1.1.1.27], S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1.1], aldehyde dehydrogenase (NAD+) [EC:1.2.1.3], aldehyde dehydrogenase (NAD(P)+) [EC:1.2.1.5], glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [EC:1.2.1.12], aldehyde dehydrogenase family 9 member A1 [EC:1.2.1.47 1.2.1.3],

	K00162,	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha [EC:1.2.4.1],
	K00382,	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta [EC:1.2.4.1],
	K00627,	dihydrolipoamide dehydrogenase [EC:1.8.1.4],
	K00844,	pyruvate dehydrogenase E2 component (dihydrolipoamide acetyltransferase) ,
	K00850,	[EC:2.3.1.12],
	K00873,	hexokinase [EC:2.7.1.1],
	K00927,	6-phosphofructokinase [EC:2.7.1.11],
	K01596,	pyruvate kinase [EC:2.7.1.40],
	K01623,	phosphoglycerate kinase [EC:2.7.2.3],
	K01689,	phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) [EC:4.1.1.32],
	K01785,	fructose-bisphosphate aldolase, class I [EC:4.1.2.13],
	K01803,	enolase [EC:4.2.1.11],
	K01810,	aldose 1-epimerase [EC:5.1.3.3],
	K01835,	triosephosphate isomerase (TIM) [EC:5.3.1.1],
	K01837,	glucose-6-phosphate isomerase [EC:5.3.1.9],
	K01895,	phosphoglucomutase [EC:5.4.2.2],
	K03841,	bisphosphoglycerate mutase [EC:5.4.2.4 5.4.2.1 3.1.3.13],
	K08074,	acetyl-CoA synthetase [EC:6.2.1.1],
	K13951,	fructose-1,6-bisphosphatase I [EC:3.1.3.11],
	K13997,	ADP-dependent glucokinase [EC:2.7.1.147],
	K14085	alcohol dehydrogenase 1/7 [EC:1.1.1.1],
		dihydrolipoamide dehydrogenase-binding protein of pyruvate dehydrogenase complex
		aldehyde dehydrogenase family 7 member A1 [EC:1.2.1.31 1.2.1.8 1.2.1.3]
	K00024,	malate dehydrogenase [EC:1.1.1.37],
	K00025,	malate dehydrogenase [EC:1.1.1.37],
	K00026,	malate dehydrogenase [EC:1.1.1.37],
	K00030,	isocitrate dehydrogenase (NAD+) [EC:1.1.1.41],
	K00031,	isocitrate dehydrogenase [EC:1.1.1.42],
	K00164,	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component [EC:1.2.4.2],
Ciclo do citrato		

	K00234, K00235, K00237, K00240, K01647, K01648, K01679, K01681, K01899, K01900, K01902, K01958	succinate dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein subunit [EC:1.3.5.1], succinate dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein [EC:1.3.5.1], succinate dehydrogenase (ubiquinone) membrane anchor subunit [EC:1.3.5.1], succinate dehydrogenase iron-sulfur protein [EC:1.3.99.1], citrate synthase [EC:2.3.3.1], ATP citrate (pro-S)-lyase [EC:2.3.3.8], fumarate hydratase, class II [EC:4.2.1.2], aconitate hydratase 1 [EC:4.2.1.3], succinyl-CoA synthetase alpha subunit [EC:6.2.1.4 6.2.1.5], succinyl-CoA synthetase beta subunit [EC:6.2.1.4 6.2.1.5], succinyl-CoA synthetase alpha subunit [EC:6.2.1.5], pyruvate carboxylase [EC:6.4.1.1]
Interconversão de pentose e glicoronato	K00011, K00699, K00854, K00875, K00963, K01195, K03331, K13247	aldehyde reductase [EC:1.1.1.21], glucuronosyltransferase [EC:2.4.1.17], xylulokinase [EC:2.7.1.17], D-ribulokinase [EC:2.7.1.47], UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase [EC:2.7.7.9], beta-glucuronidase [EC:3.2.1.31], L-xylulose reductase [EC:1.1.1.10], L-gulonate 3-dehydrogenase [EC:1.1.1.45]
Metabolismo de ascorbato e aldarato	K00225	L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase [EC:1.3.2.3]
Metabolismo de amino-açúcar e nucleotídeo-açúcar	K00326, K00621, K00698, K00820, K00884, K00972, K00983, K01097,	cytochrome-b5 reductase [EC:1.6.2.2], glucosamine-phosphate N-acetyltransferase [EC:2.3.1.4], chitin synthase [EC:2.4.1.16], glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase (isomerizing) [EC:2.6.1.16], N-acetylglucosamine kinase [EC:2.7.1.59], UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase [EC:2.7.7.23], N-acylneuraminate cytidylyltransferase [EC:2.7.7.43], N-acylneuraminate-9-phosphatase [EC:3.1.3.29],

	K01183, K01443, K01787, K01836, K02564, K12409	chitinase [EC:3.2.1.14], N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase [EC:3.5.1.25], N-acylglucosamine 2-epimerase [EC:5.1.3.8], phosphoacetylglucosamine mutase [EC:5.4.2.3], glucosamine-6-phosphate deaminase [EC:3.5.99.6], bifunctional UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase / N-acetylmannosamine kinase [EC:5.1.3.14 2.7.1.60]
Metabolismo de butanoato	K00019, K00022, K00109, K00248, K01027, K01640, K01641, K01652	3-hydroxybutyrate dehydrogenase [EC:1.1.1.30], 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.35], 2-hydroxyglutarate dehydrogenase [EC:1.1.99.2], butyryl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.99.2], 3-oxoacid CoA-transferase [EC:2.8.3.5], hydroxymethylglutaryl-CoA lyase [EC:4.1.3.4], hydroxymethylglutaryl-CoA synthase [EC:2.3.3.10], acetolactate synthase I/II/III large subunit [EC:2.2.1.6]
Metabolismo de frutose e manose	K00100, K00846, K00966, K00971, K00976, K01103, K01112, K01628, K01711, K01840, K02377, K14634	-----, ketoheksokinase [EC:2.7.1.3], mannose-1-phosphate guanylyltransferase [EC:2.7.7.13], mannose-1-phosphate guanylyltransferase [EC:2.7.7.22], fucose-1-phosphate guanylyltransferase [EC:2.7.7.30], 6-phosphofructo-2-kinase / fructose-2,6-bisphosphatase [EC:2.7.1.105 3.1.3.46], -----, L-fuculose-phosphate aldolase [EC:4.1.2.17], GDPmannose 4,6-dehydratase [EC:4.2.1.47], phosphomannomutase [EC:5.4.2.8], GDP-L-fucose synthase [EC:1.1.1.271], fructose-2,6-bisphosphatase [EC:3.1.3.46]
Metabolismo de galactose	K00849, K00965,	galactokinase [EC:2.7.1.6], UDPglucose--hexose-1-phosphate uridylyltransferase [EC:2.7.7.12],

	K01189, K01784, K07966, K07967, K12047, K12308, K12309, K12316, K12317	alpha-galactosidase [EC:3.2.1.22], UDP-glucose 4-epimerase [EC:5.1.3.2], beta-1,4-galactosyltransferase 1 [EC:2.4.1.22 2.4.1.90 2.4.1.38 2.4.1.-], beta-1,4-galactosyltransferase 2 [EC:2.4.1.22 2.4.1.90 2.4.1.38 2.4.1.-], maltase-glucoamylase [EC:3.2.1.20 3.2.1.3], beta-galactosidase [EC:3.2.1.23], beta-galactosidase [EC:3.2.1.23], lysosomal alpha-glucosidase [EC:3.2.1.20], neutral alpha-glucosidase C [EC:3.2.1.20]
Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato	K00865, K01091, K01432, K01816, K01847, K01965, K01966, K05606	glycerate kinase [EC:2.7.1.31], phosphoglycolate phosphatase [EC:3.1.3.18], arylformamidase [EC:3.5.1.9], hydroxypyruvate isomerase [EC:5.3.1.22], methylmalonyl-CoA mutase [EC:5.4.99.2], propionyl-CoA carboxylase alpha chain [EC:6.4.1.3], propionyl-CoA carboxylase beta chain [EC:6.4.1.3], methylmalonyl-CoA epimerase [EC:5.1.99.1]
Metabolismo de inositol fosfato	K00888, K00889, K00911, K00913, K00914, K00920, K00921, K00922, K00923, K00999, K01092, K01099,	phosphatidylinositol 4-kinase [EC:2.7.1.67], 1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase [EC:2.7.1.68], 1D-myo-inositol-triphosphate 3-kinase [EC:2.7.1.127], inositol-1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase / inositol-tetrakisphosphate 1-kinase [EC:2.7.1.159 2.7.1.134], phosphatidylinositol 3-kinase [EC:2.7.1.137], 1-phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase [EC:2.7.1.149], 1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase [EC:2.7.1.150], phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase [EC:2.7.1.153], phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase [EC:2.7.1.154], CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase [EC:2.7.8.11], myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase [EC:3.1.3.25],

	K01106, K01107, K01109, K01110, K01858, K03103, K05857, K05858, K05859, K05860, K10572, K13711, K13712	phosphatidylinositol-bisphosphatase [EC:3.1.3.36], inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase [EC:3.1.3.56], inositol polyphosphate 1-phosphatase [EC:3.1.3.57], inositol polyphosphate-4-phosphatase [EC:3.1.3.66], phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase [EC:3.1.3.67], myo-inositol-1-phosphate synthase [EC:5.5.1.4], multiple inositol-polyphosphate phosphatase [EC:3.1.3.62], phospholipase C, delta [EC:3.1.4.11], phospholipase C, beta [EC:3.1.4.11], phospholipase C, gamma [EC:3.1.4.11], phospholipase C, epsilon, inositol-pentakisphosphate 2-kinase [EC:2.7.1.158], phosphatidylinositol 4-kinase type 2 [EC:2.7.1.67], phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase-like protein 1 [EC:2.7.1.68]
Metabolismo de propanoato	K00140, K00249, K01578, K01692, K01913, K05605, K07511, K07515, K13524	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.27], acyl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.99.3], malonyl-CoA decarboxylase [EC:4.1.1.9], enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17], -----, 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase [EC:3.1.2.4], enoyl-CoA hydratase [EC:4.2.1.17], enoyl-CoA hydratase / long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [EC:4.2.1.17 1.1.1.211], 4-aminobutyrate aminotransferase / (S)-3-amino-2-methylpropionate transaminase [EC:2.6.1.19 2.6.1.22]
Metabolismo de piruvato	K00027, K00029, K00049, K00102,	malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) [EC:1.1.1.38], malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating)(NADP+) [EC:1.1.1.40], glyoxylate reductase (NADP+) [EC:1.1.1.79], D-lactate dehydrogenase (cytochrome) [EC:1.1.2.4],

	K00626, K01007, K01069, K01512, K01638, K01759, K11262	acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9], pyruvate, water dikinase [EC:2.7.9.2], hydroxyacylglutathione hydrolase [EC:3.1.2.6], acylphosphatase [EC:3.6.1.7], malate synthase [EC:2.3.3.9], lactoylglutathione lyase [EC:4.4.1.5], acetyl-CoA carboxylase / biotin carboxylase [EC:6.4.1.2 6.3.4.14]
Metabolismo de amido e sacarose	K00688, K00693, K00700, K00975, K01194, K01196, K01513, K08678, K11809, K13648	starch phosphorylase [EC:2.4.1.1], glycogen(starch) synthase [EC:2.4.1.11], 1,4-alpha-glucan branching enzyme [EC:2.4.1.18], glucose-1-phosphate adenyltransferase [EC:2.7.7.27], alpha,alpha-trehalase [EC:3.2.1.28], glycogen debranching enzyme [EC:2.4.1.25 3.2.1.33], ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 1/3 [EC:3.1.4.1 3.6.1.9], UDP-glucuronate decarboxylase [EC:4.1.1.35], glucose-1,6-bisphosphate synthase [EC:2.7.1.106], alpha-1,4-galacturonosyltransferase [EC:2.4.1.43]
Via de pentose fosfato	K00036, K00615, K00616, K00851, K00852, K00948, K01619, K01783, K01807, K13937	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase [EC:1.1.1.49], transketolase [EC:2.2.1.1], transaldolase [EC:2.2.1.2], gluconokinase [EC:2.7.1.12], ribokinase [EC:2.7.1.15], ribose-phosphate pyrophosphokinase [EC:2.7.6.1], deoxyribose-phosphate aldolase [EC:4.1.2.4], ribulose-phosphate 3-epimerase [EC:5.1.3.1], ribose 5-phosphate isomerase A [EC:5.3.1.6], hexose-6-phosphate dehydrogenase [EC:1.1.1.47 3.1.1.31]

