

Adrian Jose Jaimes Becerra

Evolução do veneno em cnidários

Evolution of venoms in cnidarians

São Paulo

2021

Adrian Jose Jaimes Becerra

Evolução do veneno em cnidários

Evolution of venoms in cnidarians

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências Biológicas na Área de Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio C. Marques

São Paulo

2021

Resumo

A ampla gama de animais peçonhentos, de medusas flutuantes a serpentes coleantes, tem provocado fascínio na história da humanidade. A evolução do veneno, cuja compreensão é um dos grandes desafios da biologia, seguramente teve um papel essencial na diversificação de diversas linhagens de animais. O veneno é um coquetel diverso de peptídeos farmacologicamente ativos, sais e moléculas orgânicas. A injeção de algumas dessas proteínas tóxicas, mesmo em quantidades ínfimas, pode paralisar e aniquilar presas em poucos minutos. Em Cnidaria, os nematocistos têm o papel de injetar o veneno, representando a mais antiga estrutura especializada de inoculação de veneno no reino animal. Porém, o conhecimento sobre o veneno de cnidários, sua composição e, especialmente, seu contexto evolutivo, é incipiente. Este estudo teve, como objetivo geral, ampliar a amostragem de táxons do filo Cnidaria nos quais seus venenos sejam caracterizados a partir de dados de transcriptomas e proteomas, e usar essas informações em um contexto comparativo para inovar na compreensão da evolução do veneno em Cnidaria. O capítulo 1, “*Beyond primary sequence’ — Proteomic data reveal complex toxins in cnidarian venoms*” é um estudo comparativo sobre a composição do veneno de 11 espécies de cnidários gerados a partir de proteomas, inclusive um contexto mais amplo com venenos de animais peçonhentos em geral. O capítulo 2, “*Transcriptomic analyses and molecular evolution of cnidarian venoms*” traz uma análise transcriptômica de oito espécies de Medusozoa que caracteriza suas famílias de toxinas, além inferir as relações evolutivas e os padrões de seleção em cinco famílias de toxinas dentre as mais diversas do filo. O capítulo 3, “*Recruitment of toxin-like proteins with ancestral venom function supports endoparasitic lifestyles of Myxozoa*”, expande a compreensão sobre a evolução das toxinas em cnidários como um todo, enfocando o contexto evolutivo de reposicionamento das toxinas em um clado com modo de vida endoparasita. Por fim, o Capítulo 4, “*Reciprocal transplantation of the heterotrophic coral Tubastraea coccinea (Scleractinia: Dendrophylliidae) between distinct habitats did not alter its venom toxin composition*”, é um estudo experimental sobre a plasticidade de resposta intraespecífica, com origem ecológica e adaptativa, sobre a composição do veneno e dos nematocistos em um clones vivendo em diferentes ambientes.

Abstract

The wide range of venomous animals, from floating jellyfish to slithering snakes, has fascinated human history. The evolution of venom, whose understanding is one of the great challenges of biology, certainly played an essential role in the diversification of several animal lineages. Venom is a diverse cocktail of pharmacologically active peptides, salts and organic molecules. Injecting some of these toxic proteins, even in low amounts, can paralyze and annihilate prey within minutes. In Cnidaria, nematocysts have the role of injecting venom, representing the oldest specialized structure of venom inoculation in the animal kingdom. However, knowledge about the cnidarian venom, its composition and, especially, its evolutionary context, is incipient. This study aimed to broaden the sampling of Cnidaria phylum taxa in which their venoms are characterized from transcriptome and proteome data, and to use this information in a comparative context to innovate in understanding the evolution of the venom in Cnidaria. Chapter 1, "Beyond primary sequence' — Proteomic data reveal complex toxins in cnidarian venoms" is a comparative study of the venom composition of 11 species of cnidarians generated from proteomes, including a broader context with venoms from other venomous animal lineages. Chapter 2, "Transcriptomic analyses and molecular evolution of cnidarian venoms" provides a transcriptomic analysis of eight species of Medusozoa that characterizes their toxin families, in addition to inferring the evolutionary relationships and selection patterns in five toxin families, which are the most diverse in the phylum. Chapter 3, "Recruitment of toxin-like proteins with ancestral venom function supports endoparasitic lifestyles of Myxozoa", expands our understanding of the evolution of toxins in cnidarians as a whole, focusing on the evolutionary context of repositioning toxins in a clade with mode of endoparasitic life. Finally, Chapter 4, "Reciprocal transplantation of the heterotrophic coral *Tubastraea coccinea* (Scleractinia: Dendrophylliidae) between distinct habitats did not alter its venom toxin composition", is an experimental study on the plasticity of the intraspecific response, with ecological and adaptive origin, on the composition of venom and nematocysts in clones living in different environments.

