

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Estudio transcriptómico de las glándulas de veneno de *Otostigmus silvestrii* (Myriapoda: Scolopendridae) y *Teuthraustes atramentarius* (Chelicerata: Chactidae): Estandarización de protocolos para especies de interés médico

Janella Gabriela Calderón Carvajal

Biología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Bióloga

Quito, 17 de diciembre de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Estudio transcriptómico de las glándulas de veneno de *Otostigmus silvestrii* (Myriapoda: Scolopendridae) y *Teuthraustes atramentarius* (Chelicerata: Chactidae): Estandarización de protocolos para especies de interés médico

Janella Gabriela Calderón Carvajal

Diego F. Cisneros-Heredia, PhD (Director)
Daniel Garzón, PhD (Codirector)

Quito, 17 de diciembre de 2024

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Janella Gabriela Calderón Carvajal

Código: 00321601

Cédula de identidad: 1726640574

Lugar y fecha: Quito, 17 de diciembre de 2024

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

RESUMEN

Los venenos son complejos bioquímicos compuestos por péptidos, proteínas, carbohidratos y sales que han evolucionado durante millones de años, permitiendo su uso en autodefensa y depredación. Sin embargo, estudiar venenos en organismos pequeños, como ciempiés y escorpiones, presenta desafíos técnicos debido a la limitada cantidad de veneno disponible y los altos costos de técnicas como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Este estudio se enfocó en la estandarización de un protocolo funcional para analizar venenos mediante el uso de glándulas productoras, permitiendo la extracción de ARN, su conversión a ADN complementario (cDNA) y la posterior identificación de proteínas. Se seleccionaron dos especies urbanas, *Otostigmus silvestrii* y *Teuthraustes atramentarius*, comunes en el valle de Quito, para evaluar su potencial toxicológico. Los resultados revelaron la adaptación exitosa de un protocolo para organismos pequeños y la identificación de precursores de conotoxinas en ambas especies, lo que destaca el potencial biosintético no explorado en estos animales. Estas proteínas, reconocidas por su afinidad hacia canales iónicos, abren posibilidades para aplicaciones biomédicas. Además, la metodología desarrollada podría ser replicada en otras especies con glándulas de veneno, ampliando la búsqueda de compuestos bioactivos con relevancia médica. Este estudio no solo establece un flujo de trabajo efectivo desde la colecta hasta la detección de proteínas, sino que también resalta la importancia de explorar especies no categorizadas para descubrir compuestos con aplicaciones terapéuticas. Este enfoque ofrece una perspectiva innovadora para aprovechar el potencial biomédico de especies urbanas poco estudiadas.

Palabras clave: artrópodos, glándulas venenosas, transcriptoma, salud urbana.

ABSTRACT

Venoms are complex biochemical cocktails composed of peptides, proteins, carbohydrates, and salts that have evolved over millions of years, enabling their use in self-defense and predation. However, studying venom in small organisms, such as centipedes and scorpions, poses technical challenges due to the limited amount of venom available and the high cost of techniques like high-performance liquid chromatography (HPLC). This study focused on standardizing a functional protocol to analyze venoms using venom glands, enabling RNA extraction, conversion to complementary DNA (cDNA), and subsequent protein identification. Two urban species, *Otostigmus silvestrii* and *Teuthraustes atramentarius*, commonly found in the Quito Valley, were selected to evaluate their toxicological potential. The results demonstrated the successful adaptation of a protocol for small organisms and the identification of conotoxin precursors in both species, highlighting the unexplored biosynthetic potential of these animals. These proteins, known for their affinity toward ion channels, open possibilities for biomedical applications. Furthermore, the developed methodology could be replicated in other venomous species, expanding the search for bioactive compounds with medical relevance. This study not only establishes an effective workflow from sample collection to protein detection but also emphasizes the importance of exploring uncategorized species to discover compounds with therapeutic potential. This approach provides an innovative perspective for leveraging the biomedical potential of understudied urban species.

