



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización proteómica del veneno y transcriptómica de la glándula venenosa de machos y hembras del alacrán *Centruroides limpidus*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
QBP. JIMENA ISAIAS CID URIBE

TUTOR PRINCIPAL
DR. LOURIVAL DOMINGOS POSSANI POSTAY
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Juan Enrique Morett Sanchez
Instituto de Biotecnología

Dra. Rosario Vera Estrella
Instituto de Biotecnología

Cuernavaca. Septiembre, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Lourival D. Possani, del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología-Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Morelos.

El trabajo fue parcialmente financiado por donativos de la Dirección General de los Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, proyectos IN 200113 y IN203416, y Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología SEP-CONACyT-237864, concedidos al laboratorio del Dr. Possani.

La pasante fue beneficiaria de la beca de formación de posgrado de excelencia del CONACYT, inscrita bajo el número 512560.

Al financiamiento otorgado por Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado para asistir al XXX Congreso Nacional de Bioquímica, celebrado del 2-8 de noviembre del 2014 en Guadalajara, Jalisco.

Agradecimientos:

Dr. Possani, gracias por aceptarme en su grupo de trabajo, por enseñarme y corregirme, por tenerme toda la paciencia del mundo durante 3 años, por enseñarme todo lo necesario para poder desenvolverme en otros lugares, por el apoyo que siempre me brinda, por las llamadas de atención y espero algún día enorgullecerlo con mi desarrollo como investigadora.

Dra. Georgina Gurrola Briones por apoyarme y guiarme para realizar esta tesis.

Dra. Veronica Quintero Hernández por apoyarme y guiarme para realizar esta tesis.

A mis colegas:

Que hubiera sido de mi sin el apoyo de todos los miembros del laboratorio, con quien hubiera peleado estos 3 años formando parte de este maravilloso grupo que me enseñó tantas cosas.

A mi familia:

Gracias a mis padres por apoyarme en todas mis decisiones, por procurar mi salud y bienestar. A mi hermano por acompañarme en mis locuras.

A mis amigos:

Erika, David, Tere, Rosby, Miriam, Nacho, Guille, Mary, Rodrigo y Ernesto que siempre estuvieron a mi lado cuando más los necesitaba.

A Juan:

Mi compañero incondicional, gracias por estar a mi lado estos años, y por compartir una vida juntos.

Índice

Abreviaturas.....	6
Índice de Figuras.....	9
Índice de tablas	11
Resumen	12
1.-INTRODUCCION.....	14
1.1.-Anatomía general	14
1.1.2.-Anatomía de los machos.....	16
1.1.3.-Anatomía de las hembras	16
1.2.-Distribución	17
2.-ANTECEDENTES	18
2.1 Veneno	18
2.1.1 Componentes peptídicos del veneno	19
2.1.1.2 Toxinas que afectan canales iónicos.....	19
2.1.1.2.1 NaScTx.....	19
2.1.1.2.2 KScTx.....	21
2.1.1.2.3 CaScTx.....	23
2.1.2 Péptidos sin puentes disulfuro (NDBP)	23
2.2 Transcriptómica:.....	23
2.3.-Diferencias intersexuales del veneno de alacrán.....	25
3.-JUSTIFICACIÓN.....	26
4.- HIPÓTESIS	27
5.-OBJETIVO GENERAL.....	28
5.1.-Objetivos específicos	28
6.-MÉTODO	29
6.1.-Material biológico.....	29
6.2.- Estimación de la concentración del veneno.....	29
6.3.- Cromatografía de exclusión molecular	29
6.4.- HPLC fase reversa.....	30
6.5.-Caracterización proteica por electroforesis bidimensional.....	30
6.5.1.-Cuantificación proteica de veneno	30
6.5.2.-Electroforesis bidimensional y análisis de imágenes	30

6.5.3. Identificación de proteínas por LC-MS.....	31
6.6.-Obtención del banco de ADNc.....	31
6.6.1.-Obtención de ARN.....	32
6.6.2. Obtención de ADNc.....	32
7.-RESULTADOS:.....	33
7.1 Análisis proteómico.....	33
7.1.1 Separación del veneno total por HPLC en fase reversa.....	33
7.1.2 Análisis proteómico de los componentes obtenidos.....	34
7.1.3 Cromatografía de exclusión molecular de veneno total.....	38
7.1.4 Electroforesis bidimensional de la Fracción I.....	40
7.1.5 RP- HPLC de la fracción II.....	42
7.1.6 RP- HPLC de la fracción III.....	46
7.2. Análisis transcriptómico.....	48
8.- Discusión.....	59
9.- Conclusiones.....	70
9.1Perspectivas.....	70
10.-Bibliografía.....	70
Anexo 1.....	77
Anexo 2.....	80

Abreviaturas

°C	Centígrados
µl	Microlitros
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
Blastp	Alineamiento local de proteínas
Bp	Pares de base (base pair)
CAP	Proteínas ricas en cisteínas, Antígeno 5, proteínas relacionadas a Patogénesis (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 proteins)
CaScTx	Toxinas de escorpión que afectan canales de Calcio (Calcium Scorpion Toxin)
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil) dimetilamonio]-1-propano sulfonato
CID	Disociación inducida por colisión (Collision Induced Dissociation)
CIIERGtx	Toxinas Erg de <i>C. limpidus</i>
cm	Centímetro
CRISP	Proteínas secretoras ricas en cisteínas (Cysteine-rich secretory proteins)
Da	Dalton
DTT	Ditrioteitol
Genbank	Banco de genes (Gene bank)
HCD	Disociación por colisión de alta energía (High energy Collision Dissociation)
hERG	<i>El gen humano relacionado con el gen Etér a go go (Human Ether a go go Related Gene)</i>
HPLC	Cromatografía líquida de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography)
IBT-UNAM	Instituto de Biotecnología-Universidad Nacional Autónoma de México
IPPA	Intoxicación por picadura de alacrán

KScTx	Toxinas de escorpión que afectan canales de Potasio (Potassium Scorpion Toxin).
LC-MS	Cromatografía líquida – Espectrometría de masas (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry).
Mg	Miligramo
Min	Minutos
ml/min	Mililitros por minuto
ml/tubo	Mililitro por tubo
mM	Milimolar
Mm	Milímetros
NaScTx	Toxinas de escorpión que afectan canales de Sodio (Sodium Scorpion Toxin)
NDBP	Péptidos sin puentes disulfuro (Non disulfide bridged peptide)
Nm	Nanómetros
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
pH	Potencial de hidrógeno
RjAa8	<i>Rophalurus junceus</i> Aa8
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta presión-Fase reversa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (sodium dodecyl sulfato- polyacrylamid gel electrophoresis)
SUIVE	Sistema Único de Investigación para la Vigilancia Epidemiológica
Swiss-prot	Base de datos suiza de secuencias de proteínas (Swiss-protein)
TFA	Ácido trifluoroacético
TR	Tiempo de retención
Tris	Hidroximetil aminometano
TsAP	Péptido antimicrobiano de <i>Tityus serrulatus</i> (<i>Tityus serrulatus</i> antimicrobial peptides)
Uniprot	Base de datos universal de secuencias de proteínas (Universal Protein Resource)

V Voltaje
V/h Voltaje/hora
VMPA Metaloproteinasa de veneno (Venom metalloproteinase antarease)

Índice de Figuras

Figura 1. Anatomía general de un alacrán.....	15
Figura 2. Fotografía de alacranes <i>C. limpidus</i>	16
Figura 3. Fotografía en posición decúbito dorsal de alacranes de <i>C. limpidus</i>	17
Figura 4. Distribución conocida de <i>C. limpidus</i>	18
Figura 5. Secuencias de aminoácidos de las toxinas para canales de sodio del alacrán <i>C. limpidus</i>	20
Figura 6. Secuencias de aminoácidos de los precursores de toxinas para canales de sodio del alacrán <i>C. limpidus</i>	21
Figura 7. Secuencias de aminoácidos de las toxinas para canales de potasio del alacrán <i>C. limpidus</i>	22
Figura 8. Secuencias de aminoácidos de las toxinas para canales de potasio del alacrán <i>C. limpidus</i>	22
Figura 9. Perfiles cromatográficos de fase reversa del veneno de hembras (rojo) y machos (negro). La cantidad de muestra aplicada fue de 2.41 mg para las hembras y 2.08 mg para los machos.	33
Figura 10. Cromatograma de exclusión molecular del veneno de hembras <i>C. limpidus</i>	39
Figura 11. Cromatograma de exclusión molecular del veneno de machos <i>C. limpidus</i> . Se aplicaron 4.8 mg de veneno en 200 µl de una columna (60 x 0.9 cm) de Sephadex G-50, usando un flujo isocrático de 0.5 ml/min en presencia de 20 mM de amortiguador de acetato de amonio pH 4.7.	39
Figura 12. Electroforesis bidimensional (acrilamida al 12%), de la fracción I de veneno de machos y hembras.	40
Figura 13. Perfiles cromatográficos de fase reversa de la fracción II del veneno de hembras (rojo) y machos (azul). Se usó un gradiente de 0 a 60 % acetonitrilo con 0.1% de ácido trifluoroacético en 90 min	43
Figura 14. Perfiles cromatográficos de fase reversa de la fracción III del veneno de hembras (rojo) y machos (azul).	46
Figura 15. Proporción relativa de los pesos moleculares de los componentes encontrados en el veneno de hembras y machos de <i>C. limpidus</i>	47
Figura 16. Alineamiento de las secuencias encontradas en la biblioteca de la glándula venenosa de machos de <i>C. limpidus</i> ,	49
Figura 17. Alineamiento de las secuencias encontradas en la biblioteca de la glándula venenosa de hembras de <i>C. limpidus</i>	50
Figura 18. Alineamiento de las secuencias encontradas en la biblioteca de la glándula venenosa de machos de <i>C. limpidus</i>	51
Figura 19. Alineamiento de las secuencias encontradas en la biblioteca de la glándula venenosa de hembras de <i>C. limpidus</i> , con identidad de toxinas de sodio o sus precursores.	52

Figura 20 Alineamiento de las secuencias correspondientes a toxinas de potasio encontradas en la biblioteca de la glándula venenosa de hembras de <i>C. limpidus</i>	53
Figura 21. Alineamiento de las secuencias correspondientes a toxinas de potasio encontradas en la biblioteca de la glándula venenosa de machos de <i>C. limpidus</i>	53
Figura 22. Alineamiento de las secuencias correspondientes a péptidos antimicrobianos encontradas en la biblioteca de la glándula venenosa de hembras de <i>C. limpidus</i>	54
Figura 23. Alineamiento de las secuencias correspondientes a péptidos antimicrobianos que se encontraron en la biblioteca de la glándula venenosa de machos de <i>C. limpidus</i>	55
Figura 24. Proporción relativa de las secuencias obtenidas de las bibliotecas de ADNc de las glándulas venenosas del alacrán <i>C. limpidus</i>	58
Figura S1. Cromatograma de fase reversa del veneno de <i>C. limpidus</i> hembras.....	77
Figura S2. Cromatograma de fase reversa del veneno de <i>C. limpidus</i> machos	77
Figura S3. Cromatograma de fase reversa de la fracción II de <i>C. limpidus</i> machos.....	78
Figura S4. Cromatograma de fase reversa de la fracción II de <i>C. limpidus</i> hembras.....	78
Figura S5. Cromatograma de fase reversa de la Fracción III de <i>C. limpidus</i> hembras	79
Figura S6. Cromatograma de fase reversa de la fracción III de <i>C. limpidus</i> machos.....	79

Índice de tablas

Tabla 1.- Alacranes con transcriptómica realizada.	24
Tabla 2. Pesos moleculares de los componentes obtenidos, de hembras y machos de <i>C. limpidus</i>	35
Tabla 3. Secuencias de amino terminal de los péptidos del veneno de hembras de <i>C. limpidus</i>	37
Tabla 4. Secuencias de amino terminal de los péptidos del veneno de machos de <i>C. limpidus</i>	38
Tabla 5 Identificación de proteínas por secuenciación LC/MS del veneno de machos y hembras del alacrán <i>C. limpidus</i>	41
Tabla 6. Pesos moleculares de los componentes obtenidos de la fracción II del veneno de hembras y machos de <i>C. limpidus</i>	44
Tabla 7. Pesos moleculares de los componentes obtenidos de la fracción III del veneno de hembras y machos de <i>C. limpidus</i>	47
Tabla 8. Secuencias peptídicas obtenidas a partir de las librerías realizadas a partir del ARN de la glándula venenosa de machos y hembras del alacrán <i>C. limpidus</i>	56
Tabla 9. Secuencias de NaScTx de <i>C. limpidus</i>	63
Tabla 10. Secuencias de KScTx de <i>C. limpidus</i>	68

Resumen

Los escorpiones son organismos que presentan pocos cambios morfológicos desde su aparición en el período silúrico; han dominado casi todos los climas, con excepción de los polos. Se han descrito 20 familias de alacranes (escorpiones), de las cuales solo la familia Buthidae se considera de importancia médica. En México existe un conjunto de alacranes del género *Centruroides* perteneciente a esta familia. Una de las especies de mayor relevancia médica es *Centruroides limpidus* debido al elevado número de intoxicaciones que causa, denominados intoxicaciones por la picadura de alacrán (IPPA).

El objetivo principal de esta tesis fue determinar el tipo de componentes del veneno de manera comparativa entre machos y hembras, por separado. Debido a que presentan diferencias morfológicas y etológicas al igual que otros arácnidos en donde se ha demostrado que existen diferencias en la composición de sus venenos. Los alacranes utilizados se colectaron en el estado de Morelos, en el Municipio de Miacatlán, y en los alrededores de Iguala en el estado de Guerrero. El veneno se obtuvo por estimulación eléctrica y la fracción soluble del mismo, se analizó por técnicas de separación cromatográfica en columnas y electroforesis en geles que permiten hacer una separación en dos dimensiones (geles “bidimensionales”). Adicionalmente, se determinó la masa molecular de los componentes tóxicos por espectroscopia de masas e identificación de genes clonados a partir de una biblioteca de genes obtenidos de las glándulas venenosas.

Se identificaron 92 componentes en el veneno de los machos y 81 en el caso de las hembras. Cabe resaltar que más del 45% de los componentes son diferentes entre hembras y machos. Una posible explicación en términos de la diversidad de componentes detectada, pudiera estar relacionada la abundancia de los componentes, ya que las hembras realizan un gasto energético importante para procrear y darle cuidado a la progenie. Se ha demostrado que las hembras gestantes o con sus crías en desarrollo, modifican sus hábitos de cacería para garantizar la ingesta de alimento y así tener suficiente energía para terminar el

proceso de crianza. Es posible que observemos una diferencia en los venenos de machos y hembras que puede estar relacionada con una minimización de los requerimientos energéticos para la producción de veneno.

Finalmente, se realizó una caracterización e identificación de genes que codifican para péptidos y proteínas propias del veneno, a partir de una biblioteca de ADN complementario (cADN), elaborada a partir de ARN total obtenido de las glándulas venenosas.

1.-INTRODUCCION

Los escorpiones o alacranes son una de las formas de vida que más ha prevalecido en el planeta; se han encontrado fósiles que datan del periodo Silúrico (más de 350 millones de años). Se cree que tienen un origen acuático (Briggs, 1987). Taxonómicamente se clasifican dentro del Phylum: *Arthropoda*, es decir que poseen un exoesqueleto dotado de miembros articulados con movimiento independiente; al Subphylum: *Chelicerata* esto se debe a que presentan apéndices especializados que se ubican enfrente de la boca y cuya función es detener y triturar los alimentos; Clase: *Arachnida* debido a que poseen 4 pares de patas; Orden: *Scorpionidae*, (Botero, 2010). Taxonómicamente se dividieron en 20 familias y se han descrito alrededor de 208 géneros que se encuentran distribuidos por todo el planeta, excepto en las regiones polares. Solo la familia Buthidae se considera de importancia médica. En México se ha reportado recientemente la existencia de 281 especies distintas de alacranes (Santibáñez-López, 2016)

1.1.-Anatomía general

Estos arácnidos presentan un exoesqueleto de quitina, que se divide en dos tagmas: el prosoma y el opistosoma. El primero se compone de siete segmentos cubiertos por una coraza, en donde se encuentran ubicados los quelíceros, los pedipalpos, las patas y por encima de la coraza los ojos medios y los laterales. El opistosoma se compone de un mesosoma que corresponde propiamente al abdomen que contiene peines, el esternón, el opérculo genital; y un metasoma que corresponde a los segmentos de la cola, el último segmento es el telson que contiene en su interior la glándula venenosa y el aguijón (Fig.1).

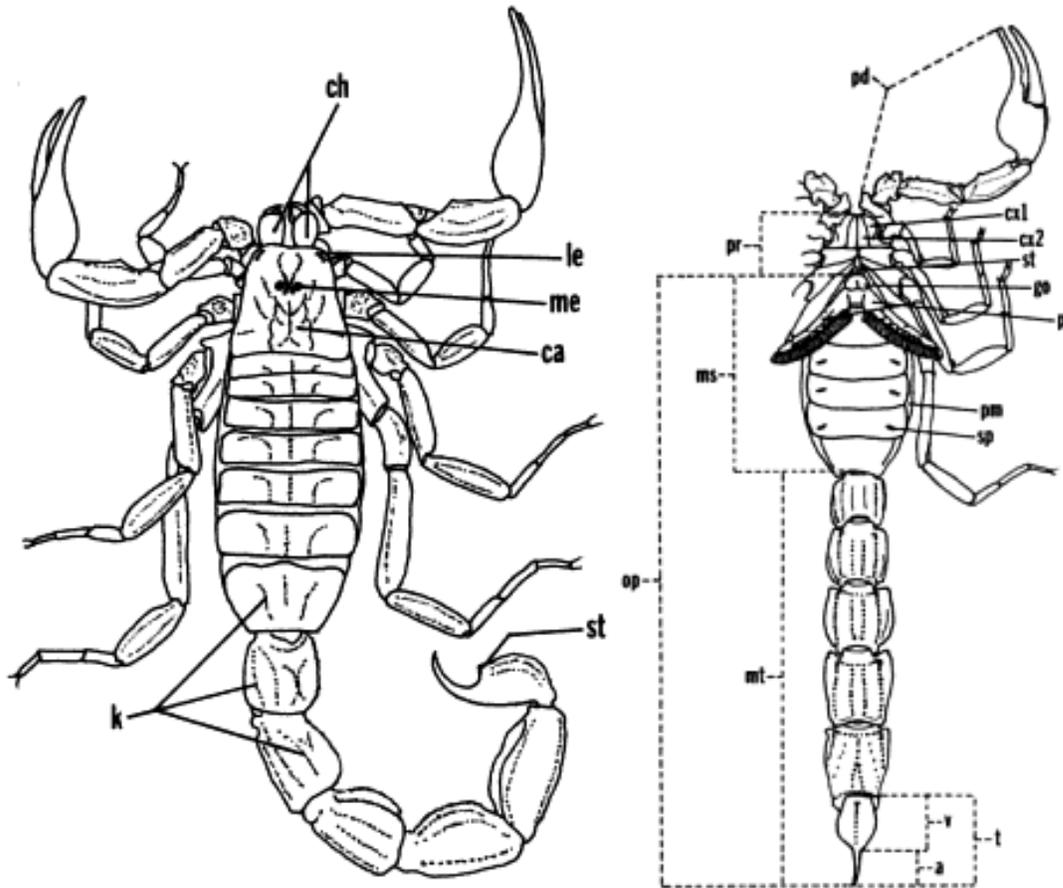


Figura 1. Anatomía general de un alacrán. A la izquierda vista dorsal (Ch, quelícero; le ojos laterales; me, ojos medios; ca, coraza; k, quillas. A la derecha Vista ventral: pd, Pedipalpos; op, opistosoma; pr, prosoma; ms, mesosoma; mt metasoma; cx1, coxapofisis 1; cx2, coxapofisis 2; go, opérculo genital; pm, membrana pleural; pt, peines; sp, espiráculo; st, esternón; t, telson; v, vesícula; a, aguijón. (Polis, 1990)

En cuanto al alacrán *C. limpidus* es de un color claro amarillento, pertenece a los alacranes rayados, debido a que presentan dos líneas de color oscuro a lo largo del mesosoma, presentan un aguijón muy curvado, y pinzas muy delgadas, por lo que su alimentación la hacen con ayuda de la inyección de veneno en lugar de desmembrarlos con las pinzas.