Introdução Geral

A ampla gama de animais peçonhentos, de medusas flutuantes a serpentes coleantes, tem provocado fascínio na história da humanidade. A evolução do veneno, cuja compreensão é um dos grandes desafios da biologia, seguramente teve um papel essencial na diversificação de diversas linhagens de animais. Em um contexto comparativo, o veneno é uma das adaptações que mais evoluiu de maneira independente na natureza. Uma estimativa conservadora sugere que o atributo do veneno evoluiu mais de 30 vezes no reino animal, desempenhando papéis importantes na predação, defesa, competição intraespecífica e outras funções (Casewell *et al.*, 2013; Jenner & Undheim, 2017). Esta diversidade funcional e taxonômica destaca a relevância do veneno como inovação evolutiva, e acentua sua importância na biologia dos grupos.

A maioria dos venenos animais é um coquetel complexo de compostos bioativos que perturbam o funcionamento fisiológico normal das vítimas envenenadas e compreendem, tipicamente, uma mistura de proteínas e peptídeos (referidos como toxinas), que são as moléculas mais abundantes, além de sais e componentes orgânicos, tais como aminoácidos e neurotransmissores (Fry *et al.*, 2009; Casewell *et al.*, 2013; Hargreaves *et al.*, 2014; Jouiaei *et al.*, 2015a). A injeção de algumas dessas proteínas tóxicas, mesmo em quantidades ínfimas, pode paralisar e aniquilar presas em poucos minutos. O modelo evolutivo mais aceito é aquele que estabelece que os genes que codificam esses componentes evoluíram sob seleção darwiniana positiva, inseridos no contexto de uma “corrida armamentista” evolutiva (Duda & Palumbi, 1999; Sunagar *et al.*, 2012). Por outro lado, há evidências de várias famílias de proteínas com funções não venenosas que são recrutadas independentemente nos venenos de diferentes linhagens de animais (Fry *et al.*, 2009) e, inclusive, algumas famílias de toxinas em certos venenos evoluem principalmente sob seleção purificadora, havendo seleção positiva apenas de maneira episódica (Jouiaei *et al.*, 2015b; Sunagar & Moran, 2015).

A literatura especializada vem documentando um interesse crescente no conhecimento sobre venenos por conta de seu uso nas áreas farmacológicas e biotecnológicas, basicamente devido ao fato deles serem reconhecidos como uma fonte diversa de compostos de ampla aplicação, podendo promover o desenvolvimento de produtos como inseticidas até medicamentos (Smith *et al.*, 2013;

Bordon *et al.*, 2020; Nisaa *et al.*, 2021). Conjugado a esse interesse, a importância evolutiva e ecológica do veneno também vem sendo enfatizada nos últimos anos, assim como sua influência determinante sobre as interações inter- e intraespecíficas (Sunagar *et al.*, 2015; Schendel *et al.*, 2019; Ashwood *et al.*, 2020; Casewell *et al.*, 2020; O'Hara *et al.*, 2021). Ademais, os sistemas de venenos fornecem modelos sem paralelo para investigar bases moleculares da adaptação, isto é, as inter-relações entre a seleção natural e os processos genéticos e moleculares responsáveis por gerar a diversidade molecular e, portanto, a variação na composição das toxinas e em sua ação (Wong & Belov, 2012, Casewell *et al.*, 2013; Starcevic & Long, 2013; Zancolli & Casewell, 2020).

O filo Cnidaria, que inclui animais tais como as anêmonas-do-mar, os corais, as águas-vivas e as hidras, é a mais antiga linhagem existente de animais venenosos. Cnidaria é um filo que compreende mais de 13.500 espécies de vida livre ou parasitas, marinhas ou de água doce (Daly *et al.*, 2007; Okamura *et al.*, 2015). O monofiletismo do filo está corroborado em todas as análises filogenéticas publicadas até o momento, baseadas em caracteres morfológicos ou moleculares (Marques & Collins, 2004; Collins *et al.*, 2006; Kayal *et al.*, 2013, 2018; Zapata *et al.*, 2015). Atualmente, os cnidários são divididos em três clados principais: Anthozoa, Medusozoa e, mais recentemente, Endocnidozoa, que compreende animais endoparasitas incluindo Myxozoa e Polipodiozoa (Bridge *et al.*, 1992; Marques & Collins, 2004; Collins, 2009). A origem do grupo é neoproterozoica (~650 milhões de anos) sendo, portanto, anteriores à irradiação cambriana (Van iten *et al.*, 2014). A linhagem dos cnidários, que apresenta uma anatomia simples, coexistiu com o surgimento e declínio de várias novas formas de vida, algumas com estratégias complexas de sensoriamento ambiental, processamento de informações, locomoção e alimentação (Shinzato *et al.*, 2011; Van Iten *et al.*, 2014). Talvez um componente significativo da sobrevivência e diversificação de cnidários esteja relacionado à produção de veneno, que teriam um papel fundamental na interação com presas e predadores morfológicamente mais complexos (Anderluh & Macek, 2002; Šuput, 2009; Badre, 2014; Ashwood *et al.*, 2020; O'Hara *et al.*, 2021). As cnidas são organelas especializadas que definem Cnidaria, podendo descarregar seu conteúdo interno mediante a ativação dos cnidócitos por estímulos externos de natureza mecânica ou química. Estão distribuídas em várias partes do corpo dos cnidários, sendo classificadas em três tipos principais, *viz.*, nematocistos, espirocistos e pticocistos (Östman, 2000; Özbek *et al.*,

2009). Os nematocistos são encontrados em todos os cnidários, sendo sua estrutura primária de inoculação do veneno (Fautin, 2009) e a sinapomorfia do filo.