Keywords: arthropods, venom glands, transcriptome, urban health.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
INTRODUCCIÓN.....	10
METODOLOGÍA.....	14
RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	14
EXTRACCIÓN DE VENENO.....	14
EXTRACCIÓN DE GLÁNDULAS.....	16
EXTRACCIÓN DE ARN Y MRNA A PARTIR DE ARN TOTAL.....	17
CONVERSIÓN DE ARN TOTAL Y MRNA A CDNA	17
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	18
RESULTADOS	20
CUANTIFICACIÓN DE MATERIAL GENÉTICO	20
OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS.....	22
DISCUSIÓN.....	26
PROTOCOLO ADAPTADO A ORGANISMOS PEQUEÑOS.....	26
POTENCIAL TOXICOLÓGICO.....	28
CONCLUSIONES.....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de cuantificación de material genético. Tanto de RNA extraído, cDNA a partir de RNA total, cDNA a partir de mRNA y cDNA a partir de RNA total como control de calidad por MacroGen.	20
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura para manejo de organismos.	15
Figura 2. Modificación de los electrodos para electroestimulación precisa.....	15
Figura 3. Diseño de placa metálica anatómicamente específica para escolopendras.....	16
Figura 4. Corte de forcípulas en <i>Otostigmus silvestrii</i>	16
Figura 5. Corte de telson en <i>Teuthraustes atramentarius</i>	17
Figura 6. Clasificación en grupos de proteínas obtenidas en <i>Otostigmus silvestrii</i>	22
Figura 7. Clasificación en grupos de proteínas obtenidas en <i>Teuthraustes atramentarius</i>	24

INTRODUCCIÓN

Los venenos son compuestos extremadamente diversos ya que manejan complejos cocteles bioquímicos compuestos por proteínas y péptidos (comúnmente denominados toxinas), sales y componentes orgánicos, como aminoácidos y neurotransmisores (Casewell et al., 2013). Estos compuestos se han adaptado a diversos hábitats a lo largo de millones de años de evolución, específicamente algunos artrópodos se caracterizan por el desarrollo de diversas formas de administración de veneno con diferentes fines dentro de la naturaleza como autodefensa y depredación (Senji Laxme et al., 2019). Además, han sido un blanco dentro de la biomedicina, ya que han permitido la identificación de bioactivos con aplicaciones importantes, como desarrollo de bioinsecticidas, antimicrobianos, marcadores clínicos y potentes agentes terapéuticos para enfermedades como artritis, diabetes, cáncer, trombosis y accidentes cardiovasculares (Casewell et al., 2013).

Usualmente el estudio de venenos se basa en el uso de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), la cual es una de las herramientas más potentes de la química analítica ya que tiene la capacidad de separar, identificar y cuantificar las moléculas en un compuesto, además se conoce como el método analítico más preciso para análisis cuantitativos y cualitativos (Bhardwaj et al., 2015). Esta técnica resalta por su alta resolución y análisis rápido, sin embargo, una de sus principales limitantes es el costo del sistema y de los insumos requeridos para cada análisis. Además, resulta un reto poder conocer los compuestos de los diferentes cócteles de veneno cuando únicamente se dispone de cantidades de veneno crudo limitado en animales de tamaño reducido, como sucede en la mayoría de artrópodos (Rádis-Baptista & Konno, 2020). Por lo cual insta a preguntarse si existe alguna forma de priorizar recursos para estudiar venenos de diferentes organismos. Es crucial comprender cuáles son

las verdaderas necesidades relevantes, diferenciando entre la necesidad de investigar un tema y la de implementar intervenciones de salud que ya han sido probadas (Saenz et al., 2024)

Por lo cual se ha buscado utilizar alternativas para el estudio de veneno como el uso de diferente ómicas. En este estudio se utiliza un protocolo en base al uso de glándulas productoras de veneno, con la búsqueda de la estandarización de protocolos para su manipulación y estudio, que garanticen un uso eficiente de los recursos y el éxito de los esfuerzos de investigación.