Tabela complementar 3. Biossíntese e metabolismo de glicanos

Biossíntese e Metabolismo de Glicanos		
Exclusivas de <i>Potamotrygon falkneri</i>		
Vias Metabólicas	KOs	Transcritos
Biossíntese de glicosaminoglicanas (Sulfato de condroitina)	K00746, K01794, K10158	N-acetylgalactosaminyltransferase I [EC:2.4.1.174], chondroitin-glucuronate 5-epimerase [EC:5.1.3.19], galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase 3 [EC:2.4.1.135]
Biossíntese de glicosfingolipídeos (serie lactato e neolactato)	K03792	beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase (sialyltransferase 10) [EC:2.4.99.10]
Biossíntese de N-glicanos	K00902, K03842, K03849, K06316, K07968, K09659	dolichol kinase [EC:2.7.1.108], beta-1,4-mannosyltransferase [EC:2.4.1.142], alpha-1,3-glucosyltransferase [EC:2.4.1.-], oligosaccharidyl-lipid flippase Family, beta-1,4-galactosyltransferase 3 [EC:2.4.1.90 2.4.1.38 2.4.1.-], dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 3
Biossíntese de outros tipos de O-glicanos	K07635, K09666	galactoside alpha-1,3-fucosyltransferase 7 [EC:2.4.1.-], beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase [EC:2.4.1.-]
Biossíntese de vários tipos de N-glicanos	K14459	hexosaminidase [EC:3.2.1.52]
Degradação de outros glicanos	K01206	alpha-L-fucosidase [EC:3.2.1.51]
Exclusivas de <i>Potamotrygon motoro</i>		
Vias Metabólicas	KOs	Transcritos
Biossíntese de glicosaminoglicanos (sulfato de condroitina)	K04743	chondroitin 6-sulfotransferase 7 [EC:2.8.2.17]
Biossíntese de glicosaminoglicanos (sulfato de	K01793	heparosan-N-sulfate-glucuronate 5-epimerase [EC:5.1.3.17]

heparana)		
Biossíntese de glicosíngolipídeos (série gânglio)	K00715	ganglioside galactosyltransferase [EC:2.4.1.62]
Biossíntese de glicosíngolipídeos (série lactato e neolactato)	K07820	beta-1,3-galactosyltransferase 2 [EC:2.4.1.-]
Biossíntese de glicosfosfatidilinositol (biossíntese âncora)	K08098	phosphatidylinositol glycan, class Z [EC:2.4.1.-]
Biossíntese de mucina tipo O-glicano	K09905	beta-1,4-galactosyltransferase 5 [EC:2.4.1.-]
Degradação de glicosaminoglicanos	K07965	heparanase 2 [EC:3.2.1.-]

Compartilhadas entre ambas as espécies

Vias Metabólicas	KOs	Transcritos
Biossíntese de glicosaminoglicanos (sulfato de condroitina)	K00733, K00734, K00735, K00747, K00771, K01020, K03193, K03419, K08105, K08106, K13499	xylosylprotein 4-beta-galactosyltransferase [EC:2.4.1.133], galactosylxylosylprotein 3-beta-galactosyltransferase [EC:2.4.1.134], galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase 1 [EC:2.4.1.135], chondroitin polymerizing factor [EC:2.4.1.175 2.4.1.226], protein xylosyltransferase [EC:2.4.2.26], chondroitin 6-sulfotransferase 3 [EC:2.8.2.17], dermatan/chondroitin sulfate uronyl 2-O-sulfotransferase UST [EC:2.8.2.-], chondroitin polymerizing factor 2 [EC:2.4.1.226], dermatan 4-sulfotransferase 1 [EC:2.8.2.-], N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase [EC:2.8.2.33], chondroitin sulfate synthase [EC:2.4.1.175 2.4.1.226]
Biossíntese de glicosaminoglicanos (sulfato de heparana)	K01024, K02366, K02367, K02369,	[heparan sulfate]-glucosamine 3-sulfotransferase 1 [EC:2.8.2.23], glucuronyl/N-acetylglucosaminyl transferase EXT1 [EC:2.4.1.224 2.4.1.225], glucuronyl/N-acetylglucosaminyl transferase EXT2 [EC:2.4.1.224 2.4.1.225], alpha-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase EXTL2 [EC:2.4.1.223],

	K02370, K02513, K02514, K02576, K02577, K02578, K02579, K07808, K07809	alpha-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase EXTL3 [EC:2.4.1.223 2.4.1.224], heparan sulfate 2-O-sulfotransferase HS2ST1 [EC:2.8.2.-], heparan sulfate 6-O-sulfotransferase HS6ST1 [EC:2.8.2.-], heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase NDST1 [EC:3.1.1.- 2.8.2.-], heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase NDST2 [EC:3.1.1.- 2.8.2.-], heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase NDST3 [EC:3.1.1.- 2.8.2.-], heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase NDST4 [EC:3.1.1.- 2.8.2.-], [heparan sulfate]-glucosamine 3-sulfotransferase 2 [EC:2.8.2.29], [heparan sulfate]-glucosamine 3-sulfotransferase 3 [EC:2.8.2.30]
Biossíntese de glicosaminoglicanos (sulfato de queratina)	K00741, K04746, K07969, K09671	N-acetyllactosaminide beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase [EC:2.4.1.149], carbohydrate 6-sulfotransferase 4 [EC:2.8.2.-], beta-1,4-galactosyltransferase 4 [EC:2.4.1.90 2.4.1.-], carbohydrate 6-sulfotransferase 6 [EC:2.8.2.-]
Biossíntese de glicosfingolipídeos (serie gânglio)	K00725, K03370, K03372	(N-Acetylneuraminyl)-galactosylglucosylceramide N-acetylgalactosaminyltransferase [EC:2.4.1.92], lactosylceramide alpha-2,3-sialyltransferase (sialyltransferase 9) [EC:2.4.99.9], MFS transporter, PAT family, solute carrier family 33 (acetyl-CoA transportor), member 1 [EC:2.3.1.-]
Biossíntese de glicosfingolipídeos (serie globo)	K00719, K01204	galactosylgalactosylglucosylceramide beta-D-acetylgalactosaminyltransferase [EC:2.4.1.79], alpha-N-acetylgalactosaminidase [EC:3.2.1.49]
Biossíntese de glicosfingolipídeos (serie lactato e neolactato)	K00718, K00742, K00743, K03766, K03877, K07970	galactoside 2-L-fucosyltransferase 1/2 [EC:2.4.1.69], N-acetyllactosaminide beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase [EC:2.4.1.150], N-acetyllactosaminide 3-alpha-galactosyltransferase [EC:2.4.1.87], beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5 [EC:2.4.1.206], beta-1,3-galactosyltransferase 5 [EC:2.4.1.-], beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 3 [EC:2.4.1.-]
Biossíntese de glicofosfatidilinositol (biossíntese âncora)	K03434, K03857,	N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol deacetylase [EC:3.5.1.89], phosphatidylinositol glycan, class A [EC:2.4.1.198],

	K03858, K03859, K03860, K03861, K05283, K05284, K05285, K05286, K05288, K05289, K05290, K05292, K05293, K05294, K05310, K07541, K07542	phosphatidylinositol glycan, class H, phosphatidylinositol glycan, class C, phosphatidylinositol glycan, class Q, phosphatidylinositol glycan, class P, phosphatidylinositol glycan, class W [EC:2.3.-.-], phosphatidylinositol glycan, class M [EC:2.4.1.-], phosphatidylinositol glycan, class N [EC:2.7.-.-], phosphatidylinositol glycan, class B [EC:2.4.1.-], phosphatidylinositol glycan, class O, glycosylphosphatidylinositol transamidase, phosphatidylinositol glycan, class K [EC:2.6.-.-], phosphatidylinositol glycan, class T, phosphatidylinositol glycan, class U, glycosylphosphatidylinositol deacylase [EC:3.-.-.-], ethanolaminephosphotransferase [EC:2.7.-.-], phosphatidylinositol glycan, class X, phosphatidylinositol glycan, class V [EC:2.4.1.-]
Biossíntese de N-glicanos	K00717, K00721, K00726, K00729, K00736, K00737, K00738, K00744, K00778, K00779, K00902, K01001,	glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase [EC:2.4.1.68], dolichol-phosphate mannosyltransferase [EC:2.4.1.83], alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase [EC:2.4.1.101], dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase [EC:2.4.1.117], alpha-1,6-mannosyl-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase [EC:2.4.1.143], beta-1,4-mannosyl-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase [EC:2.4.1.144], alpha-1,3-mannosylglycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase A/B [EC:2.4.1.145], alpha-1,3(6)-mannosylglycoprotein beta-1,6-N-acetyl-glucosaminyltransferase

		[EC:2.4.1.155],
K01228,		
K01230,	beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase (sialyltransferase 1) [EC:2.4.99.1],	
K01231,	beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase (sialyltransferase 2) [EC:2.4.99.1],	
K03843,	dolichol kinase [EC:2.7.1.108],	
K03844,	UDP-N-acetylglucosamine--dolichyl-phosphate N-	
K03845,	acetylglucosaminephosphotransferase [EC:2.7.8.15],	
K03846,	mannosyl-oligosaccharide glucosidase [EC:3.2.1.106],	
K03847,	mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase [EC:3.2.1.113],	
K03848,	alpha-mannosidase II [EC:3.2.1.114],	
K03850,	alpha-1,3/alpha-1,6-mannosyltransferase [EC:2.4.1.132 2.4.1.-],	
K05546,	alpha-1,2-mannosyltransferase [EC:2.4.1.-],	
K07151,	alpha-1,3-mannosyltransferase [EC:2.4.1.258],	
K07252,	alpha-1,2-mannosyltransferase [EC:2.4.1.259 2.4.1.261],	
K07432,	alpha-1,6-mannosyltransferase [EC:2.4.1.260],	
K07441,	alpha-1,3-glucosyltransferase [EC:2.4.1.-],	
K12666,	alpha-1,2-glucosyltransferase [EC:2.4.1.-],	
K12667,	alpha 1,3-glucosidase [EC:3.2.1.84],	
K12669,	dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase [EC:2.4.1.119],	
K12670,	dolichyldiphosphatase [EC:3.6.1.43],	
K13748	beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase [EC:2.4.1.141],	
	beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase [EC:2.4.1.141],	
	oligosaccharyltransferase complex subunit alpha (ribophorin I),	
	oligosaccharyltransferase complex subunit delta (ribophorin II),	
	oligosaccharyltransferase complex subunit gamma,	
	oligosaccharyltransferase complex subunit beta,	
	alpha-1,3-mannosylglycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase C	
	[EC:2.4.1.201 2.4.1.145]	
Biossíntese de outros tipos de O-glicanos	K00728,	dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase [EC:2.4.1.109],
	K03663,	4-galactosyl-N-acetylglucosaminide 3-alpha-L-fucosyltransferase [EC:2.4.1.152],