1.1.2.-Anatomía de los machos

Existen diferencias morfológicas útiles para distinguir a simple vista los machos de *C. limpidus*. El mesosoma es más angosto mide aproximadamente 0.5 cm de ancho, lo que concierne al metasoma presenta segmentos más largos (Fig. 2). Para diferenciarlos también es útil la posición de los peines y la separación del opérculo genital. En el esquema se observa que los machos presentan cerdas más delgadas y largas. La separación del opérculo genital es pequeño (Fig. 3).

Etológicamente tiene un comportamiento más solitario puesto que en ningún momento depende su progenie de él.

1.1.3.-Anatomía de las hembras

Las hembras presentan un mesosoma de aproximadamente 1 cm de ancho y segmentos más cortos en el metasoma (Fig. 2), esta característica permite que las crías se mantengan en la superficie del metasoma. Como ya se mencionó anteriormente, las características de los peines y el opérculo genital son de gran utilidad para clasificarlos: en las hembras se observan cerdas más robustas y cortas, así como la separación entre los peines es mayor que en los machos, y el opérculo genital tiene bordes más curvos que en el macho. (Fig. 3).



Figura 2. Fotografía de alacranes *C. limpidus*. A) Hembra con mesosoma ancho y los segmentos del metasoma cortos. B) Machos con mesosoma angosto y los segmentos del metasoma largos. H, hembra, M, macho.

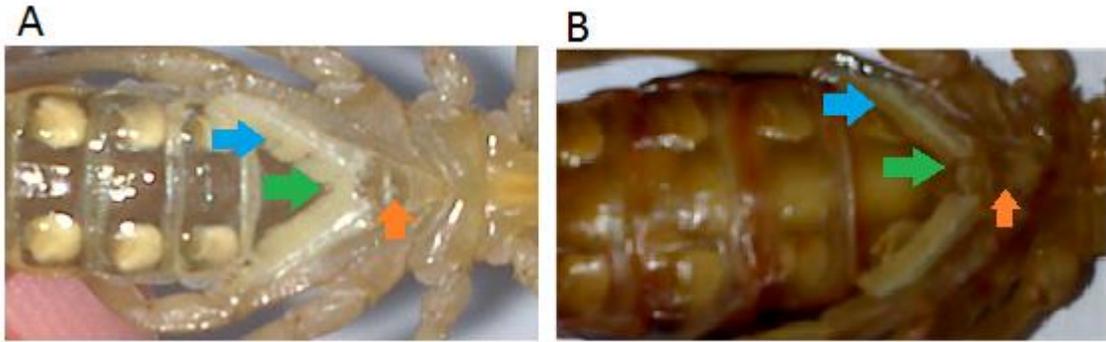


Figura 3. Fotografía en posición decúbito dorsal de alacranes de *C. limpidus*. A) Macho. Se observan los peines con cerdas largas delgadas (flecha azul), con poca separación entre ellos (flecha verde) y el opérculo genital en forma piramidal (flecha naranja). B) Hembra. Se observan los peines con cerdas pequeñas (flecha azul) y robustas, así como la separación de los peines es más pronunciada (flecha verde), el opérculo genital se observa más redondeado (flecha naranja).

1.2.-Distribución

En México se encuentran alacranes del género *Centruroides*, estos pertenecen a la familia Buthidae y son considerados de importancia médica. Entre ellos, el de mayor importancia médica es *C. limpidus* debido a la alta incidencia de picaduras en humanos. *C. limpidus* está distribuido en los estados de Guerrero, Morelos, Estado de México, Michoacán y en algunas zonas de Querétaro (Fig.4). En el 2013 la incidencia de IPPA en los estados de Morelos, Guerrero y Michoacán fue de 1801, 1762 y 784 casos por cada 100,000 habitantes respectivamente (SUIVE, 2013). Anteriormente la picadura de este alacrán causaba una gran mortalidad en niños y en personas muy sensibles. Esto ha disminuido por el uso de faboterápicos, que contrarrestan los efectos del envenenamiento.

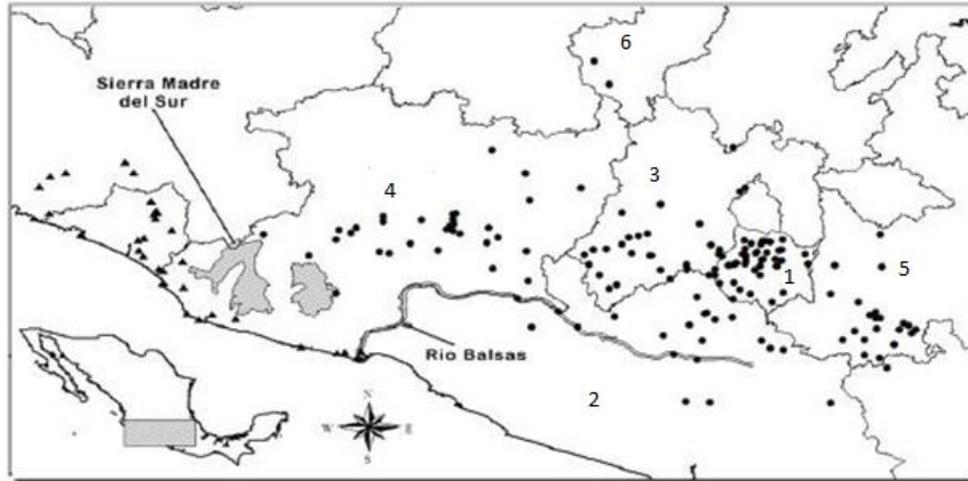


Figura 4. Distribución conocida de *C. limpidus*. (Ponce-Saavedra, 2009). Se muestra con puntos negros la presencia del alacrán, en los estados de Morelos (1), Guerrero (2), México (3), Michoacán (4), Puebla (5) y recientemente se han descrito en Querétaro (6).

2.-ANTECEDENTES

En México desde hace ya más de 30 años se ha trabajado en el estudio de los venenos de los alacranes. Debido a su importancia médica, el veneno del alacrán *C. limpidus*, fue el primero en el que se caracterizaron los componentes tóxicos; enfocándose principalmente en aquellos componentes que tienen efecto sobre canales iónicos, y en especial los canales de sodio y de potasio (Possani, 1999).

2.1 Veneno

Los venenos de alacrán son mezclas de: enzimas, mucoproteínas, lípidos, aminoácidos libres, nucleótidos, aminas, compuestos heterocíclicos, sales inorgánicas y péptidos (Ortiz, 2014).

2.1.1 Componentes peptídicos del veneno

Estos componentes los agruparemos en péptidos con puentes disulfuro y sin puentes disulfuro. En los primeros encontramos a las toxinas que afectan canales iónicos, y en los segundos destacan los péptidos antimicrobianos.

Habitualmente la caracterización de los componentes peptídicos del veneno se realiza a partir de mezclas de venenos de machos y hembras.

2.1.1.2 Toxinas que afectan canales iónicos

2.1.1.2.1 NaScTx

Las toxinas que afectan los canales de sodio (NaScTx) se caracterizan por ser péptidos largos de 61 a 76 aminoácidos y que estructuralmente presentan dos α -hélices cortas y tres laminas β -antiparalelas. Esta conformación se estabiliza por un dominio conservado de 8 cisteínas, que conforman 4 puentes disulfuro. Dos de ellos unen los motivos α y β , y los dos restantes estabilizan el sitio activo de la toxina (Possani, 1999; Rodríguez de la Vega, 2005). Estas toxinas reconocen sitios en los canales de sodio, tanto de los mamíferos como de los insectos. Se han clasificado en dos grupos de acuerdo al sitio que reconocen del canal. El primero de estos grupos al que se le conoce como α -NaScTx lo conforman las toxinas que se unen de manera voltaje dependiente al sitio 3 del canal y modifican la inactivación del canal es decir, prolongan el potencial de acción, llevando más tiempo para cerrar el canal. El segundo grupo son las β -NaScTx y se unen al sitio 4 del canal de manera independiente del potencial de membrana y afectan la activación del canal. Los canales se abren en potenciales más negativos, usualmente disminuyendo el pico máximo de permeabilidad a sodio (Jover, 1980; Wheeler, 1983).

Las toxinas que se encuentran reportadas del alacrán *C. limpidus*, (Fig.5) son 3: CII1 que afecta canales iónicos de crustáceos (Lebreton, 1994, Alagon, 1988), CII1m (Ramírez, 1994) y CII2 (Dehesa-Dávila, 1996). Las tres se describieron como beta toxinas que se unen al sitio 4 de los canales de sodio voltaje independientes, comprenden 66 aminoácidos y presentan 8 cisteínas en la posición (12,16, 25, 29, 41, 46, 48 y 65), que dan lugar a los 4 puentes disulfuro antes mencionados.

En 2002 Corona obtuvo diversos precursores de toxinas de sodio, a partir de los mensajeros como CII2b, CII3, CII4 CII5b, CII5c, CII6, CII7, CII8, CII9 (Fig. 6), estos datos fueron solo fueron sometidos a Genbank, no fueron publicados.

```

C111      KEGYLVNKSTGCKYGC□FWLKGKNENC□DKECKAKNQGGSYGY□CYSFACWCEGLPESTPTYPL
C112      KEGYLVNHSTGCKYEC□FKLGDNDYCLRECKQY□GKGAGGYCYAFGCWCNHLYEQAVVWPL
C111m     KEGYIVNLSTGCKYEC□YKLGNDNDYCLRECKQY□GKGAGGYCYAFGCWCTHLYEQAVVWPL
          ****:* ** ***** *: **. *: * :*** : * : *****:*.* ** * *.: .:**

C111      PNKSCS□
C112      PKKTCN
C111m     PKKCT□
          *:*:*.

```

Figura 5. Secuencias de aminoácidos de las toxinas para canales de sodio del alacrán *C. limpidus*. Comprenden 66 aminoácidos, con 8 cisteínas (recuadros rojos), que forman 4 puentes disulfuro. Registrado en Swiss-prot CII2 P59898.1; CII1 P45667.1; CII1m P45666.1. Los * indican los aminoácidos conservados, : cambios semiconservativos.

```

C119      MNSLLMITACLILIGTVWAEDGYLFDKRRKCTLACIDKTGDKNCDRNCKK--EGGSFGHC
C113      MNSLLMITACLAVIGTVWAKEGYIVNYYDGCKYACLKLGENDYCLRECKARYYKSAGGYC
C114      MNSLLMITACLALIGTVWAKEGYIVNHYHDGCKYECYKLGDNDCYCLRECKLRYGKGAGGYC
C112b     MNSLLMITACLALVGTVWAKEGYLVNHSTGCKYECYKLGDNDCYCLRECKQQYGKGAGGYC
C117      MNSLLMITACLVLFGTVWAKEGYLVNNTYTGCKYICWKLGENKYCIDECKE--IGAGYGYC
C116      MNSLLMIIGCLVLIGTVWAKEGYLVNMKTGCKYGCFYELGDNDCYCLDRKCKA--ESGNYGYC
C118      -----TVSAKEGYLVKKSNGCKYECFKLGENEHCDETECKAPNQGGSYGYC
C115c     MNSLLMITACLVLFGTVWAKEGYLVNKSTGCKYGCFWLGKNENCDMECKAKNQGGSYGYC
C115b     MNSLLMITACLAEIGTVWAKEGYLVNKSTGCKYGCFWLGKNENCDKECKAKNQGGSYGYC
          **  :::**..  *  *  :  *  :**  .  *:*

C119      SYSACWCKGLPGSTPISRTPGKTCCK-
C113      YAFACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCYGK
C114      YAFGCWCTHLYEQAVVWPLPKKRCNGK
C112b     YAFGCWCTHLYEQAVVWPLPKKTCNGK
C117      YFGCYCEGFENKPTWPLPNKTCGRK
C116      YTVGCWCEGLPNSKPTWPLPGKSCSGK
C118      DTFECWCEGLPESTPTWPLPNKSCGKK
C115c     YSFACWCEGLPDSTPTYPLPNKSCSKK
C115b     YSFACWCEGLPDSTPTYPLPNKSCSKK
          *:*  :  .  *  *  *

```

Figura 6. Secuencias de aminoácidos de los precursores de toxinas para canales de sodio del alacrán *C. limpidus*. Se muestran las secuencias de 9 precursores (Corona M.); el péptido señal se muestra subrayado y las 8 cisteínas en recuadros rojos.

De esta forma podemos observar que de este alacrán ya se tiene la información de la secuencia de aminoácidos de 9 toxinas supuestamente específicas para canales de sodio. Como las toxinas identificadas por clonación no se han ensayado fisiológicamente, no sabemos si son efectivas en causar modificación de los mecanismos de apertura y cierre de los canales de sodio.

2.1.1.2.2 KScTx

Las toxinas que afectan canales iónicos de potasio (KScTx) son péptidos con una longitud de 23 a 42 aminoácidos, que estructuralmente presentan un motivo α -hélice/lamina β y que es estabilizada por 3 o 4 puentes disulfuro (Rodríguez de la Vega, 2004). Estas toxinas bloquean el flujo de iones en los canales y se clasifican de acuerdo a la estructura primaria y a la disposición de los puentes disulfuro en: α , β , γ y κ .

Se han caracterizado 6 toxinas que afectan canales de potasio del alacrán *C. limpidus*: ClITx1 (38 aa), ClITx2 (36 aa; Martin, 1994), ClIErgTx1 (41 aa), ClIErgTx2, ClIErgTx3 y ClIErgTx4 (42 aa), (Corona, 2002). La ClITx1 y ClITx2 (Fig. 7) tienen 3 puentes disulfuro para estabilizarlas, mientras que las toxinas ClIErgTx se estabilizan por 4 puentes disulfuro (Fig. 8). Estas últimas se denominaron Ergtoxinas, por que actúan sobre canales de potasio que están codificados por los genes humanos hERG, de la familia *ether a go go*.

```

ClITx1      ITINVKCTSPQQCLRFCKDRFGQHAGKGCINGKCKCYP
ClITx2      TVIDVKCTSPKQCLPFCKEIIYGRHAGAKCMNGKCKC--
           . * : * * * * * : * * *   * * * :   : * : * * *   * : * * * * *

```

Figura 7. Secuencias de aminoácidos de las toxinas para canales de potasio del alacrán *C. limpidus*. Se muestran las toxinas ClITx1 y ClITx2, presentan 6 cisteínas, que forman los 3 puentes disulfuro. Genbank ClITx1 AAB32772.1; ClITx2 AAB32773.1

```

ClIErg1     DRDSCVDKSRC SKYGYQECQDCCKKAGHNGGTCMFFKCKCA-
ClIErg4     DRDSCVDKSKCAKYGYQGQCECCCKKAGDRAGNCVYLKCKCNQ
ClIErg3     DRDSCVDKSKCSKYGYQGQCDKCCCKKAGDRAGNCVYFKCKCNQ
ClIErg2     DRDSCVDKSKCSKYGYQGQCECCCKKAGDRAGNCVYFKCKCNP
           * * * * * * * * : * : * * * * *   : * : . * * * * * . . . * . * : : * * * *

```

Figura 8. Secuencias de aminoácidos de las toxinas para canales de potasio del alacrán *C. limpidus*. Se muestran las cuatro toxinas Erg reportadas con las ocho cisteínas que forman los cuatro puentes disulfuro. Tomado de Swiss-prot ClIErg1 Q86QV0.1; ClIErg2 Q86QU9.1; ClIErg3 Q86QU8.1; ClIErg4 Q86QU7.1

Existe solo un reporte de un KScTx purificado en el veneno de machos de *Opisthacanthus madagascariensis* (Yamaji, 2004), sin embargo, no se ha dilucidado la función de este componente en el veneno.

2.1.1.2.3 CaScTx

Estos péptidos poseen afinidad por diferentes tipos de canales de calcio (CaScTx), por esta razón la longitud de estos péptidos es muy variable desde 33 aminoácidos como las calcinas (Quintero-Hernández, 2013, Valdivia, 1991), hasta péptidos largos de más de 60 aminoácidos como la calcicludina (Schweitz, 1994) y las ω -agatoxinas (Pringos, 2011).

2.1.2 Péptidos sin puentes disulfuro (NDBP)

Los péptidos carentes de cisteínas tienen longitud variable y muestran principalmente actividad antimicrobiana. Entre estos está la Stigmurina (De Melo, 2015). Cabe resaltar que además de actividad antimicrobiana estos péptidos pueden tener otras actividades, la anticancerígena como el péptido TsAP de *Tityus serrulatus* (Guo, 2013). En *C. limpidus*, hasta este momento, no se han reportado la presencia de péptidos con actividad antimicrobiana, en el veneno. Sin embargo, esta reportada la presencia de una defensina en la hemolinfa de este alacrán (Rodríguez de la Vega, 2004)

2.2 Transcriptómica:

Durante la última década se han utilizado diferentes estrategias para explorar un poco más la diversidad de los componentes de los venenos de alacrán. Una de las herramientas más empleadas para conocer los componentes del veneno es la construcción y secuenciación de bancos de ADNc obtenidos a partir de ARN mensajeros obtenidos de la glándula venenosa. En la tabla 1 se resumen las especies para las que se han realizado librerías de ADNc, usando RNAseq o por secuenciación de clonas al azar, para caracterizar los transcritos presentes en las glándulas venenosa de los alacranes.

Tabla 1.- Alacranes con transcriptómica realizada.

Especie	Referencia
<i>Urodacus Yaschenkoi</i>	Luna-Ramírez, 2015
<i>Vaejovis</i>	Quintero-Hernández, 2015
<i>Mesobuthus gibbosus</i>	Diego-García, 2014
<i>Centruroides tecomanus</i>	Valdez-Velázquez, 2013
<i>Scorpiops jendecki</i>	Ma, 2009
<i>Hadrurus gertschi</i>	Schwartz, 2007
<i>Lychas mucronatus</i>	Zhao, 2010
<i>Tityus stigmurus</i>	Almeida, 2012
<i>Pandinus imperator</i>	Roeding, 2009
<i>Heterometrus petersii</i>	Ma, 2010
<i>Hottentotta judaicus</i>	Morgenstern, 2011
<i>Centruroides noxius</i>	Rendón-Anaya, 2012
<i>Pandinus cavimanus</i>	Diego-García, 2012
<i>Scorpio maurus palmatus</i>	Abdel-rahman, 2013

Estos trabajos se realizaron bajo diversos enfoques desde una descripción de los componentes del veneno (Schwartz, 2007), enfoques comparativos por región (Zhao, 2010), hasta análisis filogenéticos (Roeding, 2009; Santibáñez-López, 2015). Gracias al empleo de estas estrategias hemos pasado de conocer unos cuantos péptidos, ya fuesen toxinas o NDBP, a tener al alcance cientos de secuencias para cada especie de alacrán.