Desde o início do século XX, experimentos analíticos e observações clínicas têm explorado a diversidade toxicológica dos venenos de cnidários (Hessinger & Lenhoff, 1988). A diversidade dos componentes do veneno varia desde compostos não proteicos (purinas, aminas biogênicas) até proteínas de peso molecular elevado, tais como as enzimas, que incluem proteínas lipolíticas e proteolíticas que catabolizam os tecidos da presa, toxinas que formam poros e podem causar morte celular via lise osmótica, e neurotoxinas que exibem atividades rápidas e específicas atuando sobre canais iônicos (Šuput 2009; Mariottini & Pane, 2013; Badré, 2014; Mariottini, 2014; Jouiaei *et al.*, 2015b; Mariottini *et al.*, 2015). Os venenos dos cnidários são semelhantes aos de outros animais peçonhentos (Weston *et al.*, 2013; Jaimes-Becerra *et al.*, 2017, 2019).

A caracterização de toxinas de veneno usando plataformas de sequenciamento emergentes vem sendo cada vez mais acessível, particularmente as abordagens de transcriptômica e de proteômica de alto rendimento, que expandiram significativamente o conhecimento sobre a composição dos venenos de cnidários nos últimos anos (Balasubramanian *et al.*, 2012; Weston *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Rachamim *et al.*, 2014; Brinkman *et al.*, 2015; Gacesa *et al.*, 2015; Jouiaei *et al.*, 2015b; Macrander *et al.*, 2015, 2016; Huang *et al.*, 2016; Lewis-Ames *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Ponce *et al.*, 2016; Madio *et al.*, 2017; Columbus-Shenkar *et al.*, 2018; Liao *et al.*, 2018, 2019; Rivera de Torre *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Ramirez-Carreto *et al.*, 2019; Surm *et al.*, 2019; Sachkova *et al.*, 2019; Klompen *et al.*, 2020 Mitchell *et al.*, 2020). Porém, a caracterização dos venenos em Cnidaria tem sido baseada em uma amostragem sub-representada, em que os estudos estão limitados a poucos táxons, o que pode influenciar a compreensão da evolução do veneno em cnidários como um todo (Jouiaei *et al.*, 2015a). Esses dados também representam a informação primária a partir da qual os processos evolutivos e os padrões podem ser inferidos.

Do mesmo modo, há poucos estudos que exploraram a existência de padrões evolutivos na variação da composição do veneno em Cnidaria. Mudanças na composição do veneno no grupo foram registradas em diferentes níveis biológicos: entre clados, entre diferentes estágios do ciclo de vida, entre diferentes habitats e, até mesmo, entre diferentes tipos de tecidos e nematocistos dentro de um organismo

(Underwood & Seymour, 2007; Rachamim *et al.*, 2014; Brinkman *et al.*, 2015; Macrander *et al.*, 2016; Jaimes-Becerra *et al.*, 2017; Columbus-Shenkar *et al.*, 2018; Doonan *et al.*, 2019). Igualmente, apesar do boom na geração de transcriptomas e genomas de cnidários, foram publicados poucos estudos que abordem a evolução molecular do veneno (Jouiaei *et al.*, 2015b; Macrander *et al.*, 2016; Surm *et al.*, 2019; Klompen *et al.*, 2021). A evolução molecular das distintas famílias de toxinas, assim como os seus mecanismos subjacentes, são pouco compreendidos (Casewell *et al.*, 2013; Sunagar *et al.*, 2015).

Embora haja avanços no conhecimento recente, é fato que ignoramos muitas facetas da história natural dos venenos e das interações entre essa história natural e processos e padrões de evolução do conteúdo desses arsenais químicos, especialmente em que todas as espécies são venenosas, como Cnidaria.

Objetivo geral

O objetivo deste estudo é ampliar a amostragem de táxons do filo Cnidaria nos quais seus venenos sejam caracterizados a partir de dados de transcriptomas e proteomas, e usar essas informações em um contexto comparativo para inovar na compreensão da evolução do veneno em Cnidaria. Com isso, os contextos abordados neste estudo foram a variação macroevolutiva do veneno na perspectiva comparativa para todas as classes de Cnidaria, sua variação microevolutiva e intraespecífica em relação à diversidade de ambientes ocupados por esses organismos, uma análise comparativa da evolução molecular de diversas famílias de toxinas, e o papel do veneno na evolução entre o hábito de vida livre para o hábito parasita em cnidários.