Entre las principales ventajas de usar glándulas de veneno a diferencia del uso del veneno, se destaca el alcance de detección de proteínas, con el veneno solo se podrá observar proteínas presentes en el momento de extracción, a diferencia de las glándulas que permiten la obtención del transcriptoma completo, se ha visto que el uso del transcriptoma y el proteoma en combinación del análisis funcional han servido para descubrir y entender la complejidad peptídica del veneno (Rádis-Baptista & Konno, 2020). Otro aspecto fundamental es la sensibilidad a distintas variaciones, en el caso del veneno, este puede cambiar según factores como alimentación, estrés o la técnica de extracción, con las glándulas se podrá observar todo el potencial biosintético, gracias a la bibliotecas de ADN complementario de las glándula de venenos y los análisis proteómicos son herramientas excelente para poder categorizar toxinas como también proteínas que se encuentren en baja abundancia, permitiendo entender de una forma más amplia la complejidad de las proteínas del veneno (Brahma et al., 2015).

Las dos especies que se presentan en este estudio por un lado se encuentra, *Otostigmus silvestrii* (Myriapoda: Scolopendridae) los cuales se caracterizan por tener un tamaño de 4-5cm, son depredadores terrestres y tienen una coloración azul, la mayoría de los ciempiés tienen una adaptación para excavar y vivir en la hojarasca, se desplazan rápidamente por sustratos y principalmente son carnívoros, usualmente tienden a alimentarse

de presas invertebradas, pero los escolopéndidos pueden comer pequeños vertebrados (Chitty, 2022). Por otro lado, se encuentra a *Teuthraustes atramentarius* (Chelicerata: Chactidae), los cuales tienen un tamaño de 5-6 cm, también son depredadores terrestres y manejan una coloración café, también se las puede encontrar en lugares húmedos, son animales mayoritariamente nocturnos y su capacidad para detectar y tolerar estímulos luminosos hace una característica esencial para su subsistencia (Gonzalez-Ponce et al., 2023).

Los escorpiones y ciempiés poseen características biológicas únicas que los distinguen, incluso cuando comparten un ambiente común. Su estrategia de caza varía significativamente: en los escorpiones, es principalmente pasiva, mientras que en los ciempiés es activa y rápida (Melic, 1995). Las glándulas de veneno también se localizan en lugares diferentes, en los escorpiones están situadas en el telson, mientras que en los ciempiés se encuentran en las forcípulas, estructuras especializadas cerca de la cabeza. La composición del veneno también difiere entre ambos, en los escorpiones, se ha categorizado principalmente como neurotóxica (Gómez Rave et al., 2019). Mientras que en los ciempiés se identifica como toxinas mixtas (Cupul-Magaña et al., 2015). Sin embargo, ambos comparten la misma finalidad de utilizar su veneno para paralizar a sus presas antes de ingerirlas, asegurando su supervivencia en el ecosistema que comparten. Además, ambas especies se encuentran en zonas urbanas del valle de Quito, lo que aumenta significativamente la probabilidad de hallarlas en estas áreas. Al convivir en el mismo ecosistema, resulta interesante analizar cómo dos depredadores coexisten y muestran diferencias en sus estrategias de caza y adaptación para asegurar su subsistencia.

Los objetivos de este estudio se centran en la estandarización de un protocolo funcional desde la colecta hasta la identificación de proteínas, con el fin de desarrollar procedimientos aplicables a otras especies. Además, se busca evaluar el potencial toxicológico de *Otostigmus silvestrii* y *Teuthraustes atramentarius*. De este modo, se plantea

la siguiente pregunta: ¿Es posible identificar el potencial toxicológico de los venenos de animales utilizando herramientas moleculares como alternativa al HPLC?

METODOLOGÍA

Con el fin de la estandarización de un protocolo para la extracción de veneno se presenta:

Recolección de muestras

Otostigmus silvestrii (escolopendras) y *Teuthraustes atramentarius* (escorpiones) fueron recolectados en el Distrito Metropolitano de Quito, al centro-norte de la provincia de Pichincha, en la localidad Hacienda mi cielo (-0.1654557; -78.5123357). El 15 de agosto del 2024, se recolectaron 6 especímenes de cada especie, 3 destinados para análisis taxonómico y 3 para análisis molecular. Se transportaron en tarrinas con papel húmedo al Laboratorio de Zoología de la Universidad San Francisco de Quito y los tres especímenes para análisis taxonómicos se depositaron en el Museo de Zoología ZSFQ.