	K03691, K05948, K09667, K09674, K13667, K13675, K13676	peptide-O-fucosyltransferase [EC:2.4.1.221], fringe [EC:2.4.1.222], polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase [EC:2.4.1.-], carbohydrate 3-sulfotransferase 10 [EC:2.8.2.-], protein glucosyltransferase [EC:2.4.1.-], UDP-glucose:O-linked fucose beta-1,3-glucosyltransferase [EC:2.4.1.-], UDP-xylose:glucoside alpha-1,3-xylosyltransferase [EC:2.4.2.-]
Biossíntese de vários tipos de N-glicanos	K00781, K09657	N-acetyllactosaminide alpha-2,3-sialyltransferase (sialyltransferase 6) [EC:2.4.99.6], beta-1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase 4 [EC:2.4.1.244]
Biossíntese de mucina tipo O-glicano	K00710, K00727, K00731, K00780, K03368, K09653	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase [EC:2.4.1.41], beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase [EC:2.4.1.102], glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase [EC:2.4.1.122], beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase (sialyltransferase 4A) [EC:2.4.99.4], beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase (sialyltransferase 4B) [EC:2.4.99.4], C1GALT1-specific chaperone 1 [EC:2.4.1.-]
Degradação de glicosaminoglicanos	K01132, K01135, K01136, K01137, K01197, K01205, K01217, K01565, K07964, K10532	N-acetylgalactosamine-6-sulfatase [EC:3.1.6.4], arylsulfatase B [EC:3.1.6.12], iduronate 2-sulfatase [EC:3.1.6.13], N-acetylglucosamine-6-sulfatase [EC:3.1.6.14], hyaluronoglucosaminidase [EC:3.2.1.35], alpha-N-acetylglucosaminidase [EC:3.2.1.50], L-iduronidase [EC:3.2.1.76], N-sulfoglucosamine sulfohydrolase [EC:3.10.1.1], heparanase 1 [EC:3.2.1.-], heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase [EC:2.3.1.78]
Degradação de outros glicanos	K01191, K01192,	alpha-mannosidase [EC:3.2.1.24], beta-mannosidase [EC:3.2.1.25],

K01227, K01444, K12311, K12312	mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosaminidase [EC:3.2.1.96], N4-(beta-N-acetylglucosaminyl)-L-asparaginase [EC:3.5.1.26], lysosomal alpha-mannosidase [EC:3.2.1.24], epididymis-specific alpha-mannosidase [EC:3.2.1.24]
---	---

Tabela suplementar 4. Metabolismo de lipídeos

Metabolismo de Lipídeos

Exclusivas de <i>Potamotrygon falkneri</i>		
Vias Metabólicas	KOs	Transcritos
Biossíntese de ácidos graxos insaturados	K10203, K10244	elongation of very long chain fatty acids protein 6 [EC:2.3.1.-], elongation of very long chain fatty acids protein 5 [EC:2.3.1.-]
Biossíntese de ácidos graxos	K00059	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase [EC:1.1.1.100]
Biossíntese de ácidos biliares primários	K00251	3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase [EC:1.3.1.3]
Biossíntese de hormônios esteroides	K00071, K10207	11beta-hydroxysteroid dehydrogenase [EC:1.1.1.146] testosterone 17beta-dehydrogenase (NADP+) [EC:1.1.1.64]
Biossíntese de esteroides	K09828	delta24-sterol reductase [EC:1.3.1.72]
Metabolismo de ácido araquidônico	K01830	prostaglandin-H2 D-isomerase [EC:5.3.99.2]
Metabolismo de ácidos graxos	K00529	ferredoxin--NAD+ reductase [EC:1.18.1.3]
Metabolismo de glicerofosfolipídeos	K00967, K00994	ethanolamine-phosphate cytidyltransferase [EC:2.7.7.14], diacylglycerol cholinephosphotransferase [EC:2.7.8.2]
Exclusivas de <i>Potamotrygon motoro</i>		
Vias Metabólicas	KOs	Transcritos
Biossíntese de ácidos biliares	K01796	alpha-methylacyl-CoA racemase [EC:5.1.99.4]

primários		
Biossíntese de hormônios esteroides	K07410	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 [EC:1.14.14.1]
Biossíntese de esteroides	K00213, K00801, K06045	7-dehydrocholesterol reductase [EC:1.3.1.21], farnesyl-diphosphate farnesyltransferase [EC:2.5.1.21], squalene-hopene cyclase [EC:5.4.99.17]
Metabolismo de ácido araquidônico	K00432, K07418	glutathione peroxidase [EC:1.11.1.9], cytochrome P450, family 2, subfamily J [EC:1.14.14.1]
Metabolismo de éter lipídeo	K00803	alkyldihydroxyacetonephosphate synthase [EC:2.5.1.26]
Metabolismo de glicerolipídeo	K01054	acylglycerol lipase [EC:3.1.1.23]
Metabolismo de glicerofosfolipídeo	K00649, K06129, K14621	glyceronephosphate O-acyltransferase [EC:2.3.1.42], lysophospholipase III [EC:3.1.1.5], phospholipase B1, membrane-associated [EC:3.1.1.4 3.1.1.5],
Metabolismo de esfingolipídeo	K00720, K04628, K12352, K12354	ceramide glucosyltransferase [EC:2.4.1.80], 2-hydroxyacylsphingosine 1-beta-galactosyltransferase [EC:2.4.1.45], sphingomyelin phosphodiesterase 3 [EC:3.1.4.12], ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 7 [EC:3.1.4.12]

Compartilhadas entre ambas as espécies

Vias Metabólicas	KOs	Transcritos
Biossíntese de ácidos graxos insaturados	K00507, K01068, K07753, K10224, K10251, K10258, K10703	stearoyl-CoA desaturase (delta-9 desaturase) [EC:1.14.19.1], palmitoyl-CoA hydrolase [EC:3.1.2.2], peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase [EC:1.3.1.38], fatty acid desaturase 1 (delta-5 desaturase) [EC:1.14.19.-], beta-keto reductase [EC:1.1.1.-], enoyl reductase [EC:1.3.1.-], 3-hydroxy acyl-CoA dehydratase [EC:4.2.1.-]
Biossíntese de ácidos graxos	K00645, K00665, K01071,	[acyl-carrier-protein] S-malonyltransferase [EC:2.3.1.39], fatty acid synthase, animal type [EC:2.3.1.85], oleoyl-[acyl-carrier-protein] hydrolase [EC:3.1.2.14],

	K09458	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II [EC:2.3.1.179]
Biossíntese de ácidos biliares primários	K00488, K00659, K07430, K07431, K07439, K08764, K10214, K10223, K12405, K12408	cytochrome P450, family 27, subfamily A (cholestanetriol 26-monooxygenase) [EC:1.14.13.15], bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase [EC:2.3.1.65 3.1.2.2], cytochrome P450, family 7, subfamily B (oxysterol 7-alpha-hydroxylase) [EC:1.14.13.100], cytochrome P450, family 8, subfamily B (sterol 12-alpha-hydroxylase) [EC:1.14.13.95], cytochrome P450, family 39, subfamily A (24-hydroxycholesterol 7alpha-hydroxylase) [EC:1.14.13.99], sterol carrier protein 2 [EC:2.3.1.176], 3alpha,7alpha,12alpha-trihydroxy-5beta-cholestanoyl-CoA 24-hydroxylase [EC:1.17.99.3], cholesterol 25-hydroxylase [EC:1.14.99.38], 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / 3a,7a,12a-trihydroxy-5b-cholest-24-enoyl-CoA hidratase [EC:1.1.1.35 4.2.1.107], cholest-5-ene-3beta,7alpha-diol 3beta-dehydrogenase [EC:1.1.1.181], estradiol 17beta-dehydrogenase [EC:1.1.1.62], catechol O-methyltransferase [EC:2.1.1.6], steryl-sulfatase [EC:3.1.6.2], cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 [EC:1.14.14.1], cytochrome P450, family 3, subfamily A [EC:1.14.14.1], 3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 3 [EC:1.3.99.5], estradiol 17beta-dehydrogenase / testosterone 17beta-dehydrogenase [EC:1.1.1.62 1.1.1.63]
Biossíntese de hormônios esteroides	K00044, K00545, K01131, K07408, K07424, K12345, K13368	
Biossíntese de esteroides	K00222, K00227, K00511, K00637, K01052, K01852, K05917,	delta14-sterol reductase [EC:1.3.1.70], lathosterol oxidase [EC:1.14.21.6], squalene monooxygenase [EC:1.14.99.7], sterol O-acyltransferase [EC:2.3.1.26], lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase [EC:3.1.1.13], lanosterol synthase [EC:5.4.99.7], cytochrome P450, family 51 (sterol 14-demethylase) [EC:1.14.13.70],

	K07419, K07748, K07750, K13373	cytochrome P450, family 2, subfamily R, polypeptide 1 (vitamin D 25-hydroxylase), sterol-4alpha-carboxylate 3-dehydrogenase (decarboxylating) [EC:1.1.1.170], methylsterol monooxygenase [EC:1.14.13.72], estradiol 17beta-dehydrogenase / 3-keto steroid reductase [EC:1.1.1.62 1.1.1.270]
Metabolismo de ácidos alfa linoleico	K10226	fatty acid desaturase 2 (delta-6 desaturase) [EC:1.14.19.-]
Metabolismo de ácido araquidônico	K00079, K00458, K00460, K00461, K00490, K00509, K00681, K00807, K01254, K01831, K05309, K07412, K07413, K07415, K07422, K08022, K11987	carbonyl reductase (NADPH) [EC:1.1.1.184], arachidonate 12-lipoxygenase [EC:1.13.11.31], arachidonate 15-lipoxygenase [EC:1.13.11.33], arachidonate 5-lipoxygenase [EC:1.13.11.34], cytochrome P450, family 4, subfamily F (leukotriene-B4 20-monooxygenase) [EC:1.14.13.30], prostaglandin-endoperoxide synthase 1 [EC:1.14.99.1], gamma-glutamyltranspeptidase [EC:2.3.2.2], leukotriene-C4 synthase [EC:4.4.1.20], leukotriene-A4 hydrolase [EC:3.3.2.6], cytochrome P450, family 8, subfamily A (Prostacyclin synthase) [EC:5.3.99.4], prostaglandin-E synthase [EC:5.3.99.3], cytochrome P450, family 2, subfamily B [EC:1.14.14.1], cytochrome P450, family 2, subfamily C [EC:1.14.14.1], cytochrome P450, family 2, subfamily E [EC:1.14.14.1], cytochrome P450, family 2, subfamily U, arachidonate 15-lipoxygenase (second type) / 8-lipoxygenase (S-type) [EC:1.13.11.33 1.13.11.-], prostaglandin-endoperoxide synthase 2 [EC:1.14.99.1]
Metabolismo de ácido linoleico	K07409	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2 [EC:1.14.14.1]
Metabolismo de éter lipídeo	K01062, K01122	1-alkyl-2-acetyl-glycerophosphocholine esterase [EC:3.1.1.47], ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2 [EC:3.1.4.39]
Metabolismo de ácidos graxos	K00232, K00252,	acyl-CoA oxidase [EC:1.3.3.6], glutaryl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.99.7],

	K00255, K00632, K01897, K08765, K08766, K09478, K09479, K13238, K13239, K15013	long-chain-acyl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.99.13], acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16], long-chain acyl-CoA synthetase [EC:6.2.1.3], carnitine O-palmitoyltransferase 1 [EC:2.3.1.21], carnitine O-palmitoyltransferase 2 [EC:2.3.1.21], short/branched chain acyl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.99.12], very long chain acyl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.99.-], 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial [EC:5.3.3.8], peroxisomal 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase [EC:5.3.3.8], long-chain-fatty-acid--CoA ligase ACSBG [EC:6.2.1.3]
Metabolismo de glicerolipídeos	K00629, K00864, K00901, K01046, K01080, K09881, K11155, K13506, K13509, K13513, K13517, K13523, K13534, K14073, K14074, K14075, K14452	glycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1/2 [EC:2.3.1.15], glycerol kinase [EC:2.7.1.30], diacylglycerol kinase [EC:2.7.1.107], triacylglycerol lipase [EC:3.1.1.3], phosphatidate phosphatase [EC:3.1.3.4], acylglycerol kinase [EC:2.7.1.94], diacylglycerol O-acyltransferase 1 [EC:2.3.1.20 2.3.1.75 2.3.1.76], glycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3/4 [EC:2.3.1.15], lysophosphatidate acyltransferase [EC:2.3.1.51], lysocardiolipin and lysophospholipid acyltransferase [EC:2.3.1.- 2.3.1.51], lysophospholipid acyltransferase 1/2 [EC:2.3.1.51 2.3.1.-], lysophosphatidic acid acyltransferase / lysophosphatidylinositol acyltransferase [EC:2.3.1.51 2.3.1.-], patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 [EC:3.1.1.3 2.3.1.-], pancreatic triacylglycerol lipase [EC:3.1.1.3], pancreatic lipase-related protein 1 [EC:3.1.1.3], pancreatic lipase-related protein 2 [EC:3.1.1.3], gastric triacylglycerol lipase [EC:3.1.1.3]
Metabolismo de glicerofosfolipídeos	K00006,	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) [EC:1.1.1.8],