2.3.-Diferencias intersexuales del veneno de alacrán

Se han realizado pocos trabajos cuyo objetivo es identificar si existen diferencias en la composición de los venenos entre hembras y machos de la misma especie de alacrán. Tal es el caso de *Tityus nororientalis* (*Buthidae*). En el trabajo de De Souse (2010), describen diferencias de toxicidad entre ambos. Yamaji (2004) demostró que existen componentes que solo se han logrado caracterizar en el macho de *Opisthacanthus madagascariensis*. Recientemente en el trabajo de Rodríguez-Ravelo (2015) se observan diferencias en los venenos de *Rhopalurus junceus*.

Sin embargo, existen algunos trabajos de arácnidos enfocados a analizar diferencias en el veneno ligadas al sexo, pero se ha demostrado que las preferencias de depredación, tanto en estrategias de cacería (Webber, 2013), como en preferencias en el tamaño de las presas (Pekár, 2011) demostró que las hembras paralizan con mayor eficiencia a sus presas. Incluso se ha demostrado que en las arañas, el canibalismo sexual favorece el desarrollo de las crías (Rabaneda-Bueno, 2008). Es posible que esta diferenciación también se presente en la composición del veneno de los alacranes, ya que está es una herramienta para cazar, defenderse de sus predadores, e incluso juega un papel en el apareamiento, en el trabajo de Francke, (1979) está documentado que durante la danza reproductiva los machos del alacrán *Megacormus* pican a la hembra. Con estas evidencias podemos suponer que existen diferencias en la composición del veneno de hembras y machos del alacrán *C. limpidus*, dado que presenta diferencias morfológicas y etológicas.

3.-JUSTIFICACIÓN

De las especies de alacranes mexicanos se han hecho algunos estudios pioneros a nivel mundial. Del alacrán *Hadrurus gertschi* se describió el primer transcriptoma de glándulas venenosas (Schwartz, 2007), que es un alacrán no peligroso al humano. También se reportó un estudio completo del transcriptoma, obtenido por pirosecuenciación, de las glándulas venenosas del alacrán *C. noxius* (Rendón-Anaya, 2012), que contiene el veneno más potente de los alacranes mexicanos.

Sin embargo, de *C. limpidus* solamente conocemos algunas toxinas específicas para canales iónicos, a pesar de que este alacrán se considera el de mayor importancia médica. Por lo que este trabajo contribuirá para conocer más componentes peptídicos del veneno y conocer si estos componentes se expresan diferencialmente entre machos y hembras o no.

4.- HIPÓTESIS

Existen diferencias etológicas y morfológicas entre la hembra y el macho de algunos arácnidos en los que se ha demostrado que la composición de los venenos está ligada a cada sexo. Si el alacrán *C. limpidus* presenta estas diferencias etológicas y morfológicas entonces también puede verse reflejado en la composición de los venenos. De manera adicional se identificarán nuevos componentes presentes en el veneno del alacrán *C. limpidus*.

5.-OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los componentes peptídicos y proteicos del veneno y la caracterización transcriptómica de la glándula venenosa de machos y hembras del alacrán *C. limpidus*,

5.1.-Objetivos específicos

1. Obtener, de manera independiente el veneno de hembras y machos y purificar sus componentes por diversas técnicas cromatográficas y electroforéticas.
2. Determinar la masa molecular los componentes peptídicos.
3. Obtener un banco de ADNc a partir de ARNm presentes en el telson tanto de hembras como de machos.
4. Analizar y comparar los resultados obtenidos para machos y hembras y compararlos con la literatura.
 - Realizar secuenciación masiva del transcriptoma, para análisis comparativo bioinformático.

6.-MÉTODO

6.1.-Material biológico

Los alacranes fueron colectados en los alrededores de Igual, Guerrero y en Miacatlan, Morelos.

El veneno obtuvo mediante estimulación eléctrica el veneno de alacranes *C. limpidus*, separándolos por género, machos y hembras, usando las características mencionadas anteriormente.

Las glándulas venenosas fueron retiradas de los alacranes siete días posteriores a la obtención del veneno.

6.2.- Estimación de la concentración del veneno.

El veneno obtenido por estimulación eléctrica se resuspendió en agua tetradesilada y centrifugo por 8 min a 16000xg. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, se estimó la concentración por absorbancia a 280 nm., considerando que una unidad de absorbancia corresponde a 1mg/ml de proteína.

6.3.- Cromatografía de exclusión molecular

Las muestras se separaron en una columna de 60 x 0.9 cm, de Sephadex G-50 medio, en un flujo isocrático de 0.5 ml/min de acetato de amonio 20 mM pH 4.7. Las fracciones correspondientes a pesos moleculares altos se almacenaron para procesarlas por electroforesis bidimensional y posteriormente mandar las manchas a espectrometría de masas. En cuanto a las fracciones recuperadas por exclusión molecular que corresponden a pesos moleculares medianos y pequeños se separaron por cromatografía de fase reversa.

6.4.- HPLC fase reversa

Se realizó cromatografía líquida de alta presión de fase reversa en una columna C₁₈ analítica (250 x 10 mm) de la compañía Vydac® (Hisperia, CA, USA). Se utilizó un gradiente lineal a partir de un solvente A (agua en 0.12% de trifluoroacético (TFA)) a 60% del solvente B (acetonitrilo con 0.1% de ácido trifluoroacético), con un flujo de 1ml/ml en 60 y en 90 min.

Las fracciones fueron colectadas manualmente y concentradas rota-vapor para analizarlas posteriormente por espectrometría de masas.

6.5.-Caracterización proteica por electroforesis bidimensional

6.5.1.-Cuantificación proteica de veneno

La fracción I, obtenida a partir de cromatografía de exclusión molecular de los venenos a analizar, se liofilizó y se resuspendió en solución de rehidratación (Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 4%(w/v), Farmalito 3-10 2% (v/v), DTT 40mM). Se tomaron 2 µl para cuantificarlos con el kit 2D-Quant® (GE Life sciences, USA) para determinar qué cantidad de muestra sería aplicada en la electroforesis.

6.5.2.-Electroforesis bidimensional y análisis de imágenes

Se usaron tiras de poliacrilamida de 7cm con gradientes de 3-10 no lineal (GE Healthcare). Se colocaron en solución de rehidratación con 0.5% de anfolitos y 44 ug de muestra durante 14 horas. Se realizó el isoelectroenfoco a la temperatura de 20 °C, usando el Ettan IPGphor 3® (GE Healthcare), en donde el voltaje se incrementó linealmente de 300 a 5000 V por 2.5 h, seguido por un voltaje constante de 5000 V hasta alcanzar 6500 V/h.

Antes de la segunda dimensión, las tiras se incubaron por 20 min en solución amortiguadora de equilibrio SDS Laemmli con 1% de DTT y después con 2.5% de iodoacetamida por 10 min. Las tiras equilibradas se insertaron en geles de SDS-PAGE al 12 % y se separaron a voltaje constante a 30 V. Se usó Coomassie para la tinción de proteínas. y posteriormente se envió a la unidad de proteómica del IBT-UNAM para su identificación de las manchas.

6.5.3. Identificación de proteínas por LC-MS

Las muestras fueron previamente reducidas con dithiothreitol (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA), alquiladas con iodoacetamida (Sigma-Aldrich) y digeridas con Tripsina en 50mM bicarbonato de amonio (pH 8.2) a 37°C por 18 horas.

Los péptidos obtenidos de la digestión antes mencionada fueron desalados con Zip Tip C18 (Millipore; Billerica, MA, USA) y aplicados en un sistema LC-MS. En el sistema LC se utilizó un gradiente de 10-80% de solvente B (agua/acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) en 120 minutos utilizando una columna capilar ID 0.75 µm y 10cm largo RP-C18) con un flujo de 300 nanolitros/minuto; el en sistema MS se utilizó un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) con ionización por nano-electrospray.(ESI). La adquisición de datos fue por CID y HCD Ver anexo 2.

6.6.-Obtención del banco de ADNc

El banco de ADNc se preparó a partir del ARN de la glándula venenosa, el cual se purificó y cuantificó previamente.

6.6.1.-Obtención de ARN

A partir de 2 grupos de 5 alacranes previamente ordeñados 5 días antes, se colectaron las glándulas venenosas para obtener el ARN utilizando el kit SV Total RNA Isolation System ® Promega (Anexo 2). Se cuantificó a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 de la ®Thermo Scientific (San Jose, CA, USA).

6.6.2. Obtención de ADNc

Se utilizó el kit In-fusion SMARTer Directional cDNA Library Construction® Clontech (Clontech Laboratories Inc. Japan) (Anexo 2) para obtener el ADN de doble cadena el cual se insertó en los vectores pSMARTER2FD®clontech (grupo 1 de alacranes) y TOPO-TA®Invitrogen, PKS®pharmacia biotech, (grupo 2 de alacranes) Las dos reacciones de ligación se transformaron en células de *Escherichia coli* DH5α por electroporación. Se cuantificó el banco de ADNc por titulación en placa y se conservó en glicerol al 50%, a -80°C. Para analizar el banco de ADNc se realizó PCR de colonia; las colonias que presentaron un amplificado mayor a 500 bp se mandaron a secuenciar. Los datos se analizaron en Ape Plasmid Editor, BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), ClustalO (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>), Expasy Translate (<http://web.expasy.org/>), Signalp (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) , ProP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) , ProtParam (<http://web.expasy.org/>), Spider P (<http://www.arachnoserver.org/spiderP.html>)

7.-RESULTADOS:

7.1 Análisis proteómico

7.1.1 Separación del veneno total por HPLC en fase reversa

En esta separación se usó un gradiente de 0 a 60% acetonitrilo con 0.1% de ácido trifluoroacético en 60 min. Las muestras de veneno tanto de machos y como de hembras se separaron en HPLC fase reversa, y se recuperaron las fracciones (Fig. 9). Estos datos no son comparables; sin embargo, en la figura se muestran los perfiles cromatográficos exploratorios.

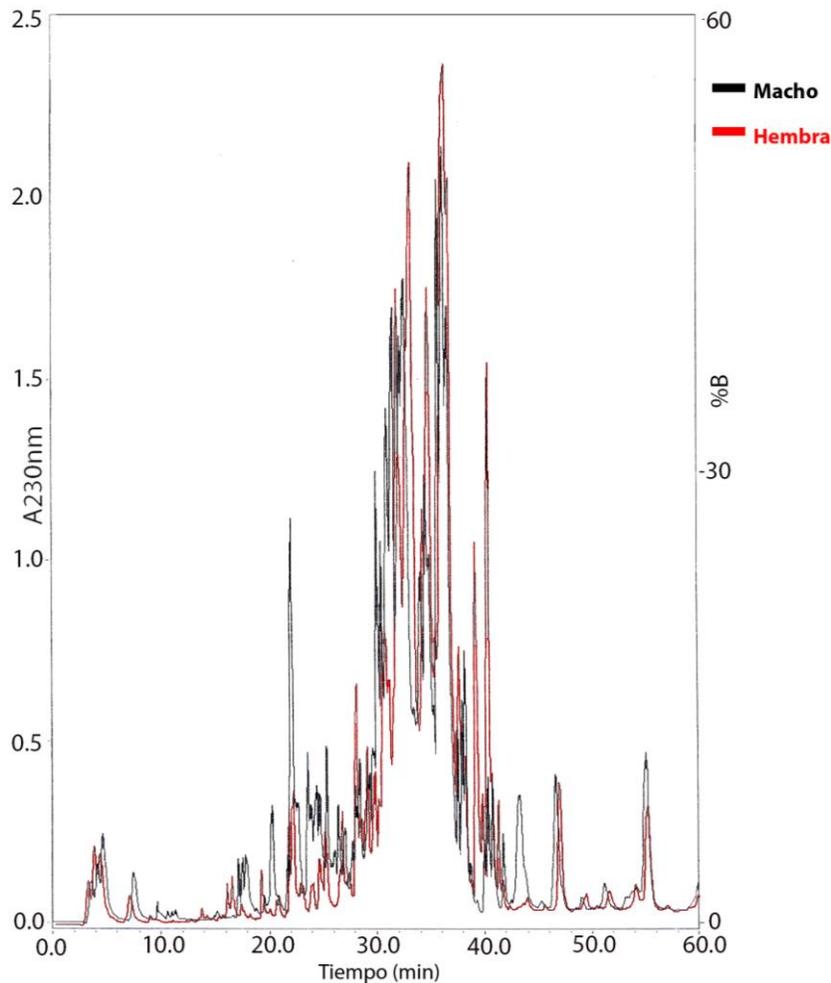


Figura 9. Perfiles cromatográficos de fase reversa del veneno de hembras (rojo) y machos (negro). La cantidad de muestra aplicada fue de 2.41 mg para las hembras y 2.08 mg para los machos.

Los perfiles son similares, cabe destacar que en el tiempo de retención 22.08, se observa una mayor absorbancia en el veneno de machos. Los perfiles cromatográficos individuales se encuentra en el Anexo 1 (Fig. S1 y Fig. S2).

Sin embargo, existe un desplazamiento en la muestra de las hembras, este comportamiento podría sugerir que la muestra de las hembras es más hidrofóbica.

7.1.2 Análisis proteómico de los componentes obtenidos

A continuación, se muestra una tabla de los pesos moleculares obtenidos por espectrometría de masas a partir de las fracciones colectadas por cromatografía de fase reversa. En la tabla se indican los tiempos de retención con su equivalente, es decir, el pico que corresponde en hembras al mismo tiempo de retención de machos.

Bajo estas condiciones de purificación se identificaron 61 pesos moleculares para los machos y 58 para las hembras, al realizar la comparación entre estos componentes se encontró que existen 38 componentes únicos para machos y 35 componentes únicos para hembras, este fenómeno se puede explicar por un efecto de concentración relativa, es decir que los componentes estén presentes, pero en baja concentración y no logramos identificarlos.

Tabla 2. Pesos moleculares de los componentes obtenidos, de hembras y machos de *C. limpidus*.

TR	Masas Hembras (Da)	TR	Masas Machos (Da)
3.53		3.6235	
4.1		4.2072	347
4.61	487	4.7104	
7.31	1073	7.5287	
		9.6998	
		10.1511	
		10.6715	
		11.06	932
		11.36	932
13.96	2550		
14.37	2550/2607.00		
14.88		14.93	2549.09
		15.23	908.19
15.52		15.45	2449.1
15.9	904	15.87	2274
16.28	2570	16.33	
16.73	2611.3	16.69	
		17.18	2570.14
17.63		17.56	3767.43/2611.43
		17.88	3767.1
		18.84	
24.77	6445.01	24.74	4067.29
		25.05	
25.38	3986.75	25.38	
		25.95	
		26.17	4048.55
		26.58	4751.72
26.9	4760	27.07	4199.03/4748.8
27.65	4199.3/2828.00	27.82	6947.2
		28.06	4481.38/2782
28.17	6946.8	28.25	6965.67/3897.31
28.64	6946/8356.00/2781.0	28.43	4481.38/6965.67
29.2	7224/6964.00	29.22	
		29.37	7388.02/7075.77/6827.48
29.9	7545/7290.78/6964.0	29.68	7075
30.29	6482.7/6387.00	30.07	7559.2
30.61	7616.53/7558.80	30.55	7578/7299.05
30.87	6464.45	31.04	7542
31.24	7297.47/6464.00	31.54	6990.24/7579
31.96	7138/7541.00/7577.0	32.24	7562
32.18	7577.03	32.24	7562.36/7004.31/7242.94

Continuación Tabla2.

TR	Masas Hembras (Da)	TR	Masas Machos (Da)
32.84	7228/7577.00	32.6	7242.3
33.14	7241.6		
33.38	6103.9/7241.60	33.49	7302.5/7243.05
33.86	7241	33.77	10861.05/7776.65/7302.63/70
34.33	7385.7/7656.00/7205.0	34.17	7774.94/6838/7385.69
34.77	7205/13585.00	34.6	6839.01/7461
		34.97	6839.3
35.51	7315/7351.60	35.39	7462.45/7316.3
		35.73	7464/7317
36.27	7315/6901.00	36.27	7318.17
36.65	6900/7315.00	36.6	7318
		37.09	7474.8
37.64	6872	37.56	7474.8
		37.96	7038.7/4474.8
38.32	8020.12	38.25	5325.2
		38.75	16070/5325
39.21	6780.94	39.33	7489
39.83	6574.7		
		40.07	6782.83
40.31	6781.52	40.42	6575.54
40.71	7568.4	40.79	7568.69
41.28	6767.5		
41.7	6767/6159.60	41.79	6160.53/7568
42.33		42.46	1413.7

Tomando como criterio aquellas diferencias que son muy notorias entre los cromatogramas (Fig. 11) se seleccionaron para indagar más sobre los péptidos presentes en los picos diferentes, A pesar de que en algunos picos los pesos moleculares en hembra y macho son los mismos, la proporción es diferente, tal es el caso de la fracción 22.08 que esta mayormente representada en los machos. Se decidió determinar la secuencia del amino-terminal, de las fracciones seleccionadas para tener más información: También se realizó un alineamiento local de la secuencia de aminoácidos para identificar a que familia de péptidos pertenece estos datos se analizaron por separado y se muestran en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Secuencias de amino terminal de los péptidos del veneno de hembras de *C. limpidus*.

Tiempo retención	Secuencia Hembras	Alineamiento	%Identidad
21.95	KYXYNDDDSKSEXMVV // TVINVKYQKPWNXLPXXK XI	Indefinida	
22.37	TVINVKXTSPKQXLPPXK EIYGRHAGAKXMVGKXH XSX	Potassium channel toxin alpha-KTx 2.12; Toxin Ce5 Sequence ID: E 1E-16 sp P0C165.1 KAX2C_C ENEL	95% IDENTIDAD
39.21	KEGYPMNSKGXKIGXVIG NT	BETA NEUROTOXINA Css IX PRECURSOR Sequence ID: E 2E-05 gb ADY17426.1 	74% IDENTIDAD
39.83	KEGYALNKDGXPIPYLLD SAYXNKEQVQP	Indefinida	
55.09	DDQAIVVEALVVT	Indefinida	

Tabla 4. Secuencias de amino terminal de los péptidos del veneno de machos de *C. limpidus*.