Extracción de veneno

Al día siguiente de la colecta, se realizó la extracción de veneno, también conocido como “ordeñamiento”, en todos los especímenes. Para este proceso, se utilizó de base al protocolo propuesto por (Garb, 2014), con adaptaciones de equipo y estandarizado para las dos especies de trabajo como se describe a continuación. Se usó una cámara casera para la distribución de CO₂ durante 7 minutos, y se comprobó que los organismos no tuvieran movimiento antes de trasladarlos a la estructura para manejo y extracción de veneno, la cual estaba diseñada para sujetar a los organismos anestesiados durante el ordeñamiento (figura 1).



Figura 1. Estructura para manejo de organismos.

Se empleó un electroestimulador de uso terapéutico (Mini massager) en el modo de acupuntura, propio del equipo, con una intensidad de nivel 1 de los 15 disponibles y se aplicó electroestimulación con una modificación en cada uno de los electrodos (figura 2). Lo que permitió una mayor exactitud al colocar la corriente sobre el telson de los escorpiones ubicado en el último segmento del metasoma y en las forcípulas de los ciempiés ubicadas en primer segmento detrás de la cabeza, para lograr la expulsión de veneno. En el caso de los ciempiés se observó que al colocar la corriente no solo existe expulsión de veneno sino también de fluidos gástricos como salivares provocando una mayor conductividad al colocar corriente lo cual generó daño neuronal en el organismo, por lo cual se utilizó una placa de metal anatómicamente estandarizada a ciempiés (figura 3). Con el objetivo de separar a las forcípulas excluyéndolas del resto de la parte bucal, logrando evitar el daño neuronal.



Figura 2. Modificación de los electrodos para electroestimulación precisa.

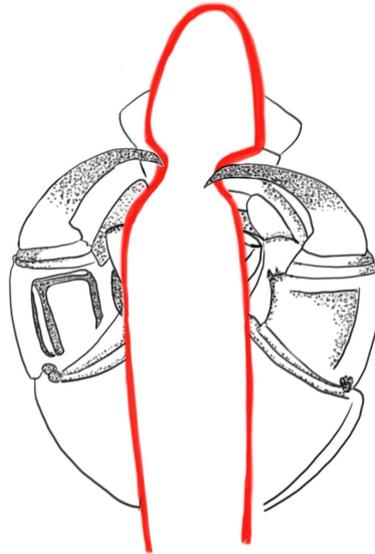


Figura 3. Diseño de placa metálica anatómicamente específica para escolopendras.

Extracción de glándulas

Una vez finalizado el ordeñamiento, los especímenes se mantuvieron en cautiverio durante 48 horas antes de proceder con la extracción de glándulas, garantizando la activación metabólica como también de los genes relacionado con la producción de veneno.

Se utilizó la cámara de CO₂ durante 10 minutos para eutanasiar a los organismos para en consiguiente extraer las glándulas de veneno. Con la ayuda de una tijera pequeña y un estereomicroscopio se realizó un corte transversal en el segmento especificado para cada organismo (figura 4 y 5).



Figura 4. Corte de forcípulas en *Otostigmus silvestrii*.



Figura 5. Corte de telson en *Teuthraustes atramentarius*.

Extracción de ARN y mRNA a partir de ARN Total

Las glándulas extraídas se llevaron inmediatamente al área de procesamiento, donde fueron pulverizadas con nitrógeno líquido, 2-mercaptoetanol y buffer de lisis. Luego, se extrajo el ARN total usando PureLink RNA Mini Kit (Cat.# 12183018A de Thermo Fisher), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN se evaluó en un espectrofotómetro de placa biotech modelo EPOCH.