K00111,	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [EC:1.1.5.3],
K00551,	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase [EC:2.1.1.17],
K00623,	choline O-acetyltransferase [EC:2.3.1.6],
K00894,	ethanolamine kinase [EC:2.7.1.82],
K00968,	choline-phosphate cytidyltransferase [EC:2.7.7.15],
K00981,	phosphatidate cytidyltransferase [EC:2.7.7.41],
K00993,	ethanolaminephosphotransferase [EC:2.7.8.1],
K00995,	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase [EC:2.7.8.5],
K01047,	phospholipase A2 [EC:3.1.1.4],
K01115,	phospholipase D [EC:3.1.4.4],
K01126,	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase [EC:3.1.4.46],
K01517,	manganese-dependent ADP-ribose/CDP-alcohol diphosphatase [EC:3.6.1.13 3.6.1.16
K01613,	3.6.1.53],
K05929,	phosphatidylserine decarboxylase [EC:4.1.1.65],
K06128,	phosphoethanolamine N-methyltransferase [EC:2.1.1.103],
K06130,	lysophospholipase I [EC:3.1.1.5],
K08729,	lysophospholipase II [EC:3.1.1.5],
K08730,	phosphatidylserine synthase 1 [EC:2.7.8.-],
K08744,	phosphatidylserine synthase 2 [EC:2.7.8.-],
K13510,	cardiolipin synthase [EC:2.7.8.-],
K13511,	lysophosphatidylcholine acyltransferase / lyso-PAF acetyltransferase [EC:2.3.1.23 2.3.1.67],
K13514,	monolysocardiolipin acyltransferase [EC:2.3.1.-],
K13515,	lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1 [EC:2.3.1.-],
K13516,	lysophospholipid acyltransferase 5 [EC:2.3.1.23 2.3.1.-],
K13644,	lysophospholipid acyltransferase 7 [EC:2.3.1.-],
K14156,	choline/ethanolamine phosphotransferase [EC:2.7.8.1 2.7.8.2],
K14676	choline/ethanolamine kinase [EC:2.7.1.32 2.7.1.82],
	lysophospholipid hydrolase [EC:3.1.1.5]
Metabolismo de esfingolípideos	K00654, serine palmitoyltransferase [EC:2.3.1.50],

	K01134, K01186, K01201, K01441, K01634, K04708, K04709, K04711, K04712, K04714, K04715, K04716, K04717, K04718, K07553, K12348, K12349, K12350, K12351, K12353, K12357	arylsulfatase A [EC:3.1.6.8], sialidase-1 [EC:3.2.1.18], glucosylceramidase [EC:3.2.1.45], alkaline ceramidase [EC:3.5.1.23], sphinganine-1-phosphate aldolase [EC:4.1.2.27], 3-dehydrosphinganine reductase [EC:1.1.1.102], Acyl-CoA-dependent ceramide synthase [EC:2.3.1.24], dihydroceramidase [EC:3.5.1.-], sphingolipid delta-4 desaturase [EC:1.14.-.-], shingomyelin synthase [EC:2.7.8.27], ceramide kinase [EC:2.7.1.138], sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 [EC:3.1.3.-], sphingosine-1-phosphate phosphatase 2 [EC:3.1.3.-], sphingosine kinase [EC:2.7.1.91], beta-1,4-galactosyltransferase 6 [EC:2.4.1.-], acid ceramidase [EC:3.5.1.23], neutral ceramidase [EC:3.5.1.23], sphingomyelin phosphodiesterase [EC:3.1.4.12], sphingomyelin phosphodiesterase 2 [EC:3.1.4.12], sphingomyelin phosphodiesterase 4 [EC:3.1.4.12], sialidase-2/3/4 [EC:3.2.1.18]
Alongamento de ácidos graxos na mitocôndria	K01074, K07508, K07509, K07512	palmitoyl-protein thioesterase [EC:3.1.2.22], acetyl-CoA acyltransferase 2 [EC:2.3.1.16], acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16], mitochondrial trans-2-enoyl-CoA reductase [EC:1.3.1.38]

Tabela suplementar 5. Metabolismo complemento e cascata de coagulação

Metabolismo complemento e cascata de coagulação

Exclusivas de *Potamotrygon falkneri*

KOs	Transcritos
K03907, K03986, K04004, K04009, K04011	Thrombomodulin, complement C1q subcomponent subunit A, complement factor H, C3a anaphylatoxin chemotactic receptor, complement component (3b/4b) receptor 1

Exclusivas de *Potamotrygon motoro*

KOs	Transcritos
K01348, K03899, K03987, K03989, K03995, K04002, K04007	urokinase plasminogen activator [EC:3.4.21.73], coagulation factor VIII, complement C1q subcomponent subunit B, complement component 4, complement component 6, complement component 4 binding protein, alpha, membrane cofactor protein,

Compartilhadas entre ambas as espécies

KOs	Transcritos
K01314	coagulation factor X [EC:3.4.21.6],
K01321	coagulation factor IX (Christmas factor) [EC:3.4.21.22],
K01343	tissue plasminogen activator [EC:3.4.21.68],
K03900	von Willebrand factor,
K03901	coagulation factor III (tissue factor),
K03902	coagulation factor V (labile factor),
K03905	fibrinogen gamma chain,
K03909	tissue factor pathway inhibitor,
K03910	alpha-2-macroglobulin,
K03914	coagulation factor II (thrombin) receptor,
K03917	coagulation factor XIII A1 polypeptide [EC:2.3.2.13],
K03982	plasminogen activator inhibitor-1,
K03985	plasminogen activator, urokinase receptor,
K03988	complement C1q subcomponent subunit C,
K03992	mannan-binding lectin serine protease 1 [EC:3.4.21.-],
K03994	complement component 5,
K04006	decay accelerating factor,
K04012	complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2

Figuras suplementares

As vias abaixo indicam os alguns KOs encontrados no estudo e suas posições nas vias metabólicas geradas pelo *Kegg Orthology*.