Tiempo retención	Secuencia Machos	Alineamiento	%identidad
22.08	KYXYNDDGQKSEPMVV KYXQYGTXY// TVILVKATSPKXXXPVXK Y	Indefinida	
22.60	TVINVKXTSPKQCLPPX KEIYGRHAGAKKM	Potassium channel toxin alpha-KTx 2.12; Toxin Ce5 Sequence ID: 2E-21 <u>sp P0C165.1 KAX2C_CEN</u> <u>EL</u>	96% identidad
40.07	RDGYALRKDGXATPXL	Indefinida	
40.42	KEGYPMNSEGXKIGXVI GNTFXDTE	Putative beta-neurotoxin RjAa8 Sequence ID: identidad <u>sp E7CLN3.1 SCX8_RHOJ</u> <u>U</u>	68% identidad 4E-08
55.15	DXQXIVVEXLVTESAFT KRFETTKALTEYVTVMY	Venom metalloproteinase antarease; VMPA Sequence ID: 3E-06 <u>sp P86392.2 VMPA_TITSE</u>	66% identidad

7.1.3 Cromatografía de exclusión molecular de veneno total

Con el fin de mejorar la identificación de los componentes del veneno de machos y hembras, se realizó una segunda estrategia de purificación entonces se propuso inyectar primero las muestras en una columna de exclusión molecular, se aplicó el veneno de *C. limpidus*, de hembras y machos por separado, se colectó por volumen (0.5 ml/tubo), se obtuvo la absorbancia a 280 nm, y se separaron las fracciones de acuerdo a las Fig. 10 y 11, en fracción I, II y III.

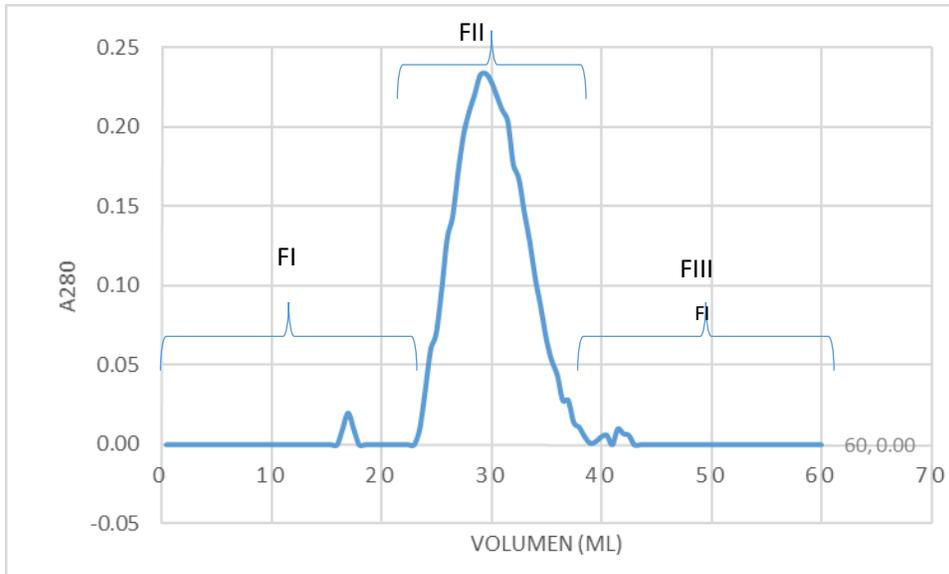


Figura 10. Cromatograma de exclusión molecular del veneno de hembras *C. limpidus*. Se aplicaron 3 mg de veneno en 200 μ l de una columna (60 x 0.9 cm) de Sephadex G-50, usando un flujo isocrático de 0.5 ml/min en presencia de 20 mM de amortiguador de acetato de amonio pH 4.7.

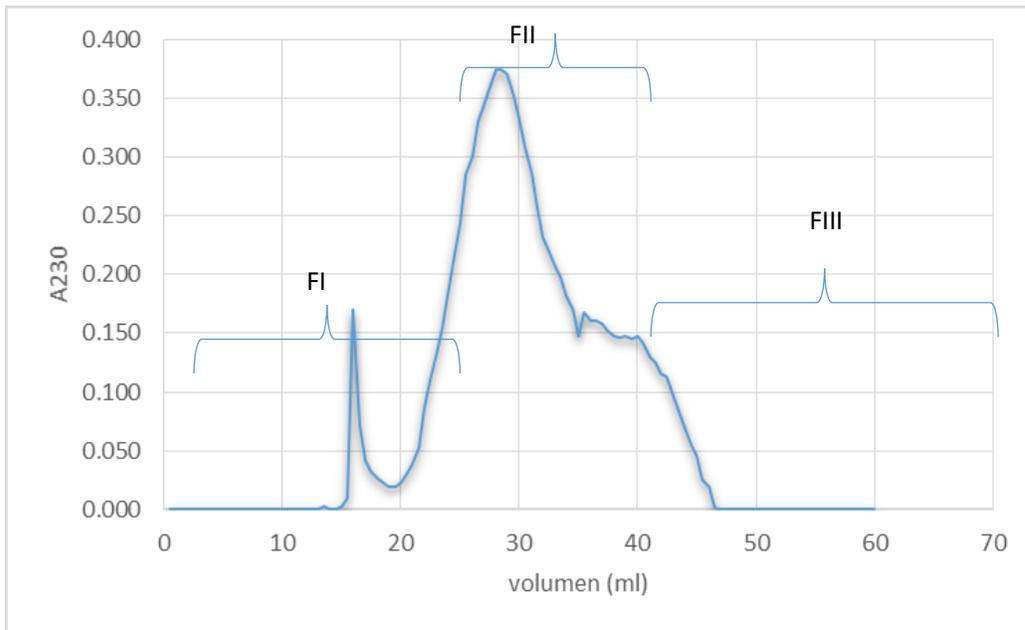


Figura 11. Cromatograma de exclusión molecular del veneno de machos *C. limpidus*. Se aplicaron 4.8 mg de veneno en 200 μ l de una columna (60 x 0.9 cm) de Sephadex G-50, usando un flujo isocrático de 0.5 ml/min en presencia de 20 mM de amortiguador de acetato de amonio pH 4.7.

La fracción I de la separación por exclusión molecular tanto de hembra como de macho se sometieron a una separación en un sistema de electroforesis bidimensional, en esta fracción se encuentran componentes de mayor peso molecular como proteasas, fosfolipasas entre otras se ha demostrado que estos componentes eluyen en tiempos muy prolongados en HPLC de fase reversa (Batista, 2004). Los componentes de mediano y bajo peso molecular que típicamente corresponden a las toxinas de sodio y potasio, se separaron por HPLC fase reversa, usando gradientes de 0 a 60 de %B (acetonitrilo con 0.1% de ácido trifluoroacético) en 90 min.

7.1.4 Electroforesis bidimensional de la Fracción I

Se implementó una separación por electroforesis bidimensional bajo las condiciones descritas en el apartado 6.5. En la Fig. 12 se muestran los perfiles electroforéticos obtenidos de la fracción I. A) macho; B) hembra (B). Se aplicó la misma cantidad de muestra de macho y de hembra, este resultado sugiere que la diferencia entre los venenos puede radicar en la abundancia relativa de los componentes.

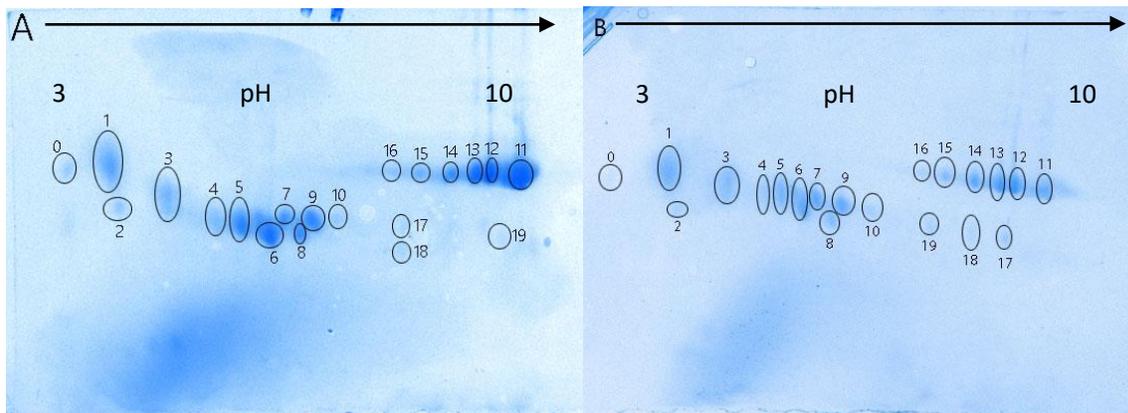


Figura 12. Electroforesis bidimensional (acrilamida al 12%), de la fracción I de veneno de machos y hembras. Usando un isoelectroenfoco de pH 3-10 no lineal de la fracción I previamente obtenida por exclusión molecular. A) macho y B) hembra.

Las manchas de los geles se secuenciaron en la unidad de proteómica del IBT-UNAM. Se identificaron serina proteasas, metaloproteasas, fosfolipasas, hialuronidasas y proteínas de la superfamilia CAP (Alérgenos), se identificaron en ambas muestras. La tabla 5 muestra los tipos de proteínas que se lograron identificar para cada mancha de los geles antes mencionados.,

Tabla 5 Identificación de proteínas por secuenciación LC/MS del veneno de machos y hembras del alacrán *C. limpidus*.

Mancha	Proteína/Uniprot	Proteína/Uniprot
	Hembras	Machos
0	CRISP A0A0C9RFK9	CRISP A0A0C9RFK9 HIALURONIDASA P85841
1	DEFENSINA C5WZX1 FOSFOLIPASA Q45Z20	HIALURONIDASA P85841 HIALURONIDASA W0HFN9 CRISP A0A0C9RFK9
4	FOSFOLIPASA V8NHI8 SERINA PROTEASA T1DED9	
5		CRISP A0A0C9RFK9
6	FOSFOLIPASE V8NHI8	
7	ALERGENO B2D0J4	SERINA PROTEASA A0A034WUA6
8	FOSFOLIPASE V8NHI8	
9	HIALURONIDASA A0A154P1H0	
11	CRISP A0A0C9RFK9 CRISP F8THJ4	HIALURONIDASA P85841 CRISP A0A0C9RFK9 SERINA PROTEASA A0A0A9ZBZ4 CRISP A0A0C9RFK9 HIALURONIDASA W0HFN9 HIALURONIDASA P85841
14	CRISP A0A0C9RFK9 CRISP F8THJ4	CRISP F8THJ4 HIALURONIDASE P85841
15	CRISP A0A0C9RFK9 CRISP F8THJ4	HIALURONIDASE P85841 CRISP A0A0C9RFK9
16	CRISP A0A0C9RFK9 CRISP F8THJ4	CRISP A0A0C9RFK9 FOSFOLIPASE C T2HPE4
18	CRISP A0A0C9RFK9	
20		CRISP A0A0C9RFK9 HIALURONIDASA P85841

Se identificaron los tipos de proteínas presentes en el veneno de machos y hembras a partir de la electroforesis bidimensional, en estos resultados podemos observar que la distribución de las hialuronidasas está en mayor proporción en los machos.

Otro aspecto importante es que función tienen en el veneno los componentes denominados como CRISP, que también están ampliamente distribuidos en el veneno de esta especie de alacrán. Entre estos componentes es común encontrar algunos alérgenos presentes en venenos de otras especies de artrópodos.

7.1.5 RP- HPLC de la fracción II.

La fracción II del veneno de *C. limpidus*, de hembras y machos se separó en cromatografía de fase reversa, inyectando 1 mg de ambas fracciones. Al realizar la sobreposición de los cromatogramas de la fracción II del veneno de hembra y macho se observan varios picos evidentemente diferentes (figura 13). Los perfiles cromatográficos individuales se encuentra en el Anexo 1 (Fig. S3 y Fig. S4).

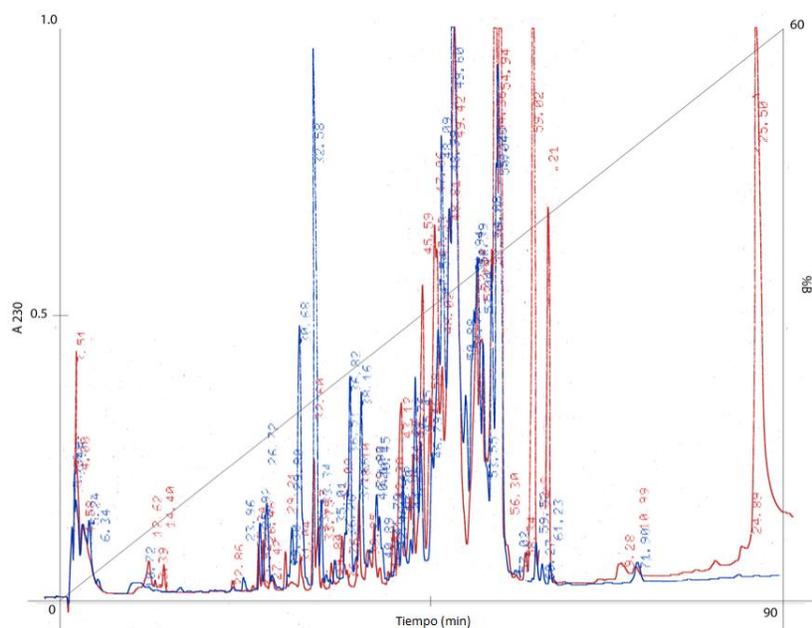


Figura 13. Perfiles cromatográficos de fase reversa de la fracción II del veneno de hembras (rojo) y machos (azul). Se usó un gradiente de 0 a 60 % acetonitrilo con 0.1% de ácido trifluoroacético en 90 min. De ambas fracciones se inyectó 1 mg.

En esta sobreposición podemos observar un fenómeno similar al de la figura 9, las fracciones 22.08 de la primera estrategia de purificación corresponde al tiempo de retención 32.58 en esta estrategia de purificación, en ambas estrategias se observa una mayor proporción de esta fracción en los machos.

Al igual que en la primera estrategia se realizó la determinación de las masas, en esta ocasión se determinó la fracción II de hembras y machos estas se muestran en la tabla 6. En esta estrategia de purificación se identificaron 59 pesos moleculares para los machos y 41 para las hembras, estos datos se analizarán en conjunto con los datos mencionados en la sección 7.1.2.

Tabla 6. Pesos moleculares de los componentes obtenidos de la fracción II del veneno de hembras y machos de *C. limpidus*.

TR	Masas hembras (Da)	TR	Masas machos (Da)
25.34	1109, 771	23.96	904
25.92	2570.57	25.92	2570.19
26.46	2612.25	26.72	3766.86, 2612.25
27.42	927	29.3	3435, 3879.54
29.21	3453.68	30.68	764.67, 1078
31.04	4179.78,4079.93	29.8	3880.05
32.6	3421.28, 4192.2	33.34	4241.8
33.17	4242, 4192.1	32.58	3421.13
33.75	4242	35.01	4036.02, 3951, 1012
34.84	7018, 4035	36.26	6891, 4882, 3954
36.09	6889.01, 4866.89, 3953.77	36.53	4032
36.76	4172.48	36.82	3973, 4174.32, 4284.6
38.1	3987.08	37.66	893, 4082
39.15	4048.3, 4238	38.16	3987.75
39.97	4761.31	39.9	4762
41.74	2748.2	40.1	4761.04, 2829.19
42.3	6946.72, 4498.7, 2782	40.45	4200.19, 7488, 3886.48
43.12	6965.62	40.89	4200.19
44.59	6516.05	41.78	2748.5
45.59	6465	42.46	4498.91, 6948, 2782.33
46.58	7270, 6466	42.66	4499.3, 3987.2
47.06	7139.06,7578.18, 6847.3	43.3	6965.03
48.02	6989.48, 7579.26	44.25	6260.77, 7841
48.81	7228.44, 7847.3, 7579	44.76	6516.3, 7416
49.42	7243	45.45	7075.08, 6386.97
52.44	6793.79	46.79	7578.74

Continuación tabla 6.

TR	Masas hembras	TR	Masas machos
53.96	7318.36	48.09	7578.39, 6989.65
54.36	7318.73	49.6	7242.58, 7561.3, 7848.2
54.94	7319.71	50.88	7303, 17937, 6839.64, 7229
56.3	6873, 13593.7	51.7	7050.48, 6839.24, 7386
58.34	6783	51.94	7385.4, 6839
59.09	6575.15	52.39	6839.16
61.63	6782.83	53.04	7703.09, 7317.92, 6946.9
		54.08	7464, 7318
		54.78	7318.5, 7552.6
		55.04	7320, 6930.19
		56.02	6146.42
		59.82	6781.99
		60.27	6576.2
		61.23	6783.77

Se determinó que existe una mayor cantidad de componentes en los machos, en comparación con las hembras. Al hacer las comparaciones, se encontró que alrededor del 40% de los componentes de la fracción II son diferentes entre hembra y macho de *C. limpidus*. Este fenómeno también se presentó en la separación de la fracción soluble del veneno de machos y hembras por HPLC de fase reversa, y las diferencias más notables en la purificación del veneno total también se presentan con esta estrategia de purificación.

El péptido presente en la fracción 32.58 presente en los machos que corresponde al tiempo 22.08 de la primera estrategia de purificación tiene el mismo peso molecular en hembras y machos, por lo que podemos suponer que solo se encuentra en proporciones diferentes.

7.1.6 RP- HPLC de la fracción III.

La fracción III del veneno de *C. limpidus* de hembras y machos se separó en cromatografía de fase reversa, inyectando 100 µg de ambas fracciones.

Se realizó la sobreposición de la fracción III del veneno de hembras y machos se muestran en la (figura 14). Se observan tres picos aparentemente diferentes; sin embargo, las fracciones de las hembras no presentan un perfil clásico de absorción de un péptido, con dos máximos uno a 230nm y el otro a 280nm, estas fracciones presentaron un máximo de absorción en 260nm, no se logró identificar estos componentes. Los perfiles cromatográficos individuales se encuentra en el Anexo 1 (Fig. S5 y Fig. S6).

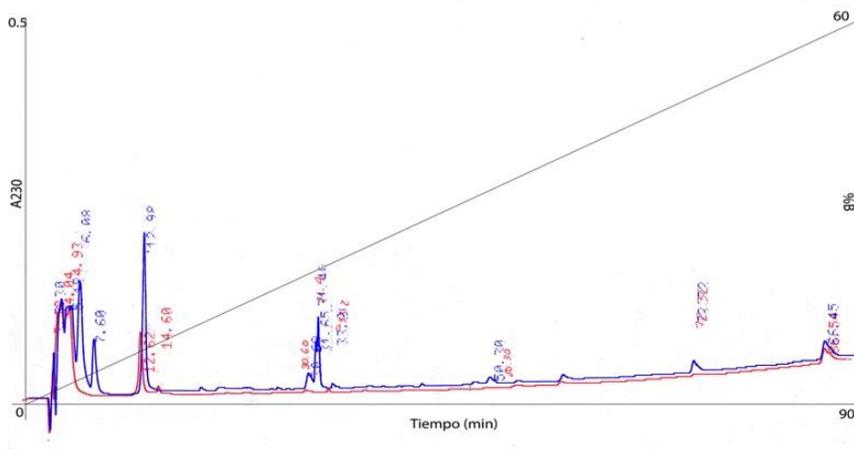


Figura 14. Perfiles cromatográficos de fase reversa de la fracción III del veneno de hembras (rojo) y machos (azul). Se usó un gradiente de 0 a 60 % acetonitrilo con 0.1% de ácido trifluoroacético en 90 min. De ambas fracciones se inyectó 1 mg.

Se realizó la identificación por masas de algunos componentes de la fracción III de machos, estos se muestran en la tabla 7. Las fracciones de las hembras no se lograron determinar.