A partir del ARN total, se utilizó PolyATtract mRNA Isolation Systems (Cat. # z5310 de Promega). En donde se usó un cebador de oligo(dT) biotinilado para hibridar. Los híbridos se unieron a la estreptavidina acoplada a partículas paramagnéticas, se capturaron usando un soporte de separación magnética y se lavaron. El mRNA altamente puro se eluyó de la fase sólida mediante la adición de agua desionizada sin ribonucleasas.

Conversión de ARN Total y mRNA a cDNA

Para la síntesis de cDNA, se utilizó el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher). Se emplearon primers oligo(dT) para el mRNA y RANDOM HEXAMER (primers aleatorios) para el ARN total. En un tubo RNasa-free, se añadieron los componentes necesarios, ajustados al volumen final de 20 μ L. El termociclador se configuró

con los siguientes pasos: para mRNA 43°C por 60 minutos para la síntesis de cDNA, para ARN total 25°C por 5 minutos y luego 42° C por 60 minutos, al final en ambas 70°C por 5 minutos para inactivar la transcriptasa inversa. Se cuantificó el cDNA obtenido con el espectrofotómetro de placa biotech modelo EPOCH. Finalmente, la Plataforma de Illumina HiSeq 2000 se usó para secuenciar las librerías de Nextera DNA XT (for cDNA) por medio de Macrogen.

Análisis bioinformático

Con las secuencias obtenidas (3 escorpiones y 3 ciempiés), se aplicó un pipeline aplicado al procesamiento y control de calidad de secuencias con el uso de FastQC, para evaluación de calidad, Cutadapt para remover adaptadores y nuevamente FastQC, para verificación. En consiguiente se trabajó con el mapeo y ensamblaje de transcritos, con el uso de HISAT2, para el mapeo de secuencias con el genoma de referencia, en donde se utilizó a *Lithobius agilis* para ciempiés (Collins et al., 2023) y *Olivierus martensii* para escorpiones (Cao et al., 2013). Ambos genomas se encontraban en la base de datos del Refseq: NCBI Reference Sequence Database, los cuales contaban con el genoma completo y ensamblado; luego se usó StringTie para la cuantificación de transcritos, niveles de expresión de genes y abundancia, gffread para la conversión del archivo gtf a FASTA. Luego para la predicción y anotación de proteínas se usó Transdecoder para la identificación de marcos de lecturas abiertos (ORFs) y cd-hit-dup para la remoción de duplicados. Finalmente, para el análisis funcional y toxicológico, se utilizó NCBI BLAST+blastp para realizar búsquedas en bases de datos de proteínas, con el fin de seleccionar las proteínas con mayor coincidencia. Se aplicaron los siguientes criterios:

- E-value: este parámetro indica la cantidad de coincidencias esperadas por azar en una base de datos de tamaño determinado. Cuanto menor sea el E-value, más significativa

era la coincidencia. Por esta razón, se seleccionaron los valores más cercanos a cero para cada marco de lectura abierto, lo que indica una coincidencia más sólida y confiable.

- **Porcentaje de identidad:** se consideró el porcentaje de aminoácidos que coinciden exactamente entre la secuencia de consulta y la secuencia objetivo. Se priorizaron los resultados con el porcentaje de identidad más alto, ya que una mayor similitud entre las secuencias puede indicar una función biológica compartida.
- **Cobertura de alineación:** se seleccionó la cobertura de alineación más alta, lo que significa que una porción significativa de la secuencia total fue comparada. Esto refuerza la confiabilidad del alineamiento.
- **Relevancia biológica:** se tuvo en cuenta la importancia biológica de las proteínas identificadas, seleccionando aquellas que mostraran una relevancia específica para el organismo de estudio.

RESULTADOS

Se presentan los resultados de la cuantificación del material genético, destacando las diferencias observadas en cada etapa clave del análisis molecular, así como la obtención de proteínas de cada especie. Se incluyen clasificaciones y porcentajes obtenidos para una mejor comprensión de las variaciones entre las muestras

Cuantificación de material genético

Tabla 1. Resultados de cuantificación de material genético. RNA extraído, cDNA a partir de RNA total, cDNA a partir de mRNA y control de calidad por Macrogen.