Figura suplementar 1. Vias metabólicas de aminoácidos

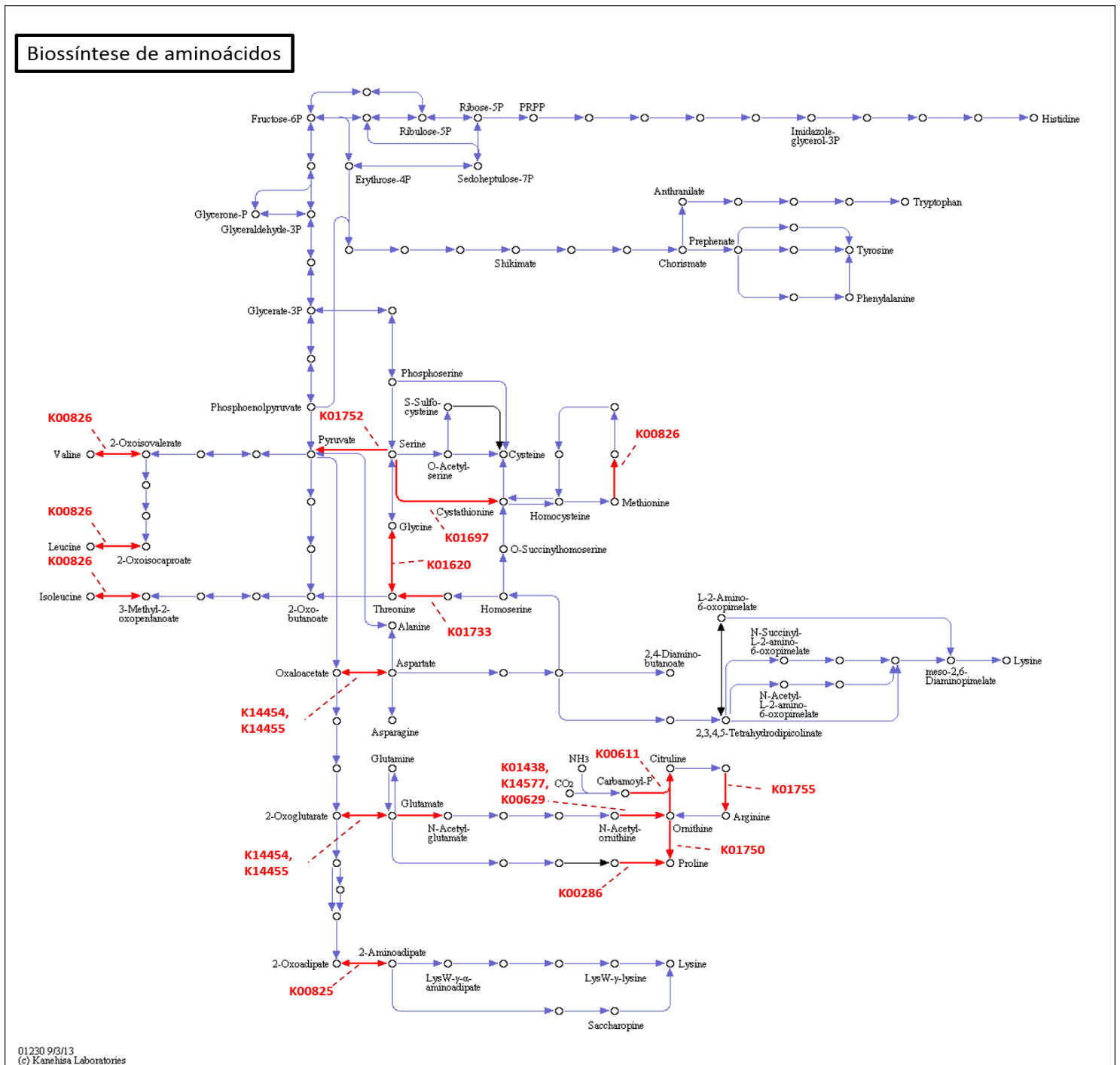


Figura suplementar 5. Vias metabólicas de aminoácidos

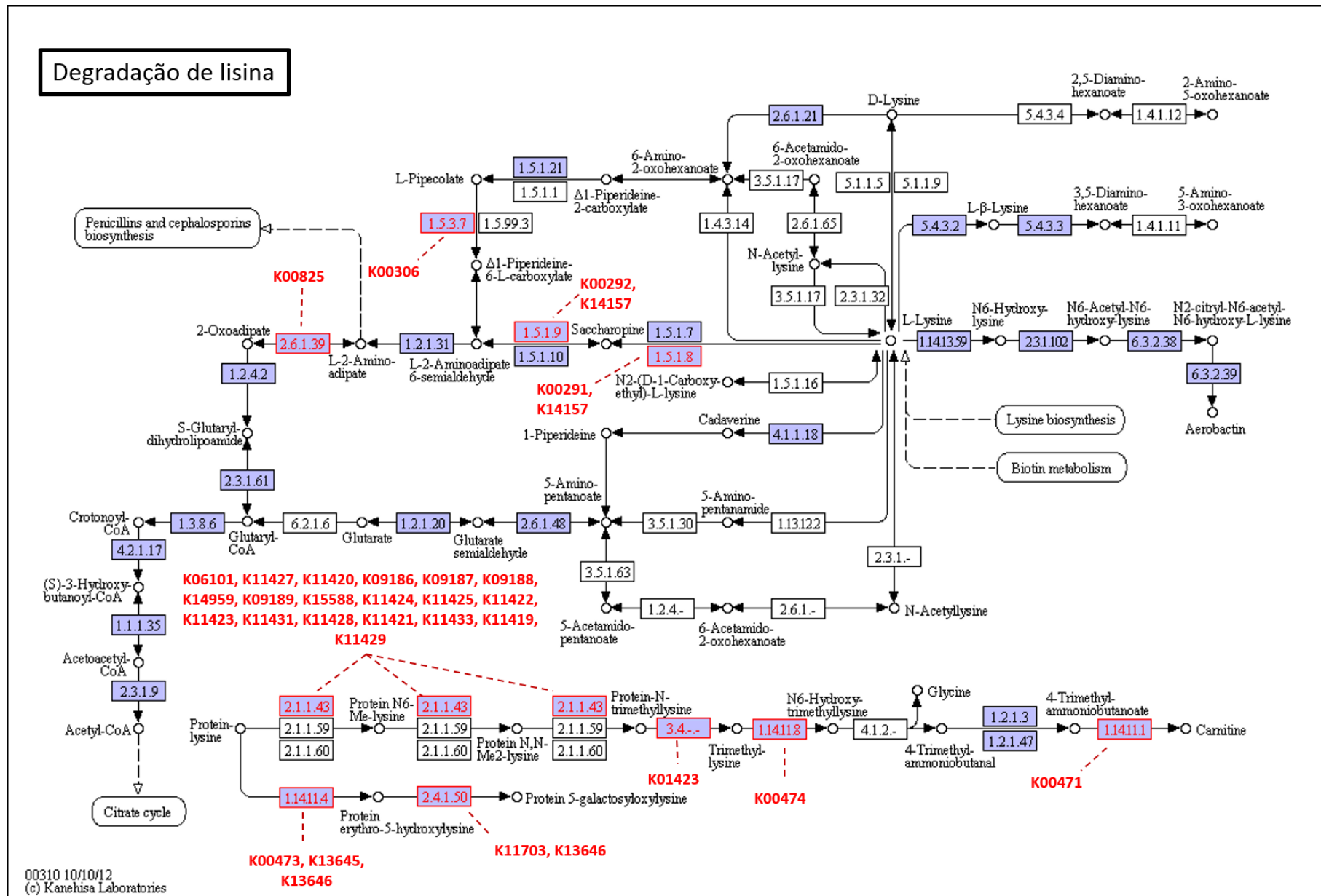


Figura suplementar 6. Vias metabólicas de carboidratos

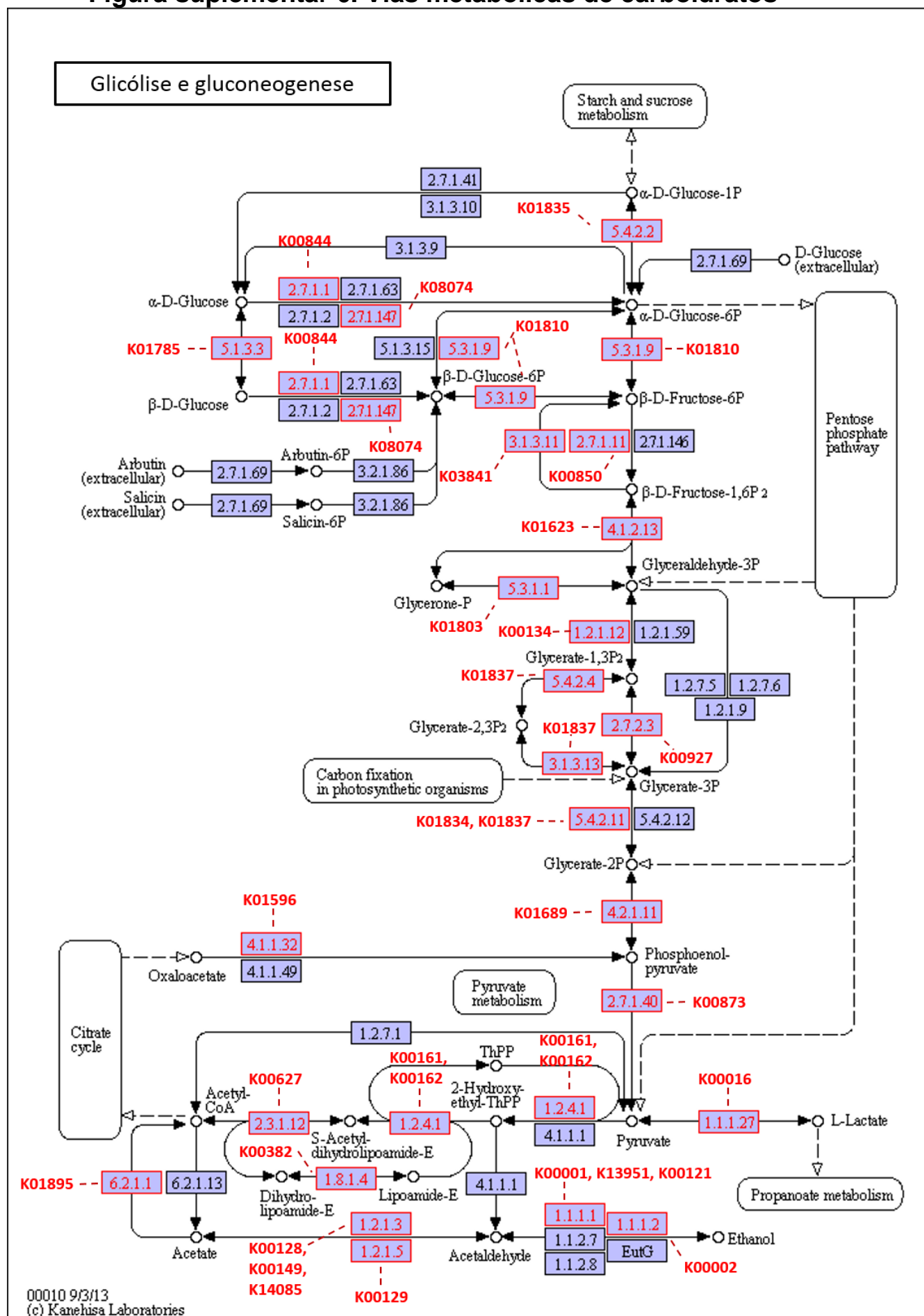


Figura suplementar 8. Vias metabólicas de carboidratos

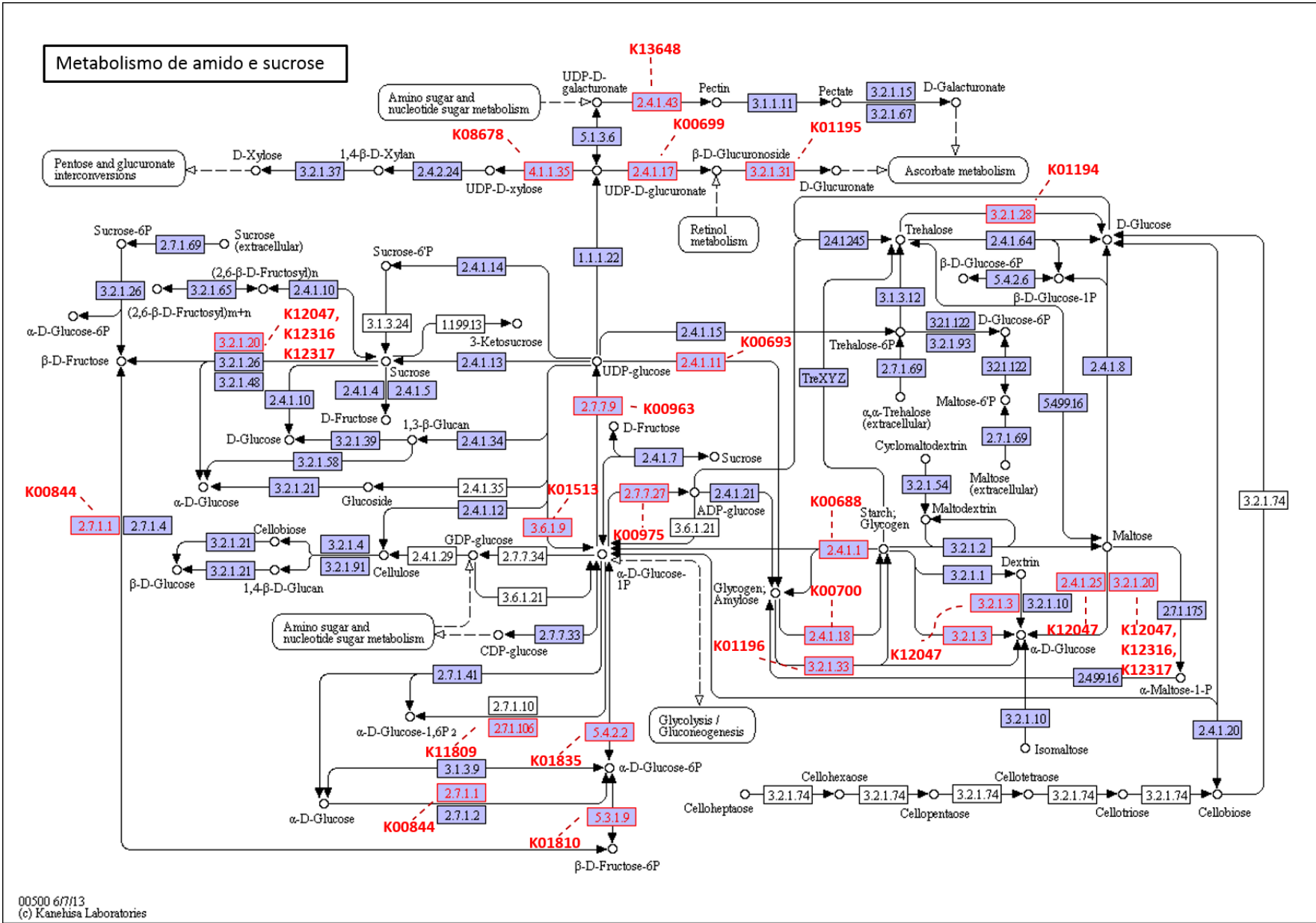