Organização da Tese

À parte esta introdução geral, essa tese é apresentada em 4 capítulos principais e uma seção de considerações finais.

O capítulo 1 é um artigo publicado em 2019 na revista *Integrative and Comparative Biology*, em que sou o primeiro autor, que apresenta a caracterização do veneno a partir dos proteomas de 3 espécies de Cnidaria (*Haliclystus antarcticus*, *Ectopleura crocea* e *Tubastraea coccinea*). Nesse capítulo comparamos a diversidade de toxinas e a evolução do veneno em cnidários em relação a outros grupos de

animais peçonhentos, por meio de agrupamento não supervisionado de dados de similaridade de sequência de pares usando dados inéditos e os dados qualificados disponíveis até aquela data.

O capítulo 2 é um artigo ainda inédito que apresenta a caracterização do veneno a partir de 8 transcriptomas inéditos para Cnidaria (*viz.*, *Ectopleura crocea*, *Macrorhynchia philippina*, *Orthopyxis sargassicola*, *Chiropsalmus quadrumanus*, *Chrysaora lactea*, *Cassiopea andromeda*, *Cassiopea frondosa* e *Cassiopea xamachana*), com inferências das relações evolutivas e dos padrões de seleção em cinco das principais famílias de toxinas que ocorrem em Cnidaria.

O capítulo 3 é um artigo publicado em 2021 na revista PeerJ, em que sou o co-primeiro autor, que apresenta a caracterização do veneno a partir dos transcriptomas e proteomas de 2 espécies de cnidários endoparasitas, *viz.* *Buddenbrockia plumatellae*, *Polypodium hydriforme* e o estaurozoário *Calvadosia cruxmelitensis*, e analisa a adaptação do papel funcional das toxinas do veneno na transição de espécies de vida livre para espécies com modo de vida parasitas, como ocorre nos endocnidozoários.

O capítulo 4 é um artigo publicado em 2020 na revista Ecology and Evolution, em que sou co-autor, que investiga em que medida a distribuição geográfica e os fatores ambientais influenciam modificações microevolutivas e intraespecíficas na composição do veneno, usando experimentação com clones do coral heterotrófico *Tubastraea coccinea*.

Considerações Finais

A evolução do veneno, uma das misturas bioquímicas mais complexas da natureza, tem sustentado o sucesso em predação e a diversificação de numerosas linhagens animais. Esse coquetel de peptídeos farmacologicamente ativos, com proteínas, sais e moléculas orgânicas, é frequentemente empregado na predação e na defesa do animal que o secreta. Há um vasto número de estudos realizados sobre os venenos de diversos grupos de animais peçonhentos, como cobras, caramujos, aranhas e escorpiões, mas os venenos de cnidários têm sido estudados de forma menos intensa, apesar de seu grande potencial terapêutico. A identificação de peptídeos tóxicos específicos e os estudos de biologia evolutiva do veneno em cnidários está limitada a um pequeno número de toxinas e táxons, principalmente de espécies da classe Anthozoa (Rachamim *et al.*, 2014; Gacesa *et al.*, 2015; Jouiaei *et al.*, 2015b; Klompen *et al.*, 2020).

Este estudo colaborou com diversos inéditos, incorporando o conhecimento sobre 6 novos proteomas e 11 novos transcriptomas de diferentes espécies de todas as classes do filo Cnidaria. Esses novos dados permitiram uma grande ampliação do horizonte de comparação, permitindo inferências inovadoras e mais abrangentes da composição dos venenos dos diferentes grupos do filo, e estudos evolutivos focados em responder perguntas pioneiras na pesquisa do veneno em cnidários.

No primeiro capítulo, a comparação da presença ou ausência de 32 famílias de proteínas de toxinas indicou que a composição do veneno não variou amplamente entre as 11 espécies de cnidários estudadas. O agrupamento não supervisionado de sequências de peptídeos de toxinas sugeriu que a composição de toxinas dos venenos de cnidários é tão complexa quanto a de muitos animais bilaterais peçonhentos, incluindo as cobras marinhas. No segundo capítulo nós fornecemos um levantamento da composição putativa do veneno de oito espécies de Medusozoa e elucidamos as histórias filogenéticas e evolutivas moleculares de cinco famílias de toxinas de cnidários, onde descobrimos que elas estão predominantemente sob a influência da seleção purificadora (negativa), em dissonância com a hipótese predominante para a evolução de venenos em geral. No terceiro capítulo, nossas análises de transcriptômica e proteômica fornecem evidências para a expressão e tradução de homólogos de toxinas de veneno em mixozoários. A posição filogenética de inibidores de proteínas tipo Kunitz e enzimas fosfolipases A_2 revelou que a

modificação de toxinas tem um base herdada das toxinas de cnidários ancestrais de vida livre, e que a diversidade do veneno está reduzida em mixozoários, concordando com os seus genomas de tamanhos reduzidos. Por fim, no quarto capítulo, a complexidade das toxinas em nematocistos isolados do coral heterotrófico *Tubastraea coccinea* não variou significativamente em colônias genotipicamente idênticas retiradas de locais não costeiros e costeiros, ou mesmo após do transplante recíproco de fragmentos clonais entre esse dois locais. A morfologia estrutural e a composição do veneno do cnidoma também não se alteraram durante o período de estudo do experimento, que foi de 6 semanas.