Muestras	RNA ng/ μ L	cDNA-RNA ng/ μ L	cDNA-mRNA ng/ μ L	cDNA-RNA ng/ μ L MACQ
EcuA11	9,96	302,75	3163,7	3,61
EcuA12	11,72	2127,05	2984,1	7,45
EcuA13	7,16	1704,55	2841	4,5
EcuEsco1	2,92	418,15	2972,5	0,18
EcuEsco2	1,16	303,85	3306,8	0,09
EcuEsco3	4,44	337,75	3185	0,16

En (Tabla 1) se observa las diferencias en la cuantificación del material genético obtenido en cada paso para EcuA1 (Ecuador-Alacrán) y EcuEsco (Ecuador-Escolopendra), dentro de esta tabla se excluye la cuantificación de mRNA ng/ μ L, debido a que en equipo espectrofotómetro de placa biotech modelo EPOCH no existe la opción de cuantificar únicamente mRNA. Además, se pueden ver las diferencias entre escorpiones y ciempiés

debido a la cantidad del material con el cual se inició, viendo las diferencias morfológicas de tamaños entre las forcípulas y las del telson.

Para escorpiones se puede ver que para la muestra de EcuA11, muestra un buen rendimiento desde el proceso de extracción de RNA total como también en la conversión de RNA a cDNA con una cantidad de (3163.7 ng/ μ L). Esto sugiere una eficiente transcripción inversa del mRNA en cDNA, con una buena integridad del material genético. El valor de MACQ es relativamente bajo (3.61 ng/ μ L), lo que implica que el control de calidad no detectó problemas significativos. En la muestra EcuA12 también muestra una alta cantidad de cDNA a partir de mRNA (2984.1 ng/ μ L), indicando un proceso eficiente de conversión. Sin embargo, el valor de MACQ es notablemente más alto (7.45 ng/ μ L), lo que podría indicar una mayor cantidad de contaminantes o secuencias no deseadas que afectan la calidad final de la muestra. Aun así, los niveles de cDNA obtenidos son comparables a los de EcuA11, sugiriendo que las diferencias en calidad pueden ser mínimas. En la muestra EcuA13 se observa una buena eficiencia de conversión de RNA total a cDNA, aunque el RNA extraído es menor en cantidad (7.16 ng/ μ L). El rendimiento en la conversión de mRNA a cDNA es algo menor en comparación con EcuA11 y EcuA12. El valor de MACQ es bajo (4.5 ng/ μ L), lo que indica que esta muestra también tiene buena calidad, pero la menor cantidad de RNA inicial podría haber influido en el rendimiento global.

En cambio, para ciempiés se pude ver que la muestra EcuEsco1 tiene una baja cantidad de RNA extraído (2.92 ng/ μ L), lo que afecta notablemente el rendimiento en la conversión de RNA total a cDNA (418.15 ng/ μ L). A pesar de esto, la cantidad de cDNA a partir de mRNA (2972.5 ng/ μ L) es comparable a las muestras de EcuA1, lo que sugiere que el mRNA fue correctamente aislado. El valor de MACQ es extremadamente bajo (0.18 ng/ μ L), indicando una excelente calidad de la muestra, aunque la baja cantidad de material podría haber limitado la cantidad total de cDNA. En la muestra EcuEsco2, tiene el menor RNA

extraído (1.16 ng/ μ L), lo que afecta el rendimiento de cDNA a partir de RNA total (303.85 ng/ μ L). Sin embargo, la conversión de mRNA a cDNA es alta (3306.8 ng/ μ L), lo que indica que la muestra de mRNA fue purificada de manera efectiva. El valor extremadamente bajo de MACQ (0.09 ng/ μ L) sugiere que la calidad de esta muestra es muy alta, pero la baja cantidad inicial de RNA podría ser un factor limitante en términos de la cantidad total de cDNA obtenido. Para la muestra EcuEsco3 tiene una cantidad intermedia de RNA extraído (4.44 ng/ μ L), pero el rendimiento en cDNA a partir de RNA total es bajo (337.75 ng/ μ L). Sin embargo, la conversión de mRNA a cDNA es adecuada (3185 ng/ μ L), lo que indica que el mRNA fue extraído correctamente. El valor bajo de MACQ (0.16 ng/ μ L) indica buena calidad de la muestra, a pesar de la cantidad relativamente baja de RNA extraído.