Figura suplementar 9. Vias metabólicas de carboidratos

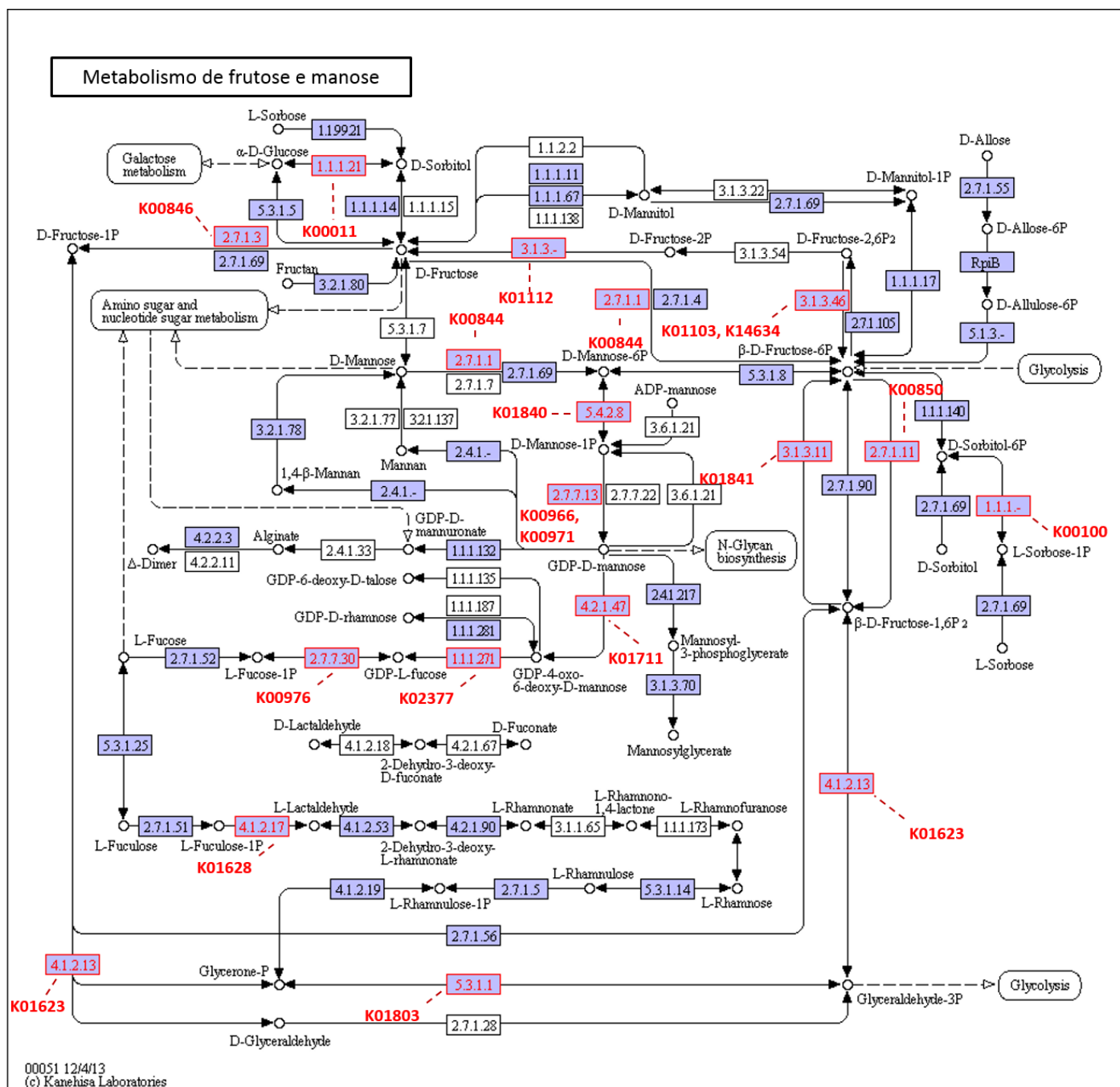


Figura suplementar 10. Vias metabólicas de carboidratos

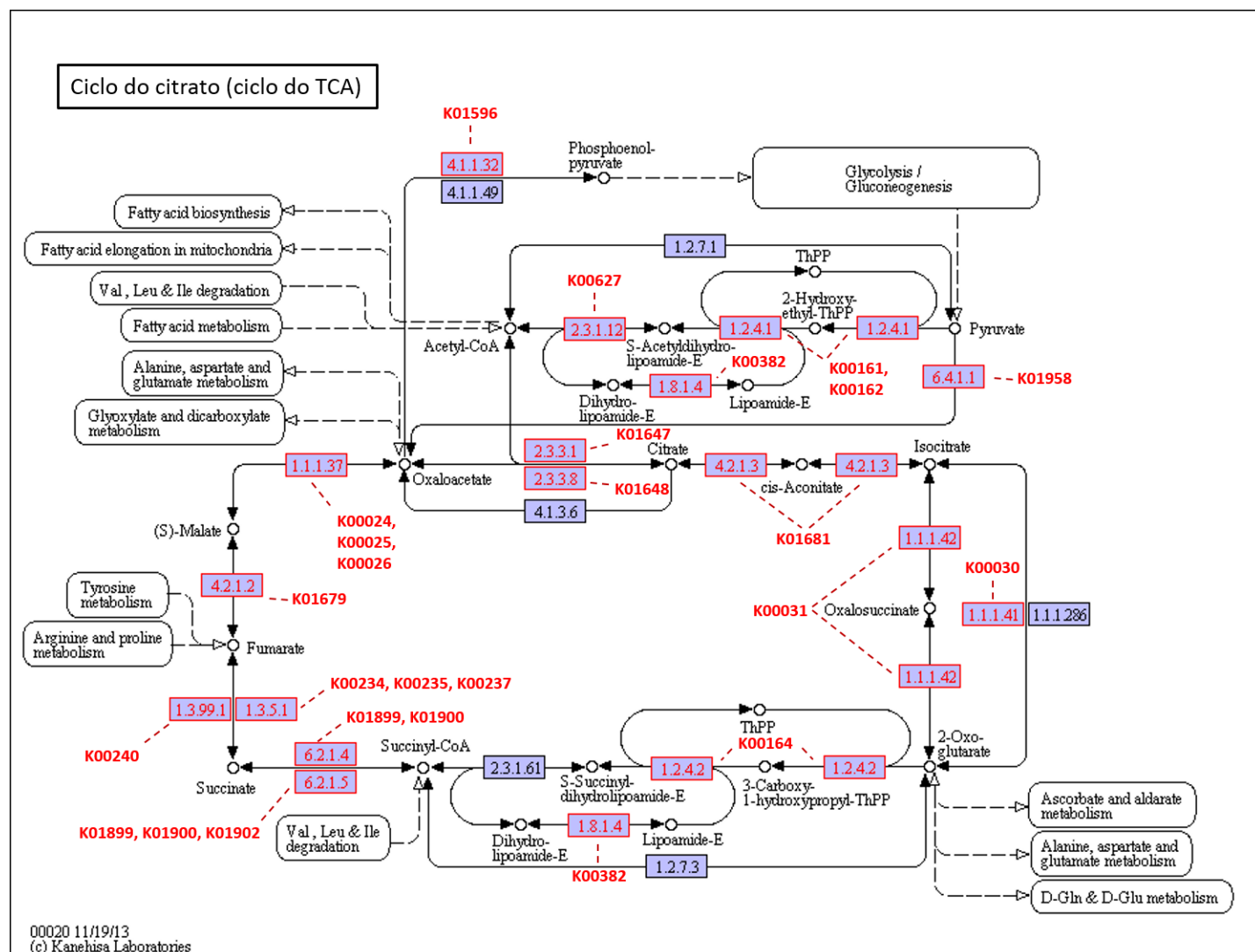


Figura suplementar 11. Vias metabólicas de glicanos

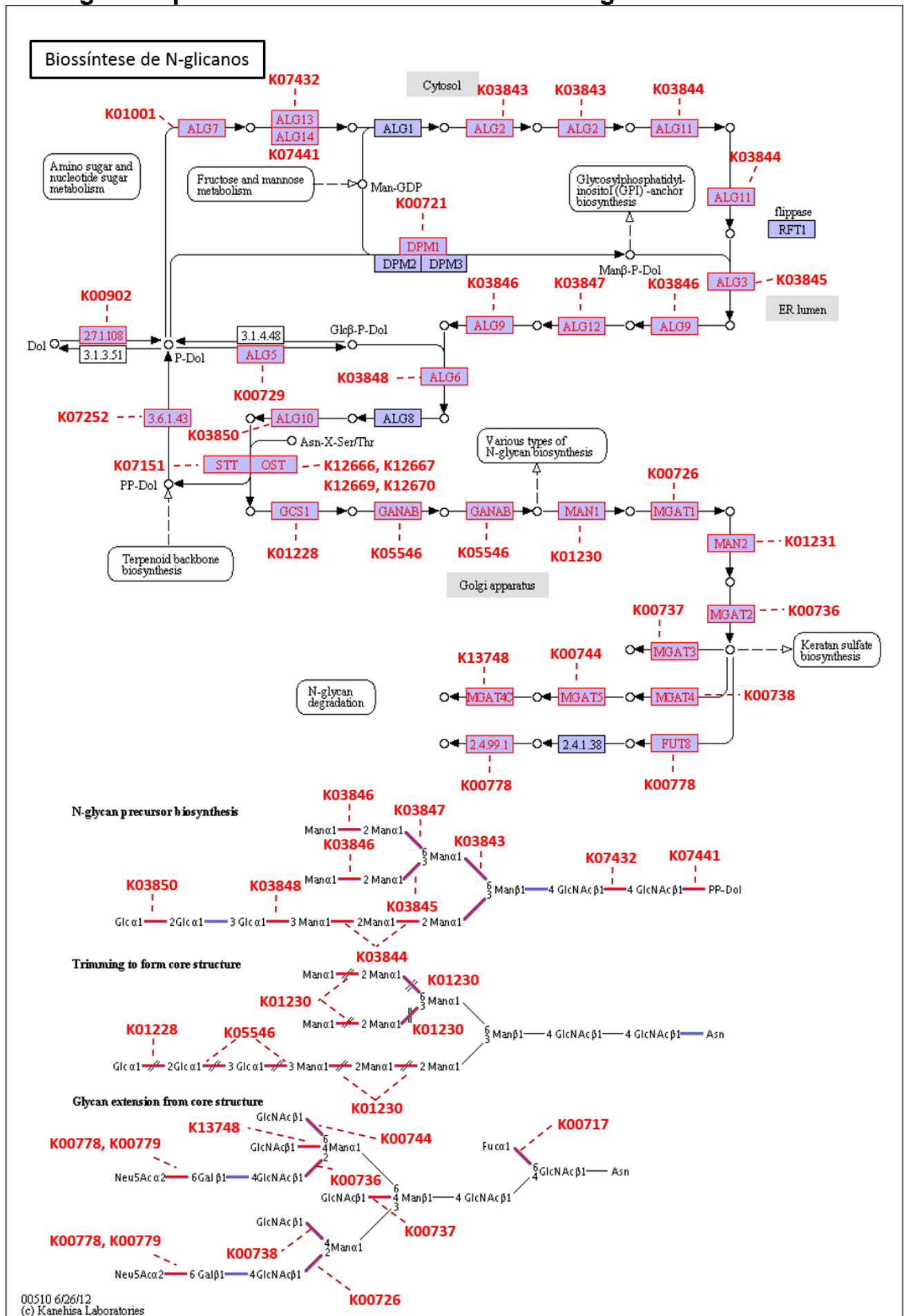


Figura suplementar 12. Vias metabólicas de glicanos

Biosíntese de glicosaminoglinacos (sulfato de heparana)