Al analizar las tablas de las fracciones II (tabla 6) y III (tabla 7), se observó que la separación no tuvo la resolución suficiente para los componentes menores a 1000Da.

Tabla 7. Pesos moleculares de los componentes obtenidos de la fracción III del veneno de hembras y machos de *C. limpidus*.

TR	Masas machos (Da)	TR	Masas hembras (Da)
12.98	ND	12.62	ND
30.06	2096	14.6	ND
31.4	763.6		
31.65	3437		

Con estos datos se estimó la diversidad de los pesos moleculares de los componentes de los venenos (Fig. 15), en donde se observa que la mayor abundancia corresponde a los pesos moleculares entre 3000-7000 Da, típicamente las toxinas de alacrán que reconocen los canales de sodio y de potasio, tienen pesos moleculares en este rango.

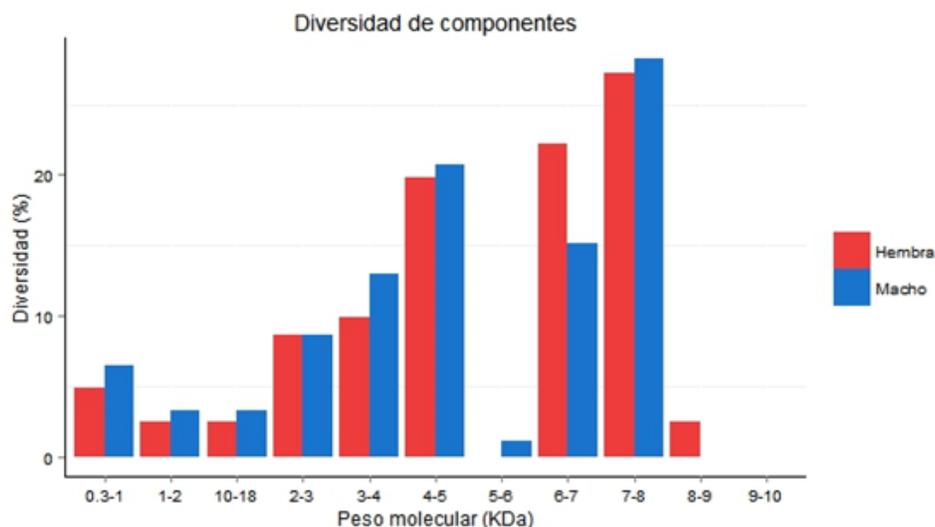


Figura 15. Proporción relativa de los pesos moleculares de los componentes encontrados en el veneno de hembras y machos de *C. limpidus*.

7.2. Análisis transcriptómico

A partir de la biblioteca de ADNc obtenida de las glándulas venenosas de *C. limpidus*, machos y hembras, se mandaron a secuenciar 38 clonas de hembras y 38 clonas de machos con los resultados que se describen abajo.

En las siguientes figuras se presentan los alineamientos de los componentes encontrados a partir del ADNc de las bibliotecas de las glándulas venenosas de hembras y machos de *C. limpidus*.

Se han encontrado los precursores CII2b, CII3, CII4, CII5b y CII5c*, que previamente ya se habían descrito para *C. limpidus*. Dentro de los transcritos de las librerías, tuvieron identidad con varios alacranes del mismo género, como *C. noxius*, *C. gracilis* y *C. suffusus*; también se encontraron identidad con toxinas de otros géneros, como *Rophalurus junceus*.

En la figura 16 se presentan las secuencias de machos que tuvieron identidad con toxinas que reconocen a canales de sodio o precursores previamente reportados de *C. limpidus*. En la figura 20 se encuentran las toxinas de hembras, con las características antes mencionadas.

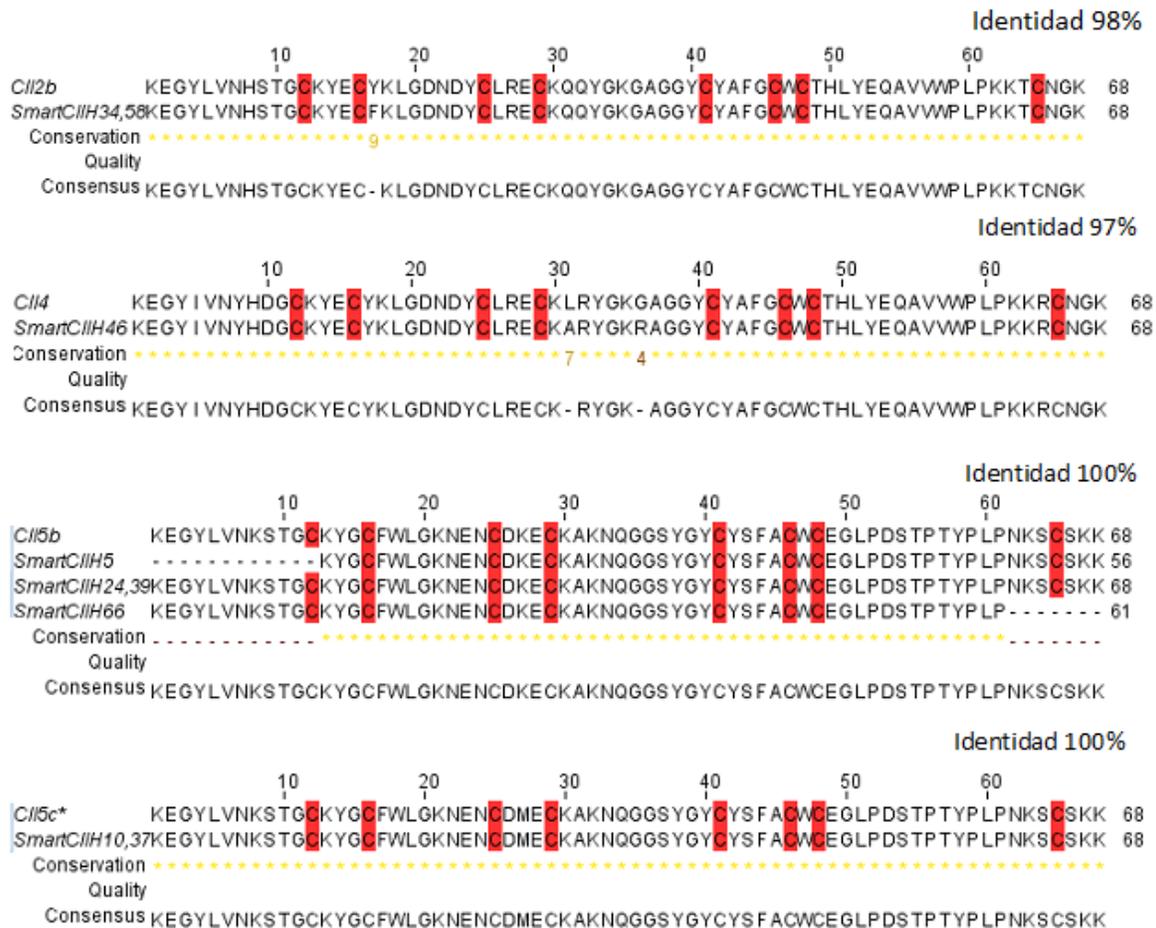


Figura 17. Alineamiento de las secuencias encontradas en la biblioteca de la glándula venenosa de hembras de *C. limpidus*, con identidad de toxinas de sodio o sus precursores que fueron descritas previamente para *C. limpidus*. Las secuencias denominadas como SmartCIIH son de la genoteca de hembras, el número indica la clona. CII2b, CII4, CII5b, CII5c: NaScTx putativas de *C. limpidus*.

Se encontraron algunas de las toxinas de sodio ya descritas para *C. limpidus*, tal es el caso de las clonas 2M, 34H y 58H que corresponde al precursor CII2b, también las clonas 21M, 70M, 10H y 24H que corresponde o tienen similitud con el precursor CII5c*, la clona 24H, 39H, 66H y 21M corresponden al precursor CII5b, las clonas 105M, 46H corresponden a CII3 y CII4 respectivamente.

En las figuras 18 y 19 se presentan las secuencias que tuvieron identidad con toxinas pertenecientes a otros alacranes, tanto del género *Centruroides* como de otros géneros.

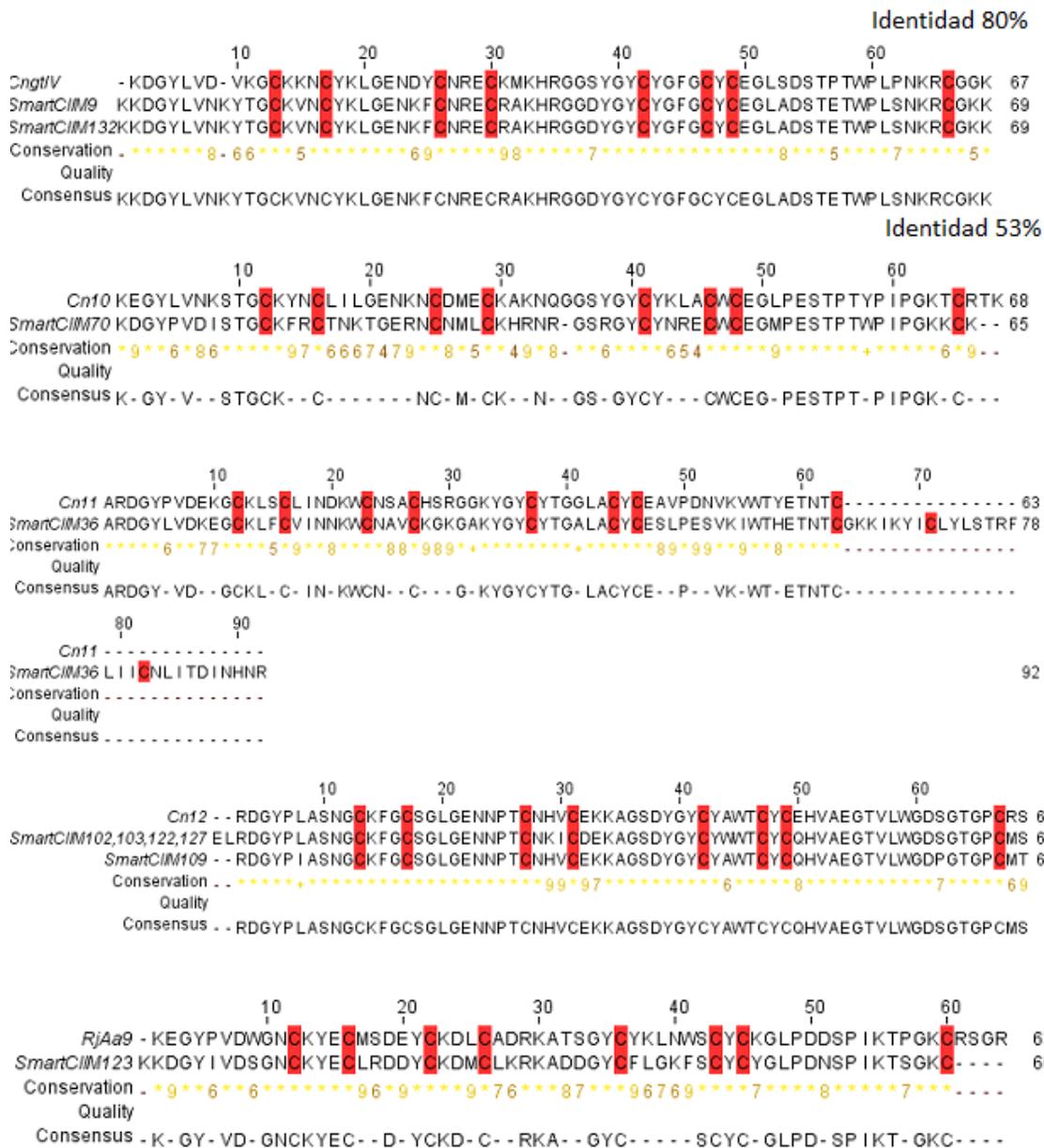


Figura 18. Alineamiento de las secuencias encontradas en la biblioteca de la glándula venenosa de machos de *C. limpidus* con identidad de toxinas de sodio o sus precursores. Las secuencias denominadas como SmartCIIM son las secuencias obtenidas en la genoteca de machos, los números corresponden a la clona. Cn10: beta-NaScTx *C. noxius* Cn11: NaScTx *C. noxius*; Cn12: alfa NaScTx *C. noxius*; RjAa9: putativa alfa-NaScTx de *Rophalurus junceus*.

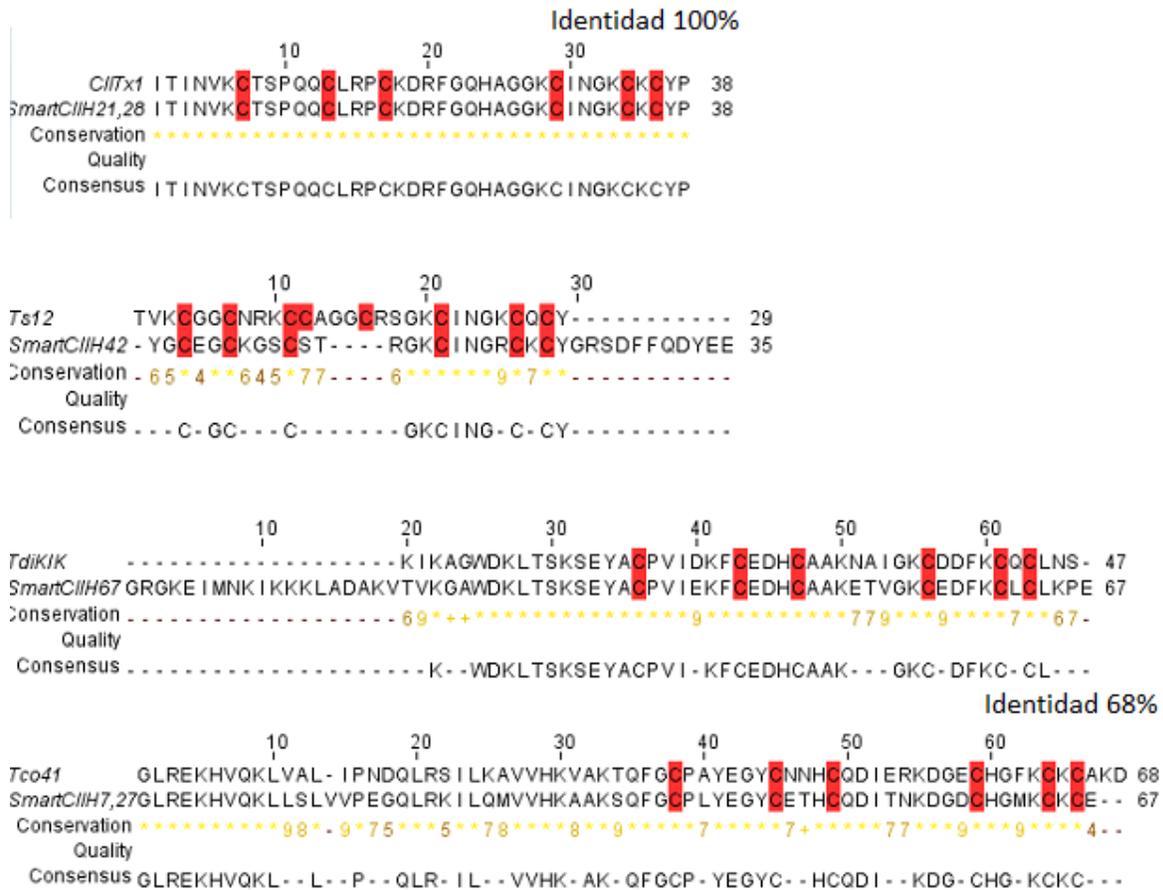


Figura 20 Alineamiento de las secuencias correspondientes a toxinas de potasio encontradas en la biblioteca de la glándula venenosa de hembras de *C. limpidus*. Las secuencias denominadas como SmartCIH son de la genoteca de hembras, el número corresponde a la clona. CIITx1: KScTx de *C. limpidus*; Ts12: KScTx de *Tityus serrulatus*; TdiKIK: KScTx de *T. discrepans*; Tco41: KScTx de *T. costatus*.

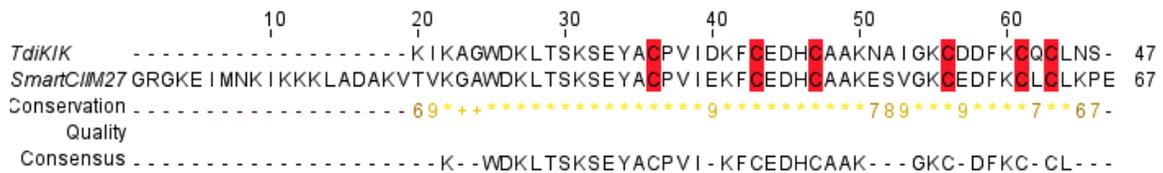


Figura 21. Alineamiento de las secuencias correspondientes a toxinas de potasio encontradas en la biblioteca de la glándula venenosa de machos de *C. limpidus*. Las secuencias denominadas como SmartCIIM son de la genoteca de machos, el número corresponde a la clona. TdiKIK: KScTx de *T. discrepans*;

Se encontraron toxinas de potasio ya descritas para *C. limpidus*, tal es el caso de las clonas 21H y 28H que son idénticas a la alfa-toxina de potasio ClITx1. Cabe destacar que se han encontrado toxinas de potasio de cadena larga como son las clonas 27M y 67H que son similares a la beta-toxina TDiKIK de *Tityus discrepans*. También encontramos la clona 7H y 27H que corresponden a la Tco41 de *Tityus costatus*.

Como tercer componente importante del veneno encontramos a los péptidos antimicrobianos, los cuales se encontraron tanto en hembras (Fig. 22) como en machos (Fig. 23).

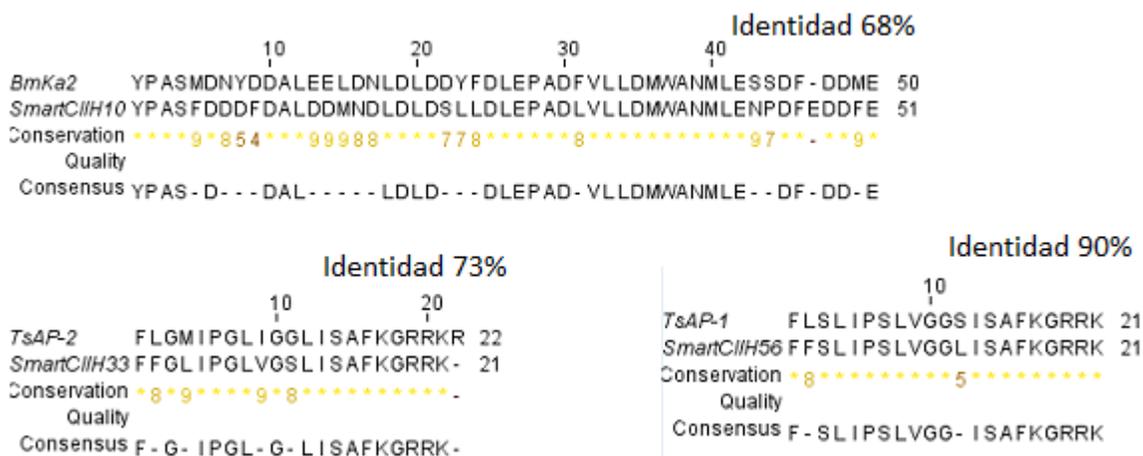


Figura 22. Alineamiento de las secuencias correspondientes a péptidos antimicrobianos encontradas en la biblioteca de la glándula venenosa de hembras de *C. limpidus*. Las secuencias denominadas como SmartCIIH son de la genoteca de hembras, el número corresponde a la clona. Bmka2: péptido antibacterial ácido de *Mesobuthus martensii*; TsAP-2: péptido antimicrobiano 2 de *T. serrulatus*; TsAP-1: péptido antimicrobiano 1 de *T. serrulatus*.