Mostrando así que las muestras de EcuAl presentan mejores rendimientos iniciales en la extracción de RNA, con valores más altos en comparación con las muestras de EcuEsco.

Obtención de proteínas

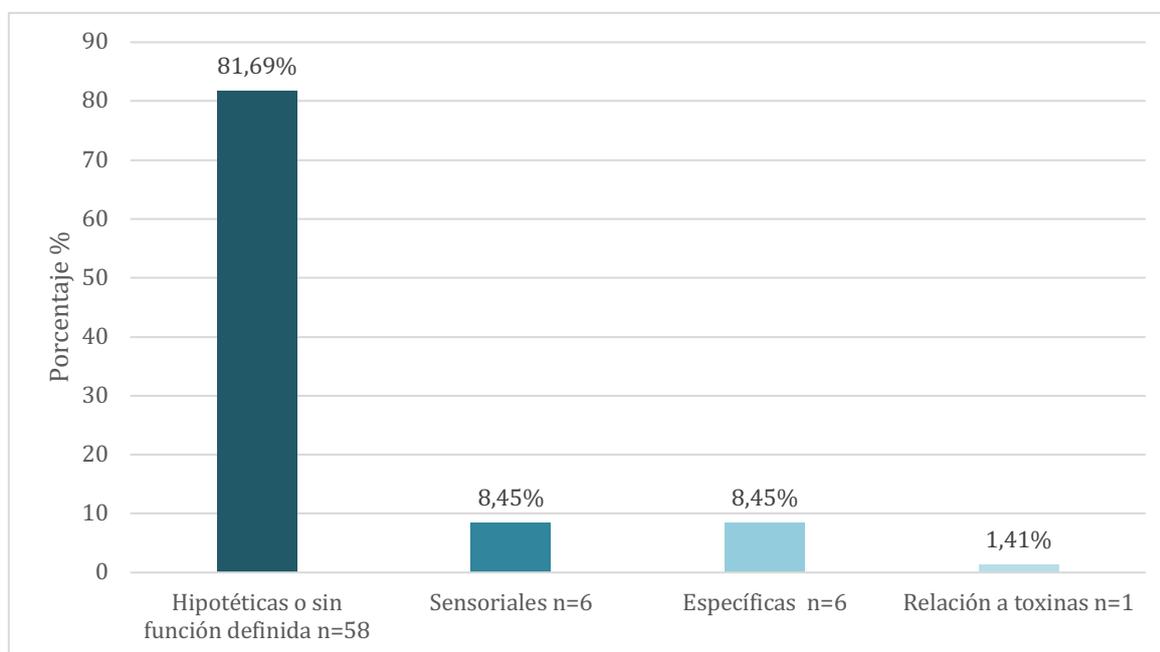


Figura 6. Clasificación en grupos de proteínas obtenidas en *Otostigmus silvestrii*.

Para el primer ciempiés se obtuvo 29 secuencias, para el segundo 20 y el tercero 22, con un total de 71 secuencias, las cuales fueron agrupadas y clasificadas en 4 grupos (figura 6).

Hipotéticas o sin función definida (58 secuencias): Este grupo incluye la mayor cantidad de secuencias identificadas, con 50 clasificadas como proteínas hipotéticas, 3 como proteínas hipotéticas conservadas, y 5 como transcritos hipotéticos.

Sensoriales (6 secuencias): Se identificaron 6 secuencias relacionadas con receptores olfativos tipo 142-like, lo que resalta su posible rol en la detección de estímulos químicos.

Proteínas específicas (6 secuencias): En esta categoría se encontraron 2 secuencias de la proteína Bm342, 3 de Ac1147-like, y 1 secuencia de CHK1 checkpoint-like, lo que sugiere su participación en funciones celulares especializadas, como regulación metabólica y control del ciclo celular.