Em resumo, os organismos peçonhentos oferecem modelos interessantes para abordar questões-chave relacionadas à biologia evolutiva e molecular e, com os avanços cada vez maiores em tecnologias -ômicas, o valor da pesquisa de veneno está ganhando impulso entre a comunidade científica mais ampla. Os dados gerados representam um recurso essencial para orientar estudos evolutivos futuros e a descoberta de novas proteínas e peptídeos no filo Cnidaria. No entanto, muito mais esforço de pesquisa ainda se faz necessário antes que uma ampla compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à origem, evolução e regulação de diversos sistemas de veneno animal possa ser realizada.

Referências

- Anderluh, G. & Maček, P. 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* 40: 111–124.
- Ashwood, L.; Norton, R.; Undheim, E.; Hurwood, D. & Prentis, P.J. 2020. Characterising Functional Venom Profiles of Anthozoans and Medusozoans within Their Ecological Context. *Marine drugs* 18:202.
- Badré, S. 2014. Bioactive toxins from stinging jellyfish. *Toxicon* 91: 114–125.
- Balasubramanian, P.G.; Beckmann, A.; Warnken, U.; Schnölzer, M.; Schüler, A.; Bornberg-Bauer, E.; Holstein, T.W. & Özbek, S. 2012. Proteome of *Hydra* nematocyst. *Journal of Biological Chemistry* 287: 9672–9681.
- Bordon, K.; Cologna, C.; Fornari-Baldo, E.; Pinheiro-Junior, E.; Cerni, F.; Amorim, F.; Anjolette, F.; Cordeiro, F.; Wiesel, G.; Cardoso, L.; Ferreira, I.; Oliveira, I.; Boldrini, J.; Pucca, M.; Baldo, M. & Arantes, E. 2020. From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. *Frontiers in pharmacology* 11:1132.
- Bridge, D.; Cunningham, C.W.; DeSalle, R. & Buss, L.W. 1992. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: Evidence from mitochondrial genome structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 8750–8753.
- Brinkman, D.L.; Jia, X.; Potriquet, J.; Kumar, D.; Dash, D.; Kvaskoff, D. & Mulvenna, J. 2015. Transcriptome and venom proteome of the box jellyfish *Chironex fleckeri*. *BMC Genomics* 16: 1–15.
- Casewell, N.R.; Jackson, T.; Laustsen, A. & Sunagar, K. 2020. Causes and Consequences of Snake Venom Variation. *Trends in Pharmacological Sciences* 41: 570–581.
- Casewell, N.R.; Wüster, W.; Vonk, F.J.; Harrison, R.A. & Fry, B.G. 2013. Complex cocktails: The evolutionary novelty of venoms. *Trends in Ecology and Evolution* 28: 219–229.
- Collins, A.G. 2009. Recent insights into cnidarian phylogeny. *Smithson. Contrib. Mar. Sci.* 139–149.
- Collins, A.G.; Schuchert, P.; Marques, A.C.; Jankowski, T.; Medina, M. & Schierwater, B. 2006. Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Systematic Biology* 55: 97–115.
- Columbus-Shenkar, Y.Y.; Sachkova, M.Y.; Macrander, J.; Fridrich, A.; Modepalli, V.; Reitzel, A.M.; Sunagar, K. & Moran, Y. 2018. Dynamics of venom composition across a complex life cycle. *eLIFE* 7:e35014.