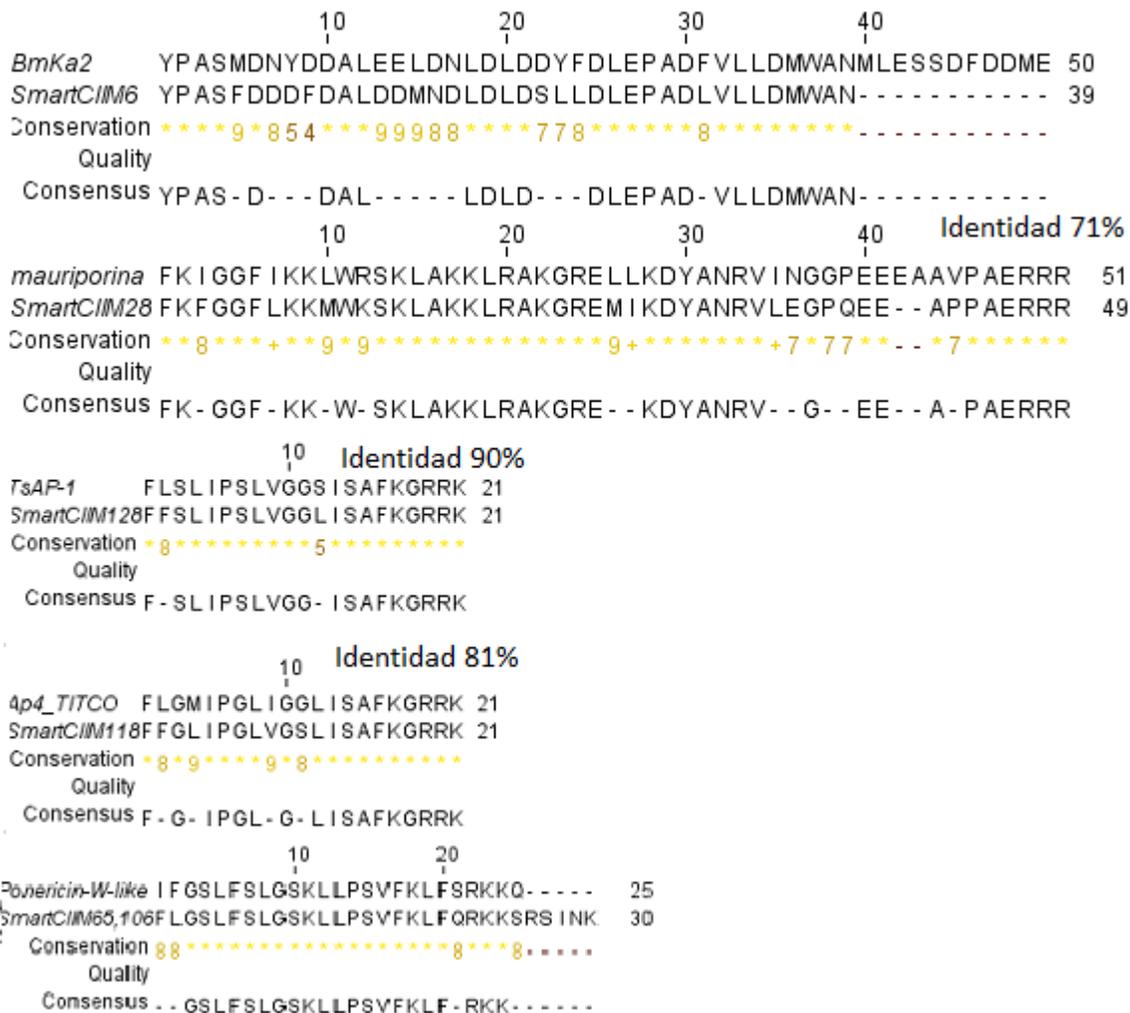


Figura 23. Alineamiento de las secuencias correspondientes a péptidos antimicrobianos que se encontraron en la biblioteca de la glándula venenosa de machos de *C. limpidus*. Las secuencias denominadas como SmartCIIM son de la genoteca de machos, el número corresponde a la clona. Bmka2: péptido antibacterial ácido de *Mesobuthus martensii*; TsAP-1: péptido antimicrobiano 1 de *T. serrulatus*; Mauriporin: péptido antimicrobiano de *Androctonus mauritanicus*; Ponericin-W-like: péptido antimicrobiano insecticida de *Lychas mucronatus*; Ap4-TITCO: putativo péptido antimicrobiano de *T. costatus*.

Se han identificaron diferentes tipos de posibles péptidos antimicrobianos: cortos, como las clonas H33, H56, M65, M106, M118 y M128. Cabe mencionar que las clonas M65 y M106 se pueden alinear con péptidos que son cortos y multifuncionales, debido a que son antimicrobianos e insecticidas. Sin embargo, no son los únicos porque los péptidos con los que se alinea la clona M28, se han reportados manifestar actividades citotóxica y antimicrobiana.

Previamente se había descrito una defensina que es un péptido antimicrobiano en la hemolinfa del alacrán *C. limpidus* (Rodríguez de la vega, 2004), no obstante, esta es la primera evidencia de que la glándula venenosa de *C. limpidus* produce precursores que codifican para péptidos antimicrobianos de diferentes familias.

También se han encontrado componentes que presentan identidad con proteínas musculares, proteínas hipotéticas, proteínas vesiculares, serina proteasas, metiltransferasas, entre otras (Tabla 8)

Tabla 8. Secuencias peptídicas obtenidas a partir de las librerías realizadas a partir del ARN de la glándula venenosa de machos y hembras del alacrán *C. limpidus*.

Muestra/clona	Secuencia	Similitud	Identidad/ expectancia
Macho/ SmartCIIM94	KGVCSTHKSFDLSSNRRKPDWFLS	Proteína hipotética [Opisthacanthus cayaporum] Sequence ID: emb CAX51406.1	91% / 7E-31
Macho/ SmartCIIM96	KEVQDEKRIFGGRFANPGEFPWMVF IRLTDELNCSGFLISPSYVLTAHCM RPLEEMWAKIGTVDREEGQEYRFQS SRVHPDYSNLTYHGDIALLKLTSPVV FDQNINRICLANDRNFYRGNTPL	Serina proteasa [Hottentotta judaicus] Sequence ID: gb ADY39513.1	69% / 9E-59
Macho/ SmartCIIM97	SGINAEPLGRPLELFMCSVLKRQGY GEGFRWLAQYI	sar1, isoforma B [Drosophila melanogaster] Sequence ID: ref NP_651025.1	Macho/ SmartCIIM97

Continuación tabla 8.

Muestra/clona	Secuencia	Alineamiento
Macho/ SmartCIIIM107	MASRGPAYGLSAQVANKLASKRDP ELENEIVHWIQEI MGQKLPNGPYEEVLRDGTVLCNLMNKLMPGCIQKIN TSGGQFKMMENINRFQEAAKKYGVPEIDVFQTVDLW ERRNIPQVTQCLMALGRACYTHPEYQGPCLGPKPS EENKRTFTEEQLRAGEGIINLQYGTNKGATQSGQNF GNTRHM	posible proteína muscular [Hottentotta judaicus] Sequence ID: gb ADY39534.1
Hembra/Smart CIIH1	MKKFRLDCLAAMERIREDRPITIKDDKGNTSKCIADIV SLFITIIDKLRLEIRAMDELPPDLKELNETMSRSLI	Proteína vacuolar VPS28, putativa [Ixodes scapularis] Sequence ID: ref XP_002402690.1
Hembra/Smart CIIH30	MKVLCLLLIVAFVQLSKQDPCHWREMDLCAATGLLA LQNNPVPQNEAEIDTQCTYLKETVDCANNYTNKCAT PLYKQLISFATAESQENLKGFCPTGNELRKTLKHSS CLAEVWNEQAACCTTDARAAIEKISSVEPRDRLNLAC CTYRRFRLCGTSYVEKKCGAEARDFVLNLSHSS	Proteína de saliva Sal4 [Rhipicephalus annulatus] Sequence ID: gb AGR45927.1
Hembra/Smart CIIH51	MCDDDVAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSI VGRPRHQGVVMVGMGQKDSYVGDEAQS KRGILTLY PIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLT EAPLNPKANREKMTQIMFETFNT PAMYVAIQAVLSLY ASGRTTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYA	actina, parcial [Scytodes thoracica] Sequence ID: gb AIW62600.1

De una forma general se observó que la distribución en los precursores identificados en hembras y machos es variable (figura 24), ya que existen ciertas particularidades: una de ellas es la proporción de toxinas de potasio encontradas; sin embargo, aún falta secuenciar más clonas para obtener resultados concluyentes.

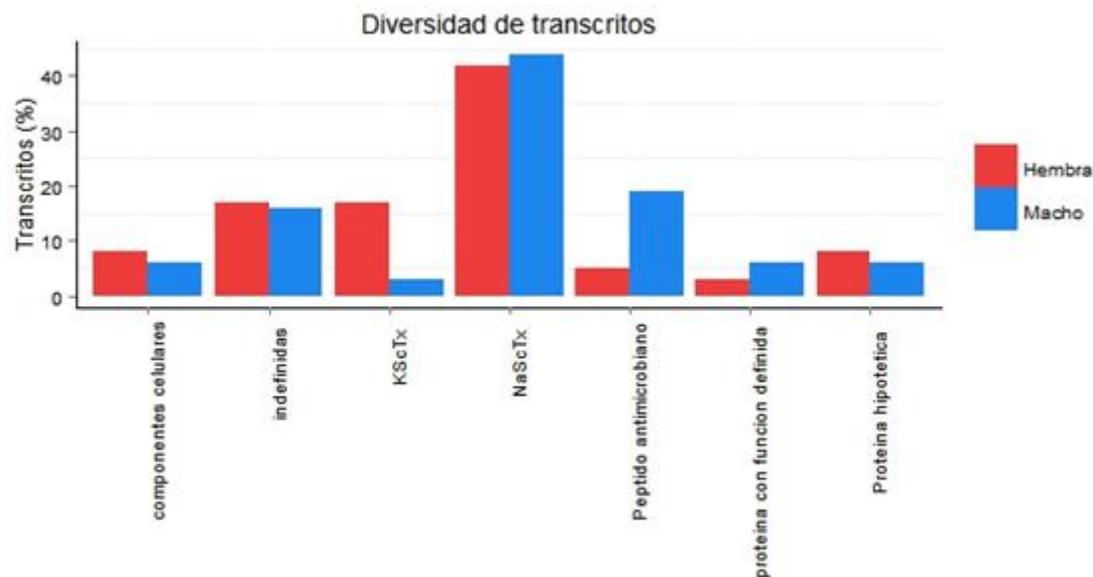


Figura 24. Proporción relativa de las secuencias obtenidas de las bibliotecas de ADNc de las glándulas venenosas del alacrán *C. limpidus*.

En la figura 24 se muestra una clasificación general de las secuencias identificadas de las glándulas venenosas al igual que en otros alacranes de la familia Buthidae las toxinas de sodio se encuentran en mayor proporción (Rendon-Anaya, 2012, Ruiming, 2010, Valdez-Velazquez, 2013, Diego-Garcia, 2014). En esta comparación es evidente que las hembras presentaron mas transcritos codificantes para KScTx y los machos presentan mas transcritos con identidad a péptidos antimicrobianos, sin embargo el tamaño de la librería solo nos permite observar una pequeña fracción de la diversidad de los transcritos, aun asi la diversidad de las KScTx que observamos aquí puede estar dada por la selección de las toxinas hacia ciertas presas, pero para corroborar estos datos es necesario profundizar estos análisis en *C. limpidus* usando otras estrategias.

8.- Discusión

En la literatura se describe que en muchos animales existe una diferenciación morfológica entre hembras y machos, como se describe en los trabajos sobre arácnidos de Carlson, 2014, Fox, 2015. Inclusive se ha demostrado que estos animales tienden a cambiar su comportamiento (Webber, 2013) desde los hábitos de cacería, la práctica de canibalismo del macho durante el apareamiento (Rabaneda-Bueno, 2008). Se asume que esto ocurre, porque en la etapa reproductiva implica un gran costo energético para las hembras. Estos cambios de comportamiento al parecer garantizan el éxito del desarrollo y supervivencia de la descendencia. Por estas circunstancias se planteó la hipótesis de que existen diferencias entre la composición del veneno de hembras y machos, ya que es una herramienta para cazar y defenderse de sus predadores, por lo que significaría una cacería con mayor probabilidad de ser exitosa.

Este trabajo se realizó con alacranes *C. limpidus*, que tienen una amplia distribución, abarcando 6 estados (Ponce-Saavedra, 2009), entre estos destacan el estado de Morelos y Guerrero, debido a su alta incidencia en cuanto a intoxicaciones por picadura de alacrán (SUIVE, 2013).

Por estas razones, este alacrán ha sido objeto de estudio, desde diferentes enfoques. En este caso se plantea la hipótesis de que existen diferencias en el veneno de hembras y machos de este alacrán. Se ha reportado que en otros alacranes de la familia Buthidae presentan diferencias en sus venenos, desde que encuentren péptidos únicos para uno de los géneros, (Yamaji, 2004), como que presenten diferencias en cuanto a toxicidad o antigenicidad (De souse, 2010). Recientemente se ha realizado un trabajo comparativo entre machos y hembras de *Rhopalurus*, en donde se hace una comparación con mayor profundidad y se ha demostrado que en este alacrán existen diferencias de alrededor de 63% (Rodríguez-Ravelo, 2015).

En este trabajo se realizó una comparación entre los componentes de los venenos de hembras y machos del alacrán *C. limpidus*, considerando la aplicación de dos distintas metodologías analíticas, la proteómica y la transcriptómica.

Para la parte proteómica se usaron dos metodologías diferentes para la separación de los componentes, y posteriormente se analizaron una respecto a la otra. En la primera estrategia (separación directa del veneno por RP-HPLC) se identificaron en total 61 masas para machos y 58 masas para las hembras (tabla 1), en este análisis la diferencia de componentes se encuentra alrededor del 40% de los componentes, es decir, componentes identificados solo en las hembras o en los machos. En la segunda estrategia que fue por exclusión molecular, se obtuvieron tres fracciones, la primera fracción se separó por electroforesis bidimensional, la segunda y tercera fracción se separaron por RP-HPLC. Los péptidos de alto peso molecular que se encontraron en la primera fracción, se separaron 20 manchas de hembra y 20 manchas de macho (figura 15), que tienen similitud con tripsina, serina proteasas, metaloproteasas, hialuronidasas y CAP (tabla 4). Cabe mencionar que una gran proporción de los machos corresponden a alérgenos/CAP y metaloproteasas. En esta sección no podemos hacer una comparación propiamente por secuencias. Sin embargo, su distribución es similar en hembras y machos, con excepción de las hialuronidasas que se encuentran mayormente distribuidas en los machos

En la segunda fracción se obtuvieron en total 41 péptidos en hembras y 59 péptidos en machos, estos corresponden a los péptidos de mediano peso molecular (tabla 5).

En la tercera fracción solo se lograron identificar dos masas para los machos que corresponden a péptidos (tabla 6); sin embargo, se observaron componentes que no son de origen peptídico, los cuales no se pudieron identificar.

Con el fin de incrementar la identificación de los péptidos del veneno, se consideraron todos los péptidos obtenidos para realizar la comparación. Al conjuntar los datos se identificaron 93 componentes para machos y 81 para hembras mas del 45% de los componentes son diferentes entre machos y hembras. Estas diferencias posiblemente sean por la abundancia relativa de los componentes, y por esta razón, algunas no las podemos detectar.

Por otra parte, se realizó un estudio de los transcritos presentes en la glándula venenosa de hembras y machos para complementar la información que obtuvimos por proteómica. A pesar de que el tamaño de la librería no fue representativo, podemos estimar una idea general de la diversidad de transcritos (figura 30). Este análisis mostró que las secuencias de los transcritos tienen identidad con toxinas de otros alacranes previamente descritas las cuales se sabe que afectan canales iónicos, principalmente de sodio y potasio. Estos transcritos están en mayor proporción y este fenómeno se ha descrito en otros alacranes de la familia Buthidae (Rendón-Anaya, 2012, Ruiming, 2010, Valdez-Velázquez, 2013, Diego-García, 2014). También se obtuvieron secuencias parciales de serina proteasas y otras proteínas celulares (tabla 7).

Es posible que las diferencias observadas estén relacionadas con el papel biológico en las hembras. Como ya se mencionó, en términos de que el costo energético para desarrollar la descendencia es muy alto, es posible que sólo sintetice con cierta prioridad los péptidos que incrementan el éxito en la cacería.

Finalmente, una de las perspectivas planteadas para este trabajo fue realizar RNA-seq de la glándula venenosa de este alacrán, tomándose en cuenta los datos preliminares del RNA-seq, los datos encontrados en esta tesis, y los datos conocidos de la literatura, hemos incluido secuencias más relevantes en dos tablas que resumen todo el conocimiento actual sobre esta especie de alacrán. Si tomamos de forma conjunta las toxinas o péptidos que presentan características correspondientes a las toxinas que reconocen a canales de sodio, tanto de machos como de hembras encontramos 40 de estos péptidos (Tabla 9).

De manera similar, si conjuntamos todo lo que se sabe y lo que determinamos en esta tesis sobre péptidos que corresponden a toxinas que se unen a canales de potasio encontramos 23 péptidos como se muestra en la Tabla 10.

De esta forma, pensamos que el trabajo realizado en esta tesis contiene información relevante para el conocimiento de los péptidos tóxicos a humanos, presentes en este veneno. Esto es fundamental si queremos utilizar esta información para el desarrollo de posibles anti-venenos eficaces en contra de la picadura de *C. limpidus*, o si eventualmente alguno de estos componentes pueda ser utilizado como modelo para el desarrollo de posibles fármacos.

Tabla 9. Secuencias de NaScTx de *C. limpidus*.