Relación con toxinas (1 secuencia): Se identificó 1 secuencia perteneciente a la superfamilia 20 de precursores de conotoxinas no asignados.

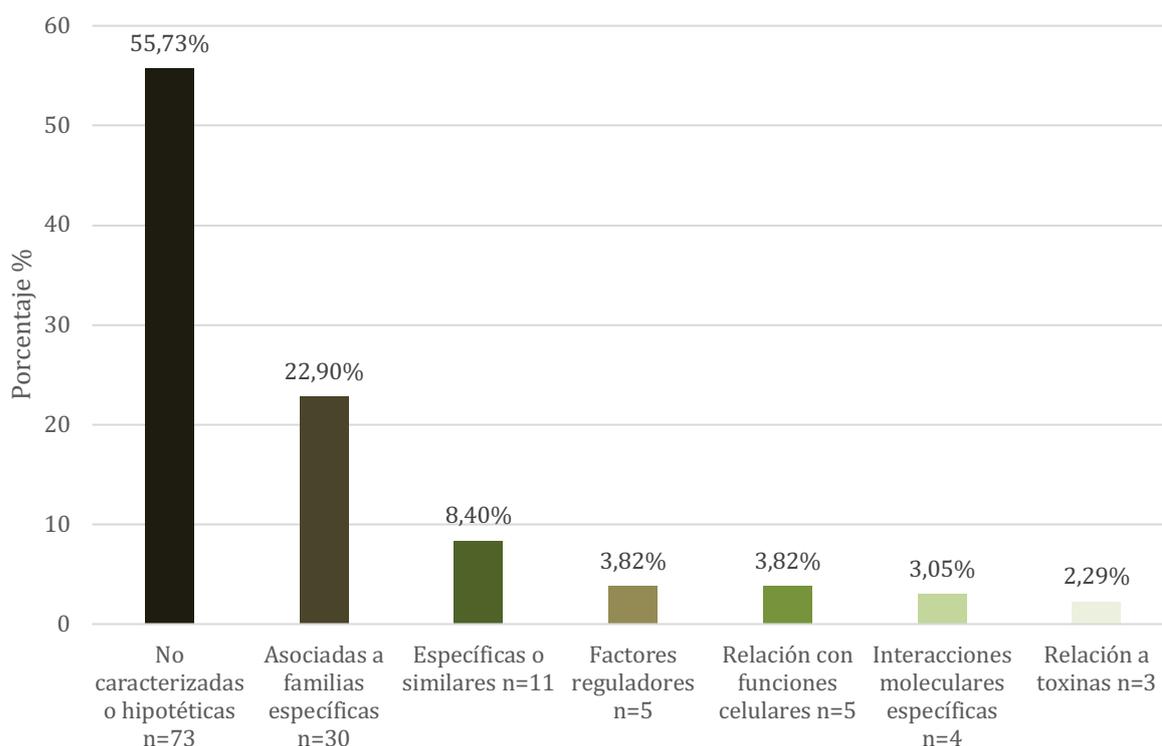


Figura 7. Clasificación en grupos de proteínas obtenidas en *Teuthraustes atramentarius*

Para el primer escorpión se obtuvo 37 secuencias, para el segundo 44 y el tercero 50, con un total de 131 secuencias, las cuales fueron agrupadas y clasificadas en 7 grupos (Figura 7).

1. No categorizadas o hipotéticas (73 secuencias): Este grupo representa la mayor proporción de las secuencias identificadas. Se clasificaron 63 secuencias como proteínas hipotéticas, 6 secuencias como proteínas sin categorizar, y 4 secuencias como proteínas predichas.
2. Asociadas a familias específicas (30 secuencias): Dentro de este grupo, se identificaron 12 secuencias relacionadas con la proteína FAM200A-like, parcial y 18 secuencias asociadas a la proteína SCAN domain-containing protein 3-like, ambas con posibles funciones estructurales o regulatorias dentro del organismo.

3. Proteínas específicas o similares (11 secuencias