- Daly, M.; Brugler, M.R.; Cartwright, P.; Collins, A.G.; Dawson, M.N.; Fautin, D.G. France, S.C.; McFadden, C.S.; Opresko, D.M.; Rodriguez, E.; Romano, S.L. & Stake, J.L. 2007. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa* 182: 127–182.
- Doonan, L.B.; Lynham, S.; Quinlan, C.; Ibiji, S.C.; Winter, C.E.; Padilla, G.; Jaimes-Becerra, A.; Morandini, A.C.; Marques, A.C. & Long, P.F. 2019. Venom composition does not vary greatly between different nematocyst types isolated from the primary tentacles of *Olin dias sambaquiensis* (Cnidaria: Hydrozoa). *The Biological Bulletin*, 237: 26–35.
- Duda, T.F. & Palumbi, S.R. 1999. Molecular genetics of ecological diversification: duplication and rapid evolution of toxin genes of the venomous gastropod *Conus*. *Proceedings of the National Academy Sciences USA* 96:6820–6823.
- Fautin, D.G. 2009. Structural diversity, systematics, and evolution of cnidae. *Toxicon* 54: 1054–1064.
- Fry, B.G.; Roelants, K.; Champagne, D.E.; Scheib, H.; Tyndall, J.D.; King, G.F.; Nevalainen, T.J.; Norman, J.; Lewis, R.J.; Norton, R.S.; Renjifo, C. & de la Vega, R.C.R. 2009. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 10: 483–511.
- Gacesa, R.; Chung, R.; Dunn, S.R.; Weston, A.; Jaimes-Becerra, A.; Marques, A.C.; Morandini, A.; Hranueli, D.; Starcevic, A.; Ward, M. & Long, P.F. 2015. Gene duplications are extensive and contribute significantly to the toxic proteome of nematocysts isolated from *Acropora digitifera* (Cnidaria: Anthozoa: Scleractinia). *BMC Genomics* 16:774.
- Hargreaves, A.D.; Swain, M.T.; Logan, D.W. & Mulley, J.F. 2014. Testing the Toxicofera: comparative reptile transcriptomics casts doubt on the single, early evolution of the reptile venom system. *Toxicon* 92:140–156.
- Hessinger, D.A. & Lenhoff, H.M. 1988. *The Biology of Nematocysts*. Academic Press, Inc.
- Huang, C.; Morlighem, J. -É.R.; Zhou, H.; Lima, É.P.; Gomes, P.B.; Cai, J.; Lou, I.; Pérez, C.D.; Lee, S.M. & Rádis-Baptista, G. 2016. The transcriptome of the zoanthid *Protopal ythoa variabilis* (Cnidaria, Anthozoa) predicts a basal repertoire of toxin-like and venom-auxiliary polypeptides. *Genome Biology and Evolution* 8: 3045–3064.
- Jaimes-Becerra, A.; Chung, R.; Morandini, A.C.; Weston, A.J.; Padilla, G.; Gacesa, R.; Ward, M.; Long, P.F. & Marques, A.C. 2017. Comparative proteomics reveals recruitment patterns of some protein families in the venoms of Cnidaria. *Toxicon* 137: 19–26.

- Jaimés-Becerra, A.; Gacesa, R.; Doonan, L.B.; Hartigan, A.; Marques, A.C.; Okamura, B. & Long, P.F. 2019. "Beyond primary sequence"—Proteomic data reveal complex toxins in cnidarian venoms. *Integrative and Comparative Biology* 59:777–785.
- Jenner, R. & Undheim, E. 2017. *Venom: the secrets of nature's deadliest weapon*. Natural History Museum, London.
- Jouiaei, M.; Yanagihara, A.; Madio, B.; Nevalainen, T.; Alewood, P. & Fry, B. 2015a. Ancient venom systems: A review on Cnidaria toxins. *Toxins* 7: 2251–2271.
- Jouiaei, M.; Sunagar, K.; Gross, A.F.; Scheib, H.; Alewood, P.F.; Moran, Y. & Fry, B.G. 2015b. Evolution of an ancient venom: recognition of a novel family of cnidarian toxins and the common evolutionary origin of sodium and potassium neurotoxins in sea anemone. *Molecular Biology and Evolution* 32: 1598–1610.
- Kayal, E.; Bentlage, B.; Pankey, M.S.; Ohdera, A.; Medina, M.; Plachetzki, D.C.; Collins, A. & Ryan, J. 2018. Phylogenomics provides a robust topology of the major cnidarian lineages and insights on the origins of key organismal traits. *BMC evolutionary biology* 18:68.
- Kayal, E.; Roure, B.; Philippe, H.; Collins, A. & Lavrov, D.V. 2013. Cnidarian phylogenetic relationships as revealed by mitogenomics. *BMC evolutionary biology* 13:5.
- Klompem, A.M.L.; Kayal, E. Collins, A. & Cartwright, P. 2021. Phylogenetic and selection analysis of an expanded family of putatively pore-forming jellyfish toxins (Cnidaria: Medusozoa). *Genome Biology and Evolution*-Accepted manuscript.
- Klompem, A.M.L.; Macrander, J. Reitzel, A.M. & Stampar, S.N. 2020. Transcriptomic Analysis of Four Cerianthid (Cnidaria, Ceriantharia) Venoms. *Marine drugs* 18: 413.
- Lewis Ames, C.; Ryan, J.F.; Bely, A.E.; Cartwright, P. & Collins, A.G. 2016. A New Transcriptome and Transcriptome Profiling of Adult and Larval Tissue in the Box Jellyfish *Alatina alata*: An Emerging Model for Studying Venom, Vision and Sex. *BMC Genomics* 17:650.
- Li, R.; Yu, H.; Xue, W.; Yue, Y.; Liu, S.; Xing, R. & Li, P. 2014. Jellyfish venomomics and venom gland transcriptomics analysis of *Stomolophus meleagris* to reveal the toxins associated with sting. *Journal of Proteomics* 106: 17–29.
- Li, R.; Yu, H.; Yue, Y.; Liu, S.; Xing, R.; Chen, X. & Li, P. 2016. Combined proteomics and transcriptomics identifies sting-related toxins of jellyfish *Cyanea nozakii*. *Journal of Proteomics* 148: 57–64.