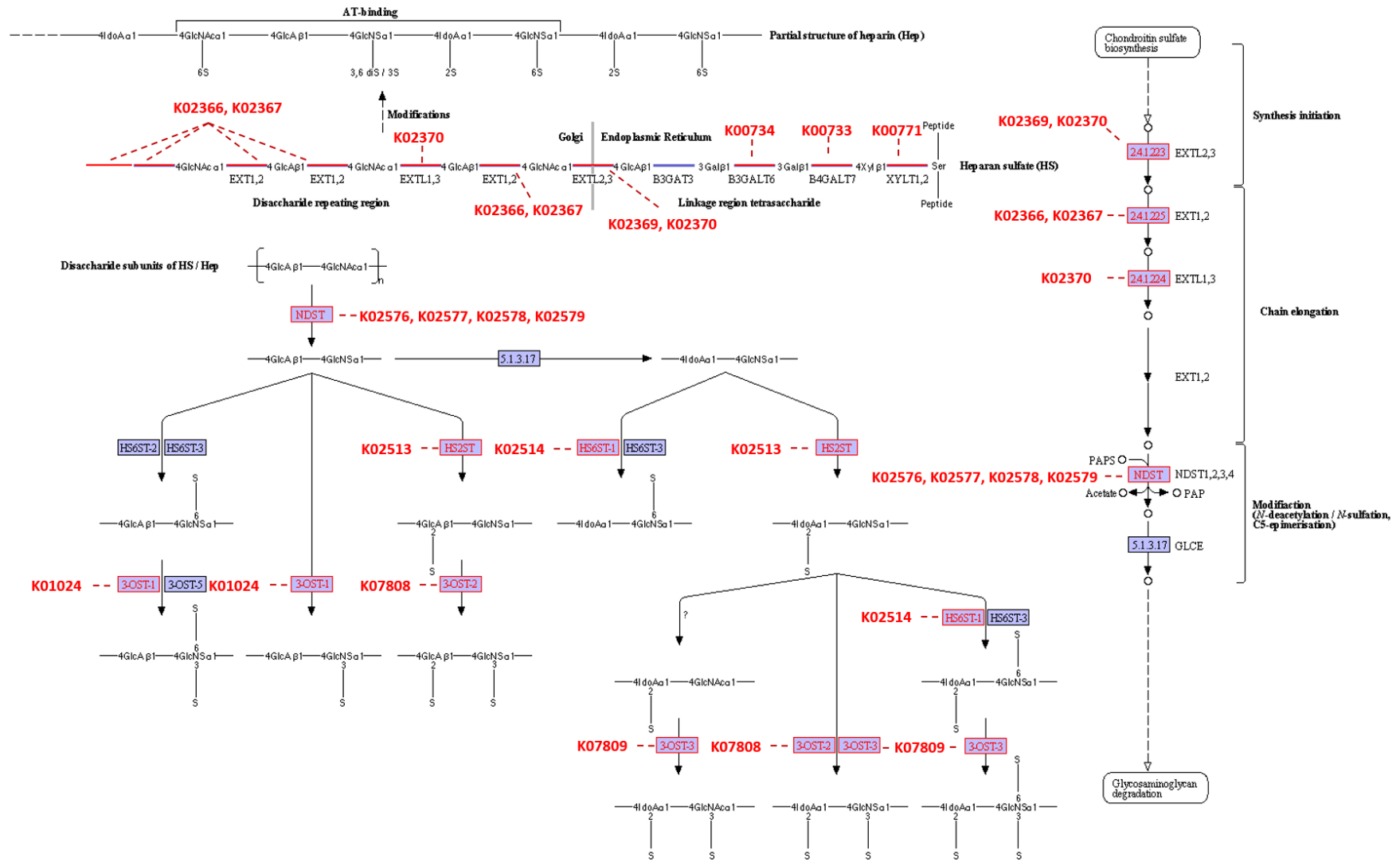
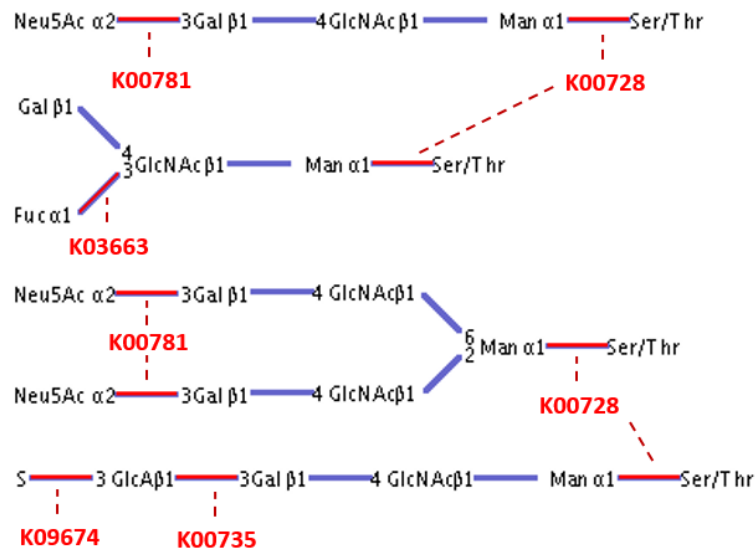


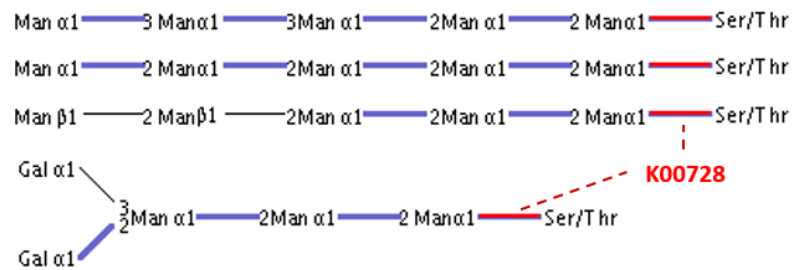
Figura suplementar 13. Vias metabólicas de glicanos

Biossíntese de outros tipos de O-glicanos

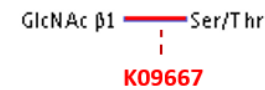
O-linked Man type (Mammal)



O-linked Man type (Yeast)