Identificador	Péptido señal	Péptido maduro	Observaciones
Alfa-NaScTx			
comp25788_c0	MKYSISIAVFCLLALEAESR	KDGYPVNSGNCKYECWNDDKCVDLCKKRGATKGYCYRRNVSCYC QGLPDNEPIMKSGRCNPGGGRRKTAGKRK	Putativa-RNAseq
comp45272_c0_seq1	MNYFVLIFVAALLMLGVNC	KKDAYPVDGSNCRYPCWRNAYCDELCKERKAESGYCYTWSLWCW CIGLADDTPTQVNAGCAPSGK	Putativa-RNAseq
comp46036_c0_seq2	MNYFILSLVAALLILHVNCI	KNDYPVDENGCKIACQENAPCAAACKFNKAE GGVC PWSYRCWCY G LPDSVTTEENCKGKRK	Putativa-RNAseq
comp46764_c0	MNSIFVVALTILLGIERSES	RDGYPIASNGCKFGCSGLGENNPTCNHVCEKKAGSDYGYCYWWTC YQHVVAEGTVLWGD SGTGPCMS	Putativa-RNAseq
comp48307_c0_seq1	MKRFILFISCLMVIGVVES	KDGYPIDSNGCTFRCDILINDCDTVCESRKANNGTCS SSNLACYCEG LPSDADVSDPTKNDCS	Putativa-RNAseq
comp48549_c0_seq2	MNYFILLFVATFLLLDVNC	KKDGYPVDANKCKFECWK NAYCDKLCCKDKRAESGYCYGWNLS CYC EGLPDDEPIKTSDRCYGTR	Putativa-RNAseq
comp50676_c0_seq2	MKFLLLIALTCLLALGVEC	KKEGYPVDSGNCMYECLRDKYCNDLCLERKADSGYCYLGKFSCYC YGLPDNSPTKTSDRCNPAK GK	Putativa-RNAseq
comp50676_c0_seq1	MKFLLLIALTCLLALGVEC	KKDGYIVDSGNCKYECLRDDYCKDMCLKRKADDGYCFLGKFSCYCY GLPDNSPIKTS GKCKGK	Putativa-RNAseq
SmarrH17	MNSIFAIALTILLGIERSES	RDGYPIASNGCKFGCSGLGENNPTCNHVCEKKAGSDYGYCYAWTC YCEHVAEGTVLWGD PGTGPRMT	Putativa-genoteca

Continuación tabla 9

Identificador	Péptido señal	Péptido maduro	Observaciones
SmartH38	MNSIFVVALTILLGIARSEL	RDGYPLASNGCKFGCSGLGENNPTCNKICDEKAGSDYGYCYWWTCYC QHVAEGTVLWGDSTGPCMS	Putativa-genoteca
SmartM109	MKSIFAVALTILLGIERSES	RDGYPIASNGCKFGCSGLGENNPTCNHVCEKKAGSDYGYCYAWTCYC QHVAEGTVLWGDPTGPCMT	Putativa-genoteca
Beta-NaScTx			
CII1		KEGYLVNKSTGCKYGCFWLGNENCDKECKAKNQGGSYGYCYSFAC WCEGLPESTPTYPLPNKSCS	Caracterizada
CII1m		KEGYIVNLSTGCKYECYKLGDN DYCLRECKQQYGKGAGGYCYAFGCW CTHLYEQAVVWPLPKKTCT	Caracterizada
CII2		KEGYLVNHSTGCKYECFKLGDNDYCLRECKQQYGKGAGGYCYAFGC WCNHLIEQAVVWPLPKKTCN	Caracterizada
CII2b	MNSLLMITACLALVGTWVA	KEGYLVNHSTGCKYECYKLGDN DYCLRECKQQYGKGAGGYCYAFGC WCTHLYEQAVVWPLPKKTCNGK	Putativa-reportada
CII3	MNSLLMITACLAVIGTVW A	KEGYIVNYYDGCKYACLKLGENDYCLRECKARYYKSAGGYCY AFACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCYGK	Putativa-reportada
CII4	MNSLLMITACLALIGTVW A	KEGYIVNYHDGCKYECYKLGDN DYCLRECKLRYGKGAGGYC YAFGCWCTHLYEQAVVWPLPKKRCNGK	Putativa-reportada
CII5b	MNSLLMITACLAEIGTVW A	KEGYLVNKSTGCKYGCFWLGNENCDKECKAKNQGGSYGYC YSFACWCEGLPDSTPTYPLPNKSCSKK	Putativa-reportada
CII5c	MNSLLMITACLVLFGTVW A	KEGYLVNKSTGCKYGCFWLGNENCDMECKAKNQGGSYGY CYSFACWCEGLPDSTPTYPLPNKSCSKK	Putativa-reportada

Continuación tabla 9

Identificador	Péptido señal	Péptido maduro	Observaciones
CII5c*	MNSLLIITACLVL FVWA	KEGYLVNKSTGCKYGCFWLGKNENCDMECKAKNQGGSYGYCYS FACWCEGLPDSTPTYPLPNKSCSKK	Putativa-reportada
CII6	MNSLLMIIGCLV LIGTVWT	KEGYLVNMKTGCKYGCYELGDNGYCDRKCKAESGNYGICYTVG CWCEGLPNSKPTWPLPGKSCSGK	Putativa-reportada
CII7	MNSLLMITACLV LFGTVWA	KEGYLVNTYTGCKYICWKLGENKYCIDECKEIGAGYGYCYGFGCY CEGFENKPTWPLPNKTCGRK	Putativa-reportada
CII8	TVSA	KEGYLVKKSNGCKYECFKLGENEHCDTECKAPNQGGSYGYCDTF ECWCEGLPESTPTWPLPNKSCGKK	Putativa-reportada
CII9	MNSLLMITACLIL IGTVWA	EDGYLFDKRKRCTLACIDKTGDKNCDRNCKKEGGSFGHCSY SAC WCKGLPGSTPISRTPGKTCKK	Putativa-reportada
comp13804_c0_seq1	MFKSFIFASLLL MCIKVDA	DDIPAGYPINSFGCIYLCYYGPEEIKCEQFCKYLGGSYGYCYFYAC YCEYLSETVPQIKNQKYFGCSNGQWKITTEKP	Putativa-RNAseq
comp48346_c0_seq1	MLNTLISLFLVVA VSLLTYVNVE	GTEVPGGYPVNRFNCTYPCYYGEDEEQCQQFCTLLKGGFGYCY MYTCYCERLPESVKQIKKFKISGCSNGSWDITSVTKLYGSSR	Putativa-RNAseq
comp49479_c0_	MFKILILAAIFLM FVAIEVEA	DVNGFLVNKNGCVYPCKSDESGNKKCHKRCYILGGSRGYCKLYN CYCEGLPVDVKTVKSFTYSPCTTSGN GGQIKYANA IQEFSLNKLYF KK	Putativa-RNAseq
comp49865_c0_seq3	MKVLILIIASVLLI GVEC	KDGYPVDNKGCKISCVISGKFCDTECKMRKASSGYCYSLSCYCEG LPENAKVSGKATSTCGGK	Putativa-RNAseq

Continuación tabla 9

Continuación tabla 9

Identificador	Péptido señal	Péptido maduro	Observaciones
comp49865_c0_seq4	MKVLILIIASVLLIGVE C	KEGYPMNSKGCKIGCVIGNTFCDTECKMLKASSGSCWTFGL ACWCKGLPEDVEVWDSATNKCGGK	Putativa-RNA seq
comp50566_c3_seq1	MKFLILIVASLVIVGV QS	KDGYPMDHKGCKISCVINNQYCETECVKVLKGKKGYCYFWK LACYCEGLPNWAKVWDRATNKCRAN	Putativa-RNA seq
comp50566_c3_seq3	MKFLILIVASLMIIGV QS	KDGYPMNHEGCKESCLINNRYCEIICVDFMKAKKGYCYFWKL ACYCEGLPDWAKVWERATNKCRAN	Putativa-RNA seq
comp50566_c3_seq4	MKLLILILASLMRLGV QN	KDGYAMRSDGCTIPCLFDNSFCNRKCIEQKGKSGYCYFLKQ SCYCAQLPDDKVYPSATNKCRAN	Putativa-RNA seq
comp51743_c1_seq4	MIITACLALIGTVWA	KKDGYLVDKTGCKYTCWKLGENKYCNRECTWKHRGGNYGY CYGFGCYCEGLADSTQTWPLPNKRCGKK	Putativa-RNA seq
comp113382_c0_seq1	MKTATIVILTVLLIGV QA	KDGYLINEDYCRYRCWNLGKNTYCNNLCLTNGGKFGYCYRF SCYCEKLPDITYTIWGEPTPTCGHASD	Putativa-RNA seq
comp128707_c0_seq1	MKIVVLFCLVGTVV A	VRRHGYILMDGKPMCECPMEEERFLEQGTDYCDLKCKERGA KTGVCCYGGCYCYDIEDDEKVV DVSRFRSKLCKYLTEV	Putativa-RNA seq
SmartM2	MNSLLMITACLALIV WA	KEGYLVNHSTGCKYECYKLGDN DYCLRECKQQYGKGAGGY CYAFGCWCTHLYEQAVVWPLPKKTCTGK	Putativa-genoteca
SmartH8	MKTFVLALCLVLIGM VYA	KDGYLVS RNDGCKLSCAPMIGDRFCHIECTSMNHRGDEGYC YLLGCYCRGMPEDA EVYPLPNKSCGK	Putativa-genoteca

Continuación tabla 9

Identificador	Péptido señal	Péptido maduro	Observaciones
SmartM9	MNSLLMIIACLVLIGTVWA	KKDGYLVNKYTGCKVNCYKLGENKFCNRECRACKHRGGDYGYCY GFGCYCEGLADSTETWPLSNKRCGKK	Putativa-genoteca
SmartH46	MNSLLMINACLALIGTVW A	KEGYIVNYHDGCKYECYKLGDN DYCLRECKARYGKRAGGYCYAF GCWCTHLYEQAVVWPLPKKRCNGK	Putativa-genoteca
SmartM105	MNSLLMITACLALIGTVW A	KEGYLVDYHTGCKYTCAKLGDN DYCVRECRRLRYQSAHGYCYAF ACWCTHLYEQAVVWPLPNKRCKGK	Putativa-genoteca

Tabla 10. Secuencias de KScTx de *C. limpidus*.

Identificador	Péptido señal	Péptido maduro	Observaciones
Alfa-KScTx			
CIITx1		ITINVKCTSPQQCLRPCKDRFGQHAGGKCINGKCKCYP	Caracterizada
CIITx2		TVIDVKCTSPKQCLPPCKEYGRHAGAKCMNGKCKC	Caracterizada
comp35128_c0_seq2	MNKVYLVAFLVLSVLLVANVSPVEG	IPTGGCPVSDALCTKYCKSNKYGKSGKCTGPNKTTCKCSL	Putativa-RNAseq
comp41788_c0_seq1	MKFV FALLLLSILTITTVPTLVRG	SGQCQRDSDCQRECMTVDKCQYGT CYCKTTGK	Putativa-RNAseq
comp42306_c0_seq1	MMNLRFIILGVLLASGVCS	FARIDDEQARCNRLGKSCDSDSDCCRYGERCLSSGRKYVCKM DQGP	Putativa-RNAseq
comp42306_c0_seq2	MMNLRFIILGVLLANGVCS	FVDEQARCNLNGKPCDSDNDCCTYGERCLSSNGKDYFCSDP GP	Putativa-RNAseq
comp44432_c1_seq1	MKAVYGILILLFCSMFDLSQQ	TFINHKCKSSSECLPACKAAIGRASGKCINSTCKCYY	Putativa-RNAseq
comp50237_c0_seq1	MKAFYGILIIVLFCSMFNLSEE	VFIDKKCSSSSECWPACKKAVGTFQGGKCMNGGCKCYP	Putativa-RNAseq
comp54004_c4_seq3	MKAFYGILILLFCSMFNLNES	TVINVKCTSPKQCLPPCKEYGRHAGAKCMNGKCHCSKIG	Putativa-RNAseq
comp54004_c4_seq7	MKAFYGILILLFCSMFNLNES	TVINVKCTSPQQCLRPCKDRFGQHAGGKCINGKCKCYP	Putativa-RNAseq
comp54004_c4_seq2	MKV FYGILLIFVCSLYNLSQS	TIINEKCFATSQCFTPCKKAIGSLQSKCMNGKCKCYNIG	Putativa-RNAseq
comp54004_c4_seq8	MKAFYGILILLFCMFNLNES	IFIDVDCTVSKECWAPCKAAVGVDRGKCMGKKCKCYP	Putativa-RNAseq
comp54004_c4_seq11	MKV FYGILILLFCSMFNLQQ	TFIDVKCGSSKECWPPCKAAF GKARGRCMNKQCNC S	Putativa-RNAseq
Beta-KScTx			
comp36746_c0_seq1	MVAAGRRIWALLASLLLLHSLAEA	GRGKEIMNKIKKKLADAKVTVKGAWDKLTSKSEYACPVEKFCE DHCAAKETVGKCEDFKCLCLKPE	Putativa-RNAseq
comp108198_c0_seq1	MKFATLFPVFLVSTILVIDA	NHPLKWHPMRIKGGGHAGCSNSFKMSESNFCHKLCNSDGKSR LSKCIKNKCYCSTQLFPNII EI	Putativa-RNAseq

Continuación tabla 10

Identificador	Péptido señal	Péptido maduro	Observaciones
SmartCIIH7	MERKLAVLLLLLGMVALASC	GLREKHVQKLLSLVVPEGQLRKILQMVVHKAAKSQFGCPLYEGYCE THCQDITNKDGDCHGMKCKCE	Putativa-genoteca
Gamma-KScTx			
CIIErg1		DRDSCVDKSRCSKYGYQECQDCCKKAGHNGGTCMFFKCKCA	Caracterizada
CIIErg2		DRDSCVDKSKCSKYGYGQCDECCKKAGDRAGNCVYFKCKCNP	Caracterizada
CIIErg3		DRDSCVDKSKCSKYGYGQCDKCCCKKAGDRAGNCVYFKCKCNQ	Caracterizada
CIIErg4		DRDSCVDKSKCAKYGYGQCDECCKKAGDRAGNCVYFKCKCNQ	Caracterizada
comp40060_c0_seq1	MKNILLMILLSAFILNEVEL	AKDSCTHLKRCKGKYGFYKNCSECCREFGHEGGYCTMFKCKCKT	Putativa-RNAseq
comp52018_c2_seq2	MAGIAKITLILLFLFVTMDTFA	DWNAEANVACVHRTCDSNCKRNGYKSGKCINRKCNCYPHGK	Putativa-RNAseq

9.- Conclusiones

- Se han identificado diferencias en la diversidad de componentes de los venenos de machos y hembras de *C. limpidus*.
- Las diferencias encontradas en los venenos de machos y hembras aparentemente son cuantitativas.

9.1 Perspectivas

Realizar un análisis de expresión diferencial entre hembras y machos de *C. limpidus* para comprender mejor la razón de las diferencias que hemos observado en este trabajo.

10.-Bibliografía

Abdel-Rahman MA, Quintero-Hernández V, Possani LD. (2013). "Venom proteomic and venomous glands transcriptómico analysis of the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* (Arachnida: Scorpionidae). *Toxicon*, Nov;74:193-207.

Alagon, A.C., Guzman, H.S., Martin, B.M., Ramirez, A.N.,Carbone, E., and Possani, L.D. (1988). "Isolation and characterization of two toxins from the Mexican scorpion *Centruroides limpidus* Karsch". *Comp. Biochem. Physiol*, 89B, 153-162.

Almeida DD., Scortecci KC., Kobashi Ls., Agnez-Lima LF., Medeiros SRB., Silva-Junior AA., Junqueira-de-Azevedo ILM., Fernandes-Pedrosa MF. (2012). Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey., *BMC Genomics*, 13: 362.

Batista CVF., Del Pozo L., Zamudio FZ., Contreras S., Becerril B., Wanke E., and Possani, LD. (2004). Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis, *J. Chromatography*, B 803:55-66.

Botero, D., Restrepo, M. (2010). "Parasitosis humanas: incluye animales venenosos y ponzoñosos, y atlas en color al final", 4ed, Fondo editorial CIB, Medellin, Colombia.

Briggs, D.E.G. (1987). Scorpions take to the water. *Nature*, 326, 645:646.

Carlson BE., McGinley S., and Rowe Mp. (2014). Meek Males and Fighting Females: Sexually-Dimorphic Antipredator Behavior and Locomotor Performance Is Explained by Morphology in Bark Scorpions (*Centruroides vittatus*), *PlosOne*, 9(5): e 97648.

Corona, M., Gurrola, G.B., Merino, E., Cassulini, R.R., Valdez-Cruz, N.A., García, B., Ramírez-Domínguez, M.E., Coronas, F.I., Zamudio, F.Z., Wanke, E., Possani, L.D. (2002). "A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K⁺-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*". *FEBS Lett*, Dec 4;532(1-2):121-6.

Dehesa-Dávila, M., Ramírez, A.N., Zamudio, F.Z., Gurrola-Briones, G., Liévano A., Darszon A., Possani, L.D. (1996). "Structural and functional comparison of toxins from the venom of the scorpions *Centruroides infamatus*, *Centruroides limpidus* and *Centruroides noxius*". *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, Feb;113(2):331-9.

De Melo ET, Estrela AB, Santos EC, Machado PR, Farias KJ, Torres TM, Carvalho E, Lima JP, Silva-Júnior AA, Barbosa EG, Fernandes-Pedrosa Mde F. (2015). Structural characterization of a novel peptide with antimicrobial activity from the venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus*: Stigmurin. *Peptides*, jun; 68:3-10.

De souse L., Borges A., Vásquez-Suárez A., JM Op den Camp H., Chadee-Burgos RI., Romero-Bellorín M., Espinoza J., De Sousa-Insana L., Pino-García O. (2010). Differences in venom toxicity and antigenicity between females and males *Tityus nororientalis* (Buthidae) scorpions. *J Venom Res*; 1: 61–70.

Diego-García E, Peigneur S, Clynen E, Marien T, Czech L, Schoofs L, Tytgat J. (2012). "Molecular diversity of the telson and venom components from *Pandinus cavimanus* (Scorpionidae Laitreille 1802): transcriptoma, venomics and function". *Proteomics*, Jan; 12(2) 313:28.

Diego-García E., Caliskan F., Tytgat J. (2014). The Mediterranean scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones, Buthidae): transcriptome analysis and organization of the genome encoding chlorotoxin-like peptides, *BMC Genomics*, 15: 295.

Fox GA., Cooper AM., and Hayes WK. (2015). The Dilemma of Choosing a Reference Character for Measuring Sexual Size Dimorphism, Sexual Body Component Dimorphism, and Character Scaling: Cryptic Dimorphism and Allometry in the Scorpion *Hadrurus arizonensis*. *Plos One*, 10(3): e0120392.

Francke O., (1979). Observations on the reproductive biology and life history of *Megacormus gertschi* Diaz (Scorpiones, Chactidae, Megacorminae), *J. Arachnol*, 7 :223-230.

Guo X, Ma C, Du Q, Wei R, Wang L, Zhou M, Chen T, Shaw C. (2013). "Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: evaluation of their antimicrobial and anti-cancer activities" *Biochimie*, Sep;95(9):1784-94.

Jover E, Couraud F, Rochat H. (1980). Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes, *Biochem Biophys Res Commun*, Aug 29;95(4):1607-14.

Lebreton, F., Delepierre, M., Ramírez, A.N., Balderas, C., Possani, L.D. (1994) "Primary and NMR three-dimensional structure determination of a novel crustacean toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch". *Biochemistry*, Sep 20;33(37):11135-49.

Luna-Ramírez K, Quintero-Hernández V, Juárez-González VR., Possani LD. (2015). Whole Transcriptome of the Venom Gland from *Urodacus yaschenkoi* Scorpion PLoS One. 10(5): e0127883.

Ma Y., Zhao R., He Y., Li S., Liu J., Wu Y., Cao Z., Li W. (2009). Transcriptome analysis of the venom gland of the scorpion *Scorpiops jendeki*: implication for the evolution of the scorpion venom arsenal, BMC Genomics, 10: 290.