- Liao, Q.; Li, S.; Siu, S.W.I.; Yang, B.; Huang, C.; Chan, J.Y.-W.; Morlighem, J.-É.R.L.; Wong, C.T.T.; Rádis-Baptista, G. & Lee, S.M.-Y. 2018. Novel kunitz-like peptides discovered in the zoanthid *Palythoa caribaeorum* through transcriptome sequencing. *Journal of Proteome Research* 17: 891–902.
- Macrander, J. & Daly, M. 2016. Evolution of the Cytolytic Pore-forming Proteins (Actinoporins) in Sea Anemones (Actiniaria). *Toxins* 8: 368.
- Macrander, J.; Broe, M. & Daly, M. 201. Tissue-specific venom composition and differential gene expression in sea anemones. *Genome Biology Evolution* 8: 2358–2375.
- Macrander, J.; Brugler, M.R. & Daly, M. 2015. A RNA-seq approach to identify putative toxins from acrorhagi in aggressive and non-aggressive *Anthopleura elegantissima* polyps. *BMC Genomics* 16: 1–19.
- Madio, B.; Undheim, E.A.B. & King, G.F. 2017. Revisiting Venom of the Sea Anemone *Stichodactyla haddoni*: Omics Techniques Reveal the Complete Toxin Arsenal of a Well-Studied Sea Anemone Genus. *Journal of Proteomics* 166: 83–92.
- Mariottini, G.L. & Pane, L. 2013. Cytotoxic and cytolytic cnidarian venoms. A review on health implications and possible therapeutic applications. *Toxins* 6: 108–151.
- Mariottini, G.L. 2014. Haemolytic venoms from marine cnidarian jellyfish – an overview. *Journal of Venom Research* 5: 22–32.
- Mariottini, G.L.; Bonello, G.; Giacco, E. & Pane, L. 2015. Neurotoxic and neuroactive compounds from Cnidaria: Five decades of research.... and more. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* 15: 74–80.
- Marques, A.C. & Collins, A.G. 2004. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebrate Biology* 123: 23–42.
- Mitchell, M.L.; Tonkin-Hill, G.Q.; Morales, R.A.V.; Purcell, A.W.; Papenfuss, A.T. & Norton, R.S. 2020. Tentacle transcriptomes of the speckled anemone (Actiniaria: Actiniidae: Oulactis Sp.): Venom-related components and their domain structure. *Marine Biotechnology* 22: 207–219.
- Nisaa, S.A.; Vinua, D.; Krupakarb, P.; Govindaraju, K.; Sharmac, D. & Vivekd, R. 2021. Jellyfish venom proteins and their pharmacological potentials: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 176: 424–436.
- O’Hara, E.P.; Wilson, D. & Seymour, J.E. 2021. The influence of ecological factors on cnidarian venoms. *Toxicon* X.
- Okamura, B.; Gruhl, A. & Reft A.J. 2015. Cnidarian origins of Myxozoa, pp. 45-68. In: *Myxozoan Evolution, Ecology and Development* (B Okamura, A Gruhl, JL Bartholomew, eds). Springer, Cham, Switzerland.

- Östman, C. 2000. A guideline to nematocyst nomenclature and classification, and some notes on the systematic value of nematocysts. *Scientia Marina* 64: 31–46.
- Özbek, S.; Balasubramanian, P.G. & Holstein, T.W. 2009. Cnidocyst structure and the biomechanics of discharge. *Toxicon* 54: 1038–1045.
- Ponce, D.; Brinkman, D.; Potriquet, J. & Mulvenna, J. 2016. Tentacle transcriptome and venom proteome of the pacific sea nettle, *Chrysaora fuscescens* (Cnidaria: Scyphozoa). *Toxins* 8: 102.
- Rachamim, T.; Morgenstern, D.; Aharonovich, D.; Brekhman, V.; Lotan, T. & Sher, D. 2014. The dynamically evolving nematocyst content of an anthozoan, a scyphozoan, and a hydrozoan. *Molecular Biology and Evolution* 32: 740–753.
- Ramírez-Carreto, S.; Vera-Estrella, R.; Portillo-Bobadilla, T.; Licea-Navarro, A.; Bernaldez-Sarabia, J.; Rudiño-Piñera, E.; Verleyen, J.J.; Rodríguez, E. & Rodríguez-Almazán, C. 2019. Transcriptomic and proteomic analysis of the tentacles and mucus of *Anthopleura Dowii* Verrill, 1869. *Marine Drugs* 17: 436.
- Rivera-de-Torre, E.; Martínez-del-Pozo, Á. & Garb, J.E. 2018. *Stichodactyla Helianthus*' de novo transcriptome assembly: Discovery of a new actinoporin isoform. *Toxicon* 150: 105–114.
- Sachkova, M.Y.; Singer, S.A.; Macrander, J.; Reitzel, A.M.; Peigneur, S.; Tytgat, J. & Moran, Y. 2019. The birth and death of toxins with distinct functions: A case study in the sea anemone *Nematostella*. *Molecular Biology and Evolution* 36: 2001–2012.
- Schendel, V.; Rash, L.; Jenner, R. & Undheim, E. 2019. The Diversity of Venom: The Importance of Behavior and Venom System Morphology in Understanding Its Ecology and Evolution. *Toxins* 11:666.
- Shinzato, C.; Shoguchi, E.; Kawashima, T.; Hamada, M.; Hisata, K.; Tanaka, M.; Manabu, F.; Fujiwara, M.; Koyanagi, R.; Ikuta, T.; Fujiyama, A.; Miller, D. & Satoh, N. 2011. Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change. *Nature* 476:320-3.
- Smith, J.J.; Herzig, V.; King, G.F. & Alewood, P.F. 2013. The insecticidal potential of venom peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70: 3665–3693.
- Starcevic, A. & Long, P.F. 2013. Diversification of animal venom peptides—were jellyfish amongst the first combinatorial chemists?. *ChemBioChem* 14: 1407–1409.
- Sunagar, K & Moran, Y. 2015. The Rise and fall of an Evolutionary Innovation: Contrasting Strategies of Venom Evolution in Ancient and Young Animals. *PLoS Genetics* 11(10): e1005596.

- Sunagar, K.; Johnson, W.E.; O'Brien, S.J.; Vasconcelos, V. & Antunes, A. 2012. Evolution of CRISPs associated with toxicoforan-reptilian venom and mammalian reproduction. *Molecular Biology and Evolution* 29:1807–1822.
- Sunagar, K.; Morgenstern, D.; Reitzel, A.M. & Moran, Y. 2015. Ecological venomics: How genomics, transcriptomics and proteomics can shed new light on the ecology and evolution of venom. *Journal of Proteomics* 131:62-72.
- Šuput, D. 2009. In vivo effects of cnidarian toxins and venoms. *Toxicon* 54: 1190–1200.
- Surm, J.M.; Smith, H.L.; Madio, B.; Undheim, E.A.B.; King, G.F.; Hamilton, B.R.; Burg, C.A.; Pavasovic, A. & Prentis, P.J. 2019. A process of convergent amplification and tissue-specific expression dominates the evolution of toxin and toxin-like genes in sea anemones. *Molecular Ecology* 28: 2272–2289.
- Surm, J.M.; Stewart, Z.K.; Papanicolaou, A.; Pavasovic, A. & Prentis, P.J. 2019. The draft genome of *Actinia tenebrosa* reveals insights into toxin evolution. *Ecology and Evolution* 9: 11314–11328.
- Underwood, A.H. & Seymour, J.E. 2007. Venom ontogeny, diet and morphology in *Carukia barnesi*, a species of Australian box jellyfish that causes Irukandji syndrome. *Toxicon* 49: 1073–1082.
- Van Iten, H.; Marques, A.C.; Leme, J.D.M.; Pacheco, M.L.F. & Simões, M.G. 2014. Origin and early diversification of the phylum Cnidaria Verrill: Major developments in the analysis of the taxon's Proterozoic-Cambrian history. *Palaeontology* 57: 677–690.
- Wang, C.; Wang, B.; Wang, B.; Wang, Q.; Liu, G.; Wang, T.; He, Q. & Zhang, L. 2018. Unique Diversity of Sting-Related Toxins Based on Transcriptomic and Proteomic Analysis of the Jellyfish *Cyanea Capillata* and *Nemopilema Nomurai* (Cnidaria: Scyphozoa). *Journal of Proteome Research* 18: 436–448.
- Weston, A.J.; Chung, R.; Dunlap, W.C.; Morandini, A.C.; Marques, A.C.; Moura-da-Silva, A.M.; Ward, M.; Padilla, G.; da Silva, L.F.; Andreakis, N. & Long, P.F. 2013. Proteomic characterisation of toxins isolated from nematocysts of the South Atlantic jellyfish *Olindias sambaquiensis*. *Toxicon* 71: 11–17.
- Wong, E.S.W. & Belov, K. 2012. Venom evolution through gene duplications. *Gene* 496:1–7.
- Zancolli, G. & Casewell, N.R. 2020. Venom Systems as Models for Studying the Origin and Regulation of Evolutionary Novelty. *Molecular Biology and Evolution* 10: 2777–2790.
- Zapata, F.; Goetz, F.E.; Smith, A.S.; Howison, M.; Siebert, S.; Church, S.; Sanders, S.M.; Ames, C.L.; McFadden, C.S.; France, S.C.; Daly, M.; Collins, A.G.; Haddock, S.H.D.; Dunn, C. & Cartwright, P. 2015. Phylogenomic analyses support traditional relationships within Cnidaria. *PLoS ONE* 10:e139068.