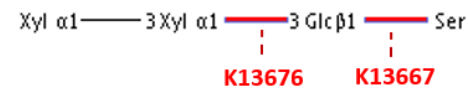
O-linked GlcNAc type



O-linked Fuc type



O-linked Glx type



O-linked Gal type

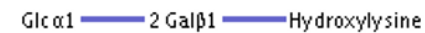


Figura suplementar 14. Vias metabólicas de glicanos

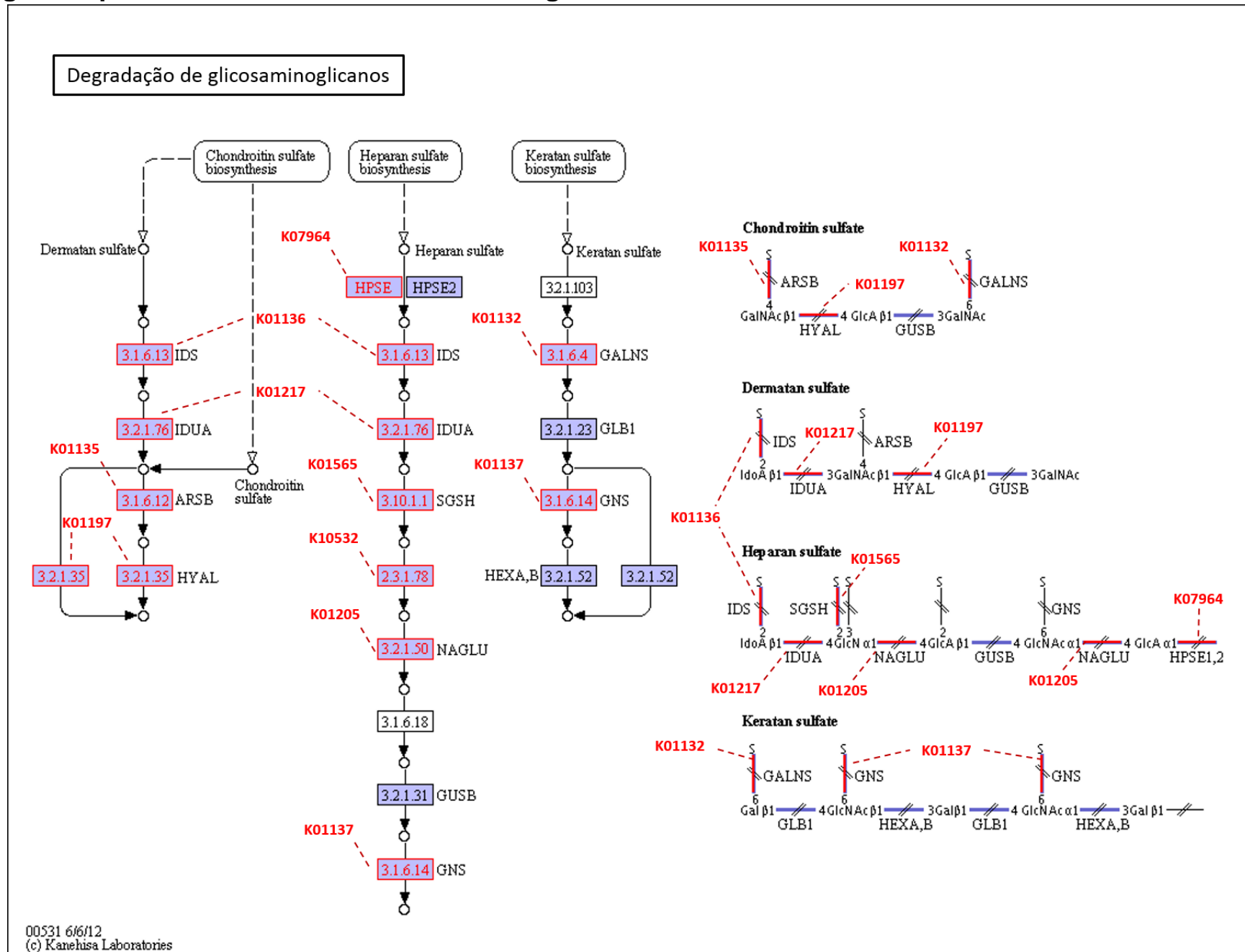


Figura suplementar 16. Vias metabólicas de lipídeos

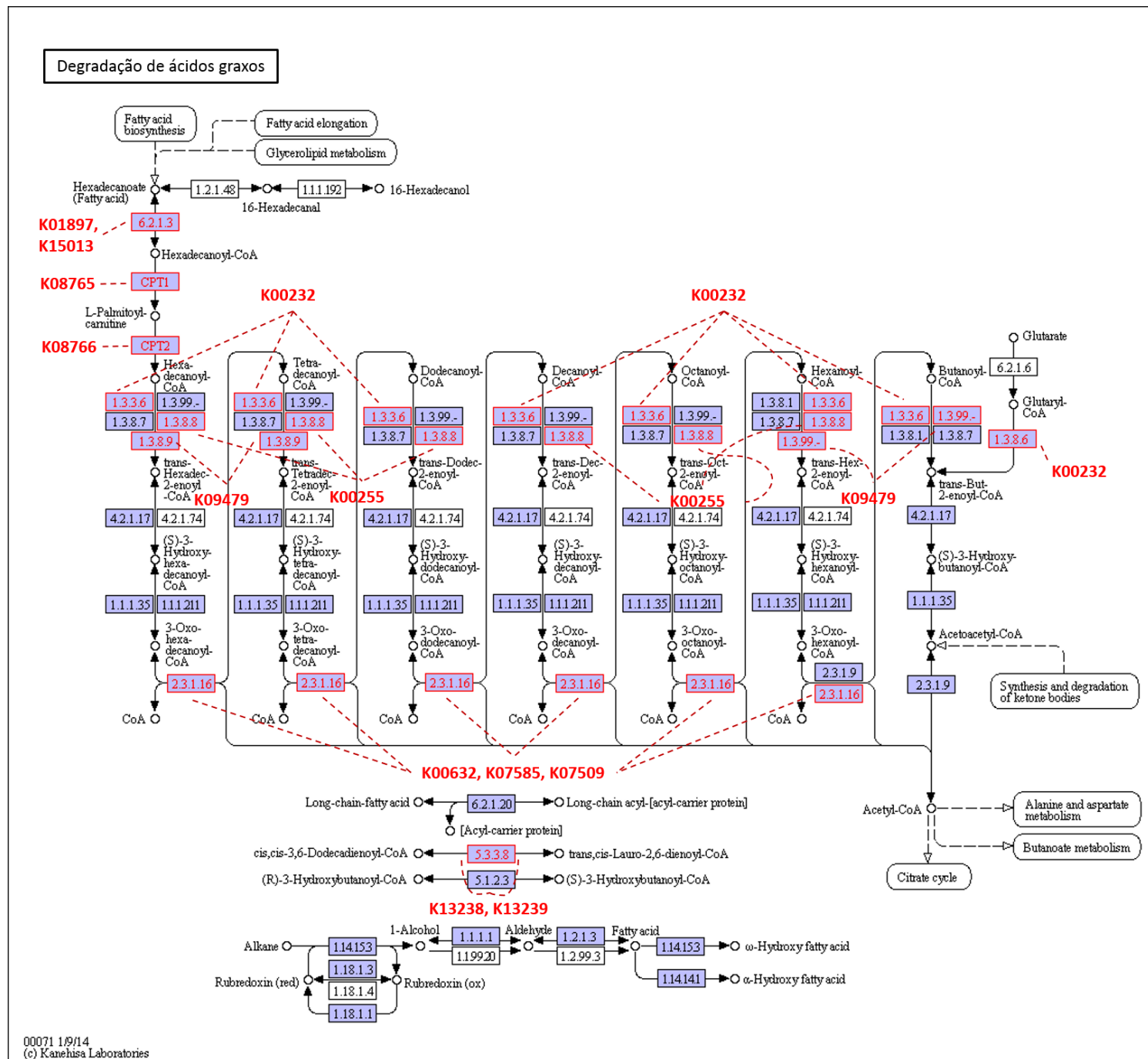


Figura suplementar 17. Vias metabólicas de lipídeos

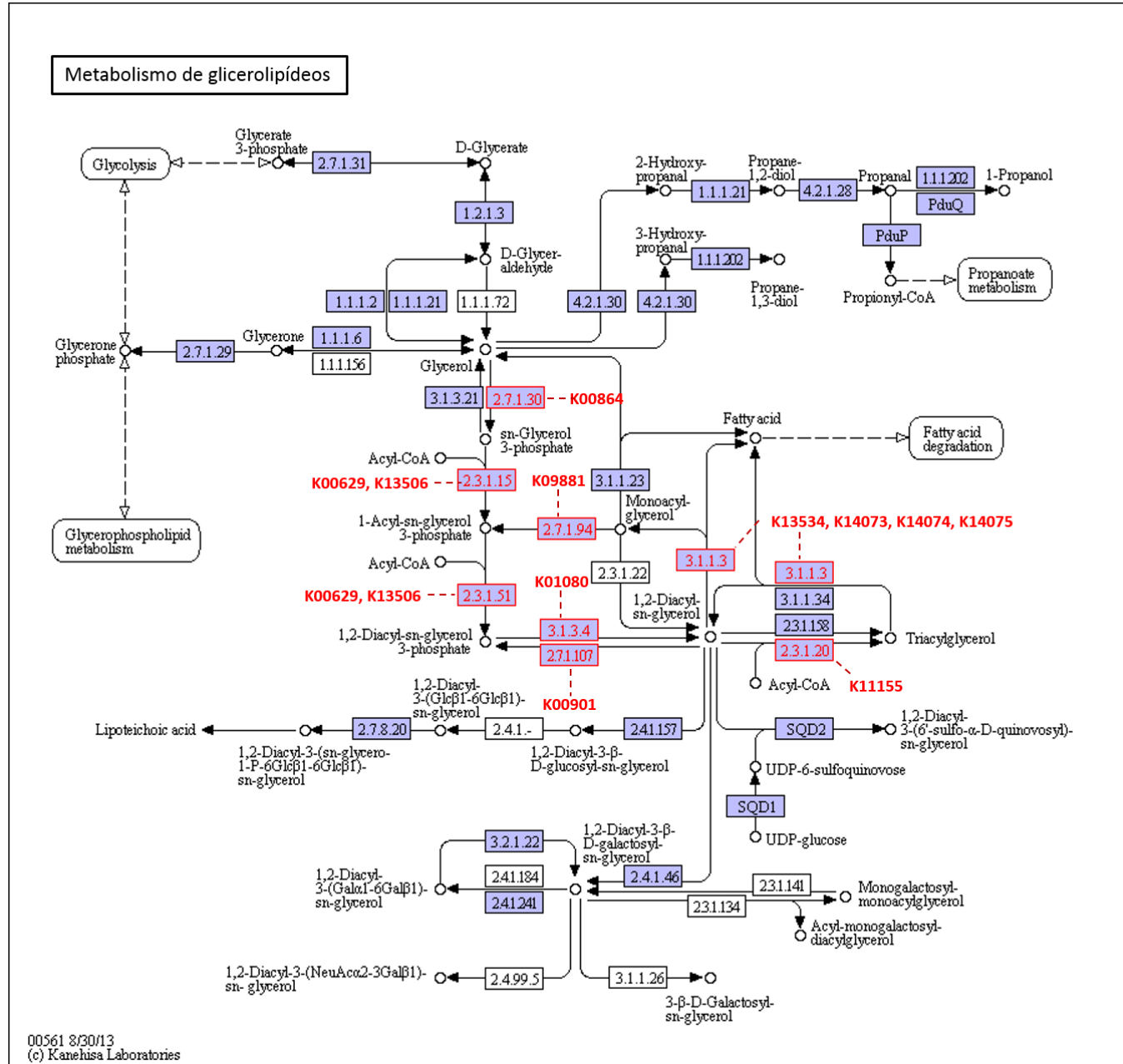


Figura suplementar 19. Vias metabólicas de lipídeos

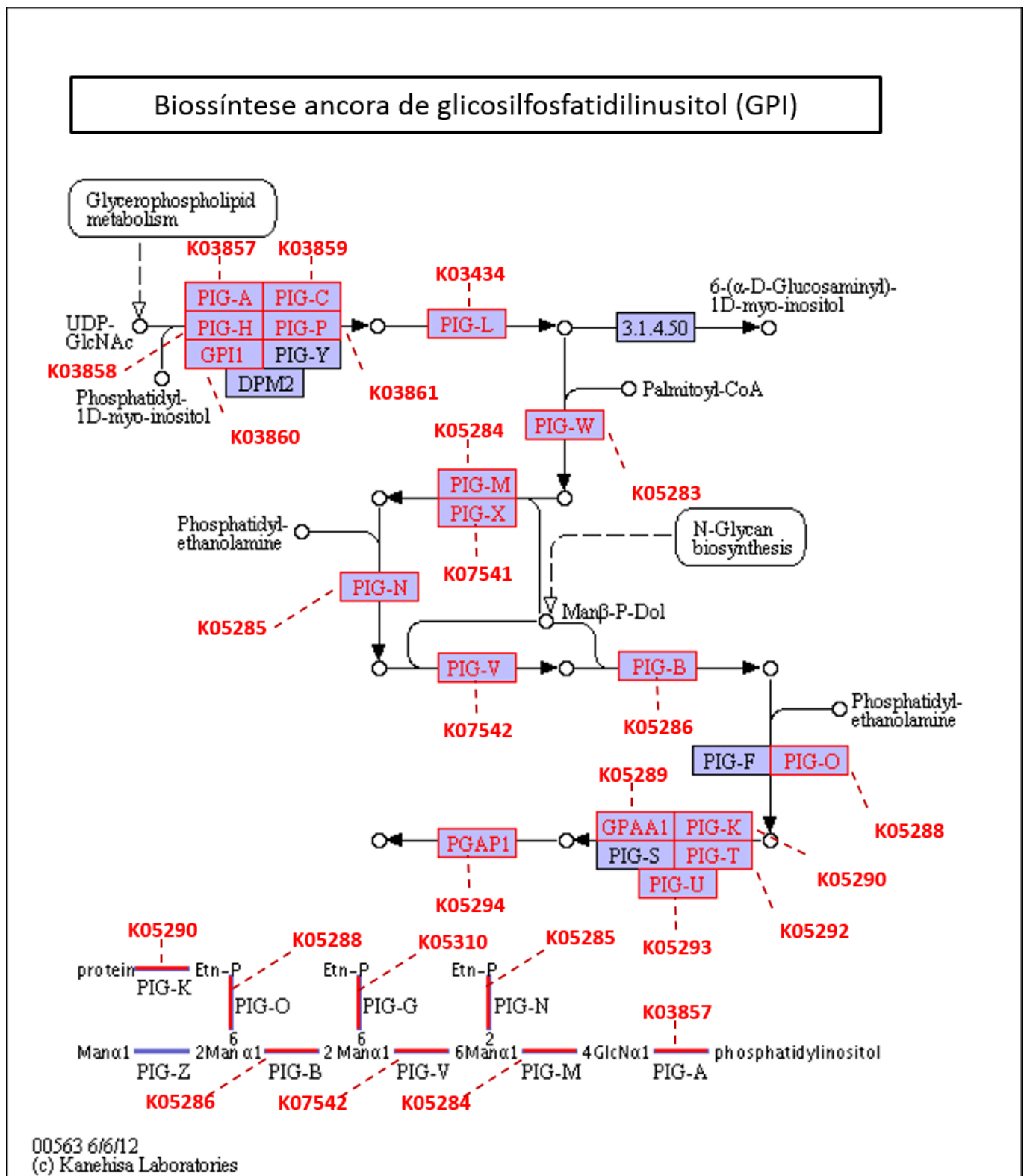


Figura suplementar 20. Vias metabólicas de lípidos

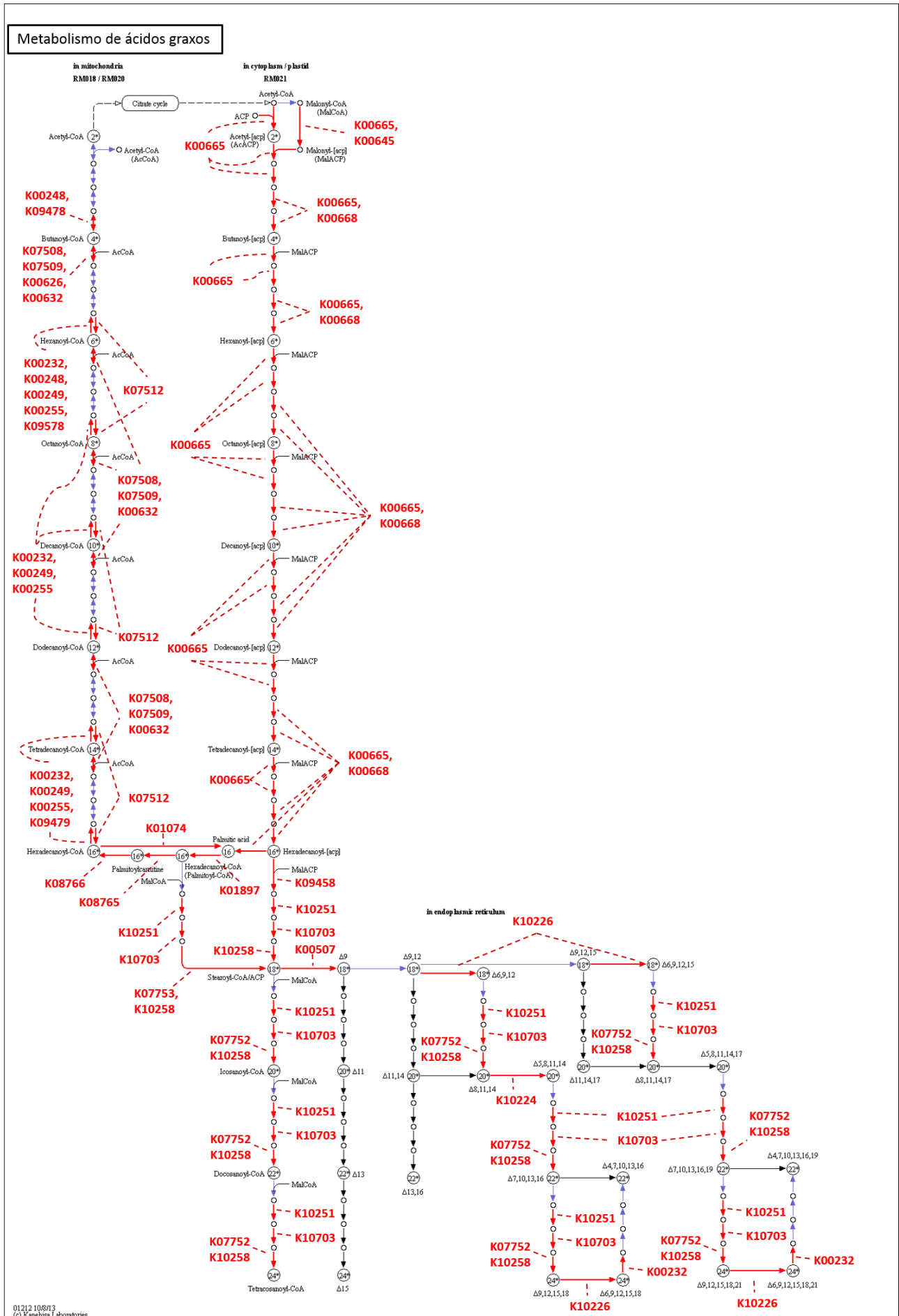


Figura suplementar 21. Via de cascata de coagulação