Ma Y, Zhao Y, Zhao R, Zhag W, He Y, Wu Y, Cao Z, Guo L, Li W. (2010). “Molecular diversity of toxic components from the scorpion *Heterometrus petersii* venom revealed by proteomic and transcriptoma analysis”. Proteomics, Jul;10(13):2471-85.

Martin, B.M., Ramirez, A.N., Gurrola, G.B., Nobile, M., Prestipino, G., Possani, L.D. (1994) “Novel K (+)-channel-blocking toxins from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch”. Biochem J. Nov 15;304 (Pt 1):51-6.

Morgenstern D., Rohde BH., King GF., Tal T., Sher D., Zlotkin E. (2011). “The tale of a resting gland: transcriptome of a replete venom gland from the scorpion *Hottentotta judaicus*”, Toxicon, Apr;57(5):695-703.

Ortiz E, Gurrola G, Schwartz E, Possani LD. (2014)..“Scorpions venom components as potential candidates for drug development” doi: 10.1016/J.toxicon, 11.233.

Pekár S., Martisova M., Bilde T. (2011). Intersexual Trophic Niche Partitioning in Ant-Eating Spider (Araneae: Zodariidae), PloS One, 6(1): e14603.

Polis, G.A. (1990). The biology of scorpions, Stanford University Press, USA.

Ponce–Saavedra, J., Francke, O., Cano–Camacho, H., y Hernández–Calderón, E. (2009). Morphological and molecular evidence supporting specific status for *Centruroides tecomanus* (Scorpiones, Buthidae) Rev. Mex. Biodiv, 80:1

Possani, L.D., Becerril, B., Delepierre, M., Tytgat, J. (1999). Scorpion toxins specific for Na⁺-channels Eur. J. Biochem.264, 287-300 .

Pringos E., Vignes M., Martinez J., Rolland V. (2011). “Peptide Neurotoxins That affect Voltage-Gated Calcium Channels: A Close-Up on ω -Agatoxins”, *Toxins*, 3,17-42.

Quintero-Hernández V., Jiménez-Vargas JM., Gurrola GB., Valdivia HH., Possani LD. (2013). “Scorpion venom components that affect ion-channels function”, *Toxicon* Dec 15;76:328-342.

Quintero-Hernández V., Ramírez-Carretero S., Romero-Gutiérrez MT., Valdez-Velázquez LL., Becerril B., Possani LD., Ortiz E. (2015). Transcriptome Analysis of Scorpion Species Belonging to the *Vaejovis* Genus, *PLoS One*. 10(2): e0117188.

Rabaneda-Bueno R., Rodríguez-Gironés MA., Aguado-de-la-Paz S., Fernández-Montraveta C., De Mas E., Wise DH., and Moya-Lraño J. (2008). Sexual Cannibalism: High Incidence in a Natural Population with Benefits to Females, *Plos One* 3(10): e3484.

Ramírez, A.N., Martin, B.M., Gurrola, G.B., Possani, L.D. (1994). “Isolation and characterization of a novel toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch”. *Toxicon*. Apr;32(4):479-90.

Rendón-Anaya, M., Delaye, L., Possani, L.D., Herrera-Estrella, A. (2012). “Global transcriptome analysis of the scorpion *Centruroides noxius*: new toxin families and evolutionary insights from an ancestral scorpion species”. *PLoS ONE*, vol.8, issue 8 e43331, 12 pages.

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

Rodríguez de la Vega RC, Possani LD. (2005). “Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity structure – function relationships and evolution”. *Toxicon*, Dec15;46(8):831-44.

Rodríguez-Ravelo R, Batista CV, Coronas FI, Zamudio FZ, Hernández-Orihuela L, Espinosa-López G, Ruiz-Urquiola A, Possani LD. (2015). Comparative proteomic analysis of male and female venoms from the Cuban scorpion *Rhopalurus junceus*, *Toxicon*, Dec1;107(Pt B):327-34.

Roeding F., Borner J., Kube M., S., Reinhardt R., Burmester T. (2009). "A 454 sequencing approach for large scale phylogenomic analysis of the common emperor scorpion (*Pandinus imperator*)", *Mol Phylogenet Evol*, Dec;53(3):826-34.

Santibáñez-López CE, Possani LD. (2015). Overview of the Knottin scorpion toxin-like peptides in scorpion venoms: Insights on their classification and evolution. *Toxicon*,. Dec 1;107(Pt B):317-26.

Santibáñez-López CE, Francke OF, Ureta C, Possani LD. (2016). Scorpions from México: From Species Diversity to Venom Complexity, *Toxins* (Basel), Jan; 8(1): 2.

Schwartz, E.F., Diego-Garcia, E., Rodriguez de la Vega, R.C., Possani, L.D. (2007). Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). *BCM Genomics* 8:119.

Schweitz H., Heurteaux V., Bois P., Moinier D., Romey G., Lazdunski M. (1994). "Calcicludine, a venom peptide of the Kunitz-type protease inhibitor family, is a potent blocker of high-threshold Ca²⁺ channels with a high affinity for L-type channels in cerebellar granule neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 91;88-882.

Valdez-Velázquez LL., Quintero-Hernández V., Romero-Gutiérrez MT., V. Coronas FI., Possani LD. (2013). Mass Fingerprinting of the Venom and Transcriptome of Venom Gland of Scorpion *Centruroides tecomanus*, *PLoS One*, 8(6): e66486.

Valdivia HH, Fuentes O, el-Hayek R, Morissette J, Coronado R. (1991). "Activation of the ryanodine receptor Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum by a novel scorpion venom". *J. Biol Chem*, Oct 15;266(29):19135-8.

Webber MM., Rodríguez-Robles JA. (2013). Reproductive tradeoff limits the predatory efficiency of female Arizona Bark Scorpions (*Centruroides sculpturatus*) BMC Evol Biol 13:197.

Wheeler KP, Watt DD, Lazdunski M. (1983). Classification of Na channel receptors specific for various scorpion toxins. Pflugers Arch. Apr;397(2):164-5.

Yamaji, N., Dai, L., Sugase, K., Andriantsiferana, M., Nakajima, T., Iwashita, T. (2004). Solution structure of IsTX A male scorpion toxin from *Opisthacanthus madagascariensis* (Ischnuridae), Eur. J. Biochem. 271, 3855–3864.

Zhao R., Ma Y., He Y., Di Z., Wu Y., Cao Z., Li W. (2010). Comparative venom gland transcriptome analysis of the scorpion *Lychas mucronatus* reveals intraspecific toxic gene diversity and new venomous components, BMC Genomics. 11: 452.

Anexo 1

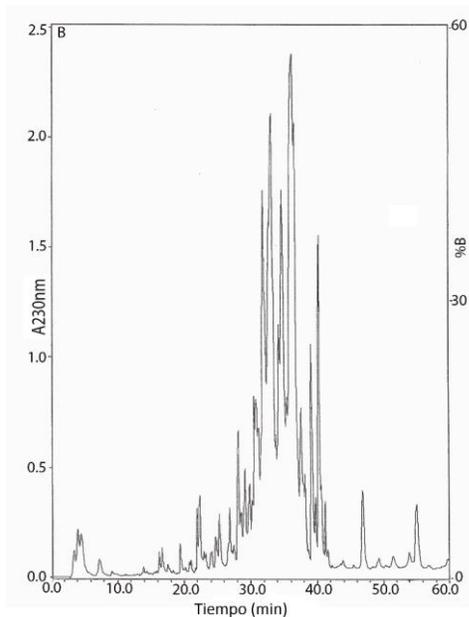


Figura S1. Cromatograma de fase reversa del veneno de *C. limpidus* hembras aplicado al HPLC en las condiciones descritas en **Materiales y Métodos**. La cantidad de muestra aplicada fue 2.41 mg.

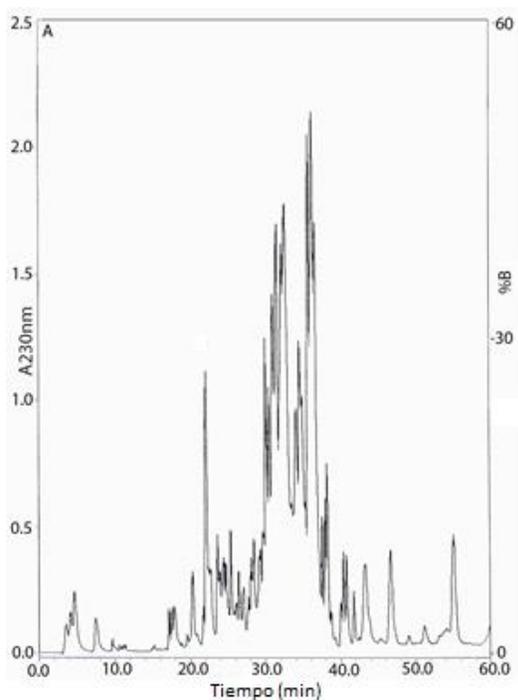
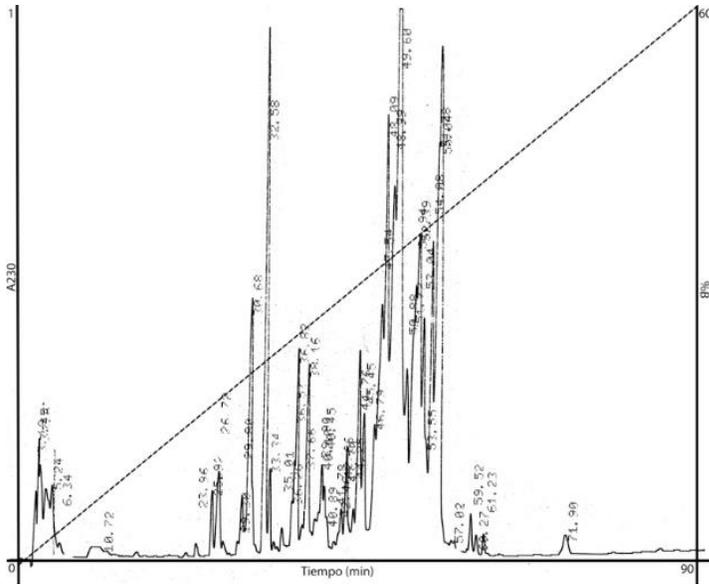


Figura S2. Cromatograma de fase reversa del veneno de *C. limpidus* machos en las mismas condiciones de la Fig.9. La cantidad aplicada fue 2.08 mg.



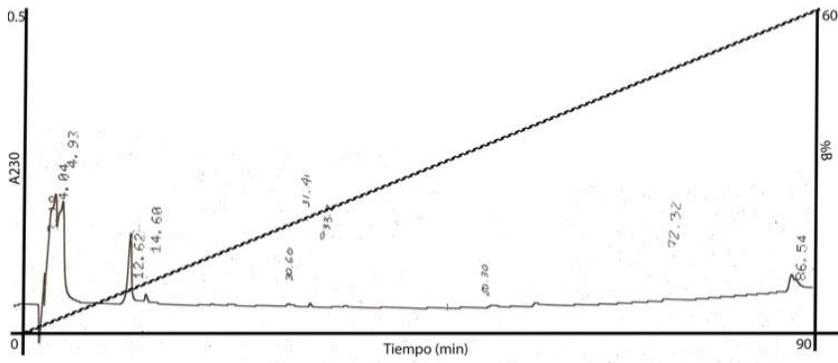


Figura S5. Cromatograma de fase reversa de la Fracción III de *C. limpidus* hembras en las mismas condiciones de las anteriores

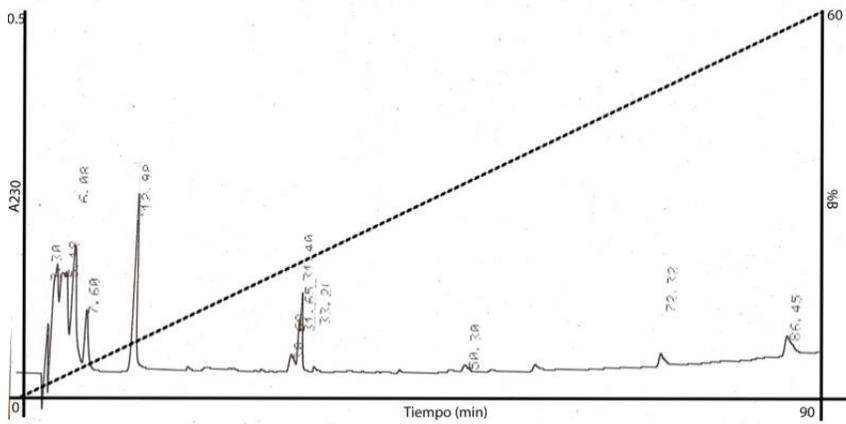


Figura S6. Cromatograma de fase reversa de la fracción III de *C. limpidus* machos en las mismas condiciones que las anteriores.

Purificación de ARN a partir de la glándula venenosa usando el kit SV Total RNA Isolation System ® Promega

Obtención de la muestra

1. Limpiar el exterior del alacrán con etanol al 96%(v/v) y agua para retirar impurezas, cortar el telson y colocarlo en un tubo de 1.5 ml con 175 µl de buffer de lisis (Tiocianato de guanidinio 4 M, Tris pH 7.5 0.01 M, β-mercaptoetanol 0.97 %) homogenizar con un pistilo eppendorf.
2. Adicionar 300 µl de solución de dilución de RNA mezclar por inversión 3-4 veces, centrifugar por 10 min a 16 000 x rcf.
3. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y adicionar 200 µl de etanol al 95 %, mezclar con la pipeta 3-4 veces, transferir la mezcla a una columna de purificación ensamblado con un colector (columna-colector) y centrifugar 1 min a 16 000 rcf. Desechar el sobrenadante.
4. Adicionar 600 µl de RNA Wash Solution (acetato de potasio 60 mM, Tris-ácido clorhídrico pH 7.5 y etanol 60 %) en la columna y centrifugar 1 min a 14 000 x g. Desechar el sobrenadante y ensamblar columna-colector.
5. Preparar la mezcla 40 µl de Yellow Core Buffer (Tris pH 7.5 0.0225 M, Cloruro de sodio 1.125 M, colorante amarillo 0.0025%), 5 µl de Cloruro de manganeso 0.09 M, y 5 µl de DNAsa I (siempre usar la mezcla recién preparada) y aplicarla sobre la membrana de la columna de purificación. Incubar 15 min de 20- 25 °C.
6. Adicionar 200 µl de DNase Stop Solution (Isotiocianato de guanidinio 2 M, Tris-ácido clorhídrico pH 7.5 4 mM, etanol 57%) en la columna-colector y centrifugar 1 min a 16 000 x rcf. Desechar el sobrenadante.
7. Adicionar 600 µl de RNA Wash Solution en la columna-colector y centrifugar 1 min a 16 000 x rcf. Desechar el sobrenadante.
8. Adicionar 250 µl de RNA Wash Solution en la columna-colector y centrifugar 2 min a 16 000 x rcf. Desechar el sobrenadante.

9. Adicionar 100 μ l de agua libre de nucleasas sobre la membrana de la columna ensamblada a un tubo de 1.5 ml limpio y centrifugar 1 min a 16 000 x rcf. En el sobrenadante tenemos el RNA purificado.
10. Cuantificar a 260 nm en un Nanodrop 1000 spectrophotometer $\text{\textcircled{R}}$ Thermo scientific.
11. Almacenarlo a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Construcción de librería de ADNc usando el kit In-fusion SMARTer Directional ADNc Library Construction $\text{\textcircled{R}}$ Clontech

Construcción primera hebra ADNc

1.0 En un tubo para PCR colocar 500 ng de RNA total en un volumen de 1 - 3.5 μ l, 1 μ l de 3' In-Fusion SMARTer CDS Primer (12 μ M) y adicionar agua desionizada para obtener un volumen total de 4.5 μ l. Mezclar e incubar a 3 min a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.0 En otro tubo preparar la mezcla en el siguiente orden:

2 μ l	5X First-Strand Buffer
0.25 μ l	DTT (100 mM)
1 μ l	dNTP Mix (10 mM)
1 μ l	SMARTer V Oligonucleotide (12 μ M)
0.25 μ l	RNase Inhibitor
1 μ l	SMARTScribe Reverse Transcriptase (100 U)*

5.5 μ l Volumen total

3.0 Adicionar la mezcla maestra a cada una de las muestras de ARN, mezclar e incubar a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 90 min, después $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min.

Segunda hebra de ADNc

1. Precalentar el termociclador a 95°C.
2. En un tubo limpio preparar la siguiente mezcla siguiendo el orden:

2	µl	Primera hebra de ADNc
80	µl	Agua desionizada
10	µl	10X Advantage 2 PCR Buffer
2	µl	50X dNTP Mix (10 mM)
2	µl	5' PCR Primer II A (12 µM)
2	µl	3' In-Fusion SMARTer PCR Primer (12 µM)
2	µl	50X Advantage 2 Polymerase Mix

3. Mezclar y usar las siguientes temperaturas en el termociclador.

1 ciclo

95°C 1 min

22 ciclos

95°C 15 segundos

65°C 30 segundos

68°C 6 min

4. Verificar la construcción de la librería en electroforesis 90 V por 40 min (agarosa al 1.2%).
5. Realizar el fraccionamiento en la columna Chromaspin + TE 1000,

Fraccionamiento

1. Ajustar el flujo de la columna a 1 gota (no menor de 25 μ l)/ 40 a 60 segundos con el volumen que sea necesario de buffer de fraccionamiento 1 X (Tris pH 7.4 10 mM, cloruro de sodio 30 mM, ácido etilendiaminotetracético pH 7.4 0.5mM), tapan la columna y reservar. Nota: la resina debe quedar nivelada.
2. Adicionar 2 μ l de xylene cyanol 1% a la muestra de ADNc segunda hebra aproximadamente 85 μ l mezclar y reservar.
3. Destapar la columna y colocar la muestra sobre la resina (sin exceso de buffer), lavar el tubo con 100 μ l de buffer de fraccionamiento 1X y colocar el lavado sobre la resina.
4. Adicionar 600 μ l de buffer de fraccionamiento 1X, en este momento inicia el fraccionamiento y coleccionar aproximadamente 16 fracciones (gotas).
5. Para verificar el fraccionamiento tomar una pequeña alícuota de cada fracción y realizar una electroforesis a 150V por 10 min (agarosa al 1.1%).
6. En un solo tubo colocar las fracciones de interés y precipitarlas con 0.1 volumen de acetato de sodio 3M pH 4.8, 1.3 μ l de Glicógeno (20 mg/ml), 2.5 volumen de etanol 95%. Incubar a -20°C toda la noche.
7. Centrifugar a 16 000 rcf por 20 min a 4°C. Desechar el sobrenadante.
8. Adicionar 600 μ l de etanol 80% al precipitado. Mezclar y centrifugar a 16 000 rcf por 5 min. Desechar el sobrenadante.
9. Dejar secar al aire. Resuspender en 10 μ l de agua libre de nucleasas.
10. Cuantificar a 260 nm en un Nanodrop 1000 spectrophotometer ® Thermo scientific.

LC-MS

La fragmentación de los péptidos se realizó aplicando los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High-energy Collision Dissociation). Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 10 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 400 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 300 segundos. Los datos en formato .raw fueron sometidos a búsqueda contra la base de datos de Uniprot a través del programa Discoverer 1.4 (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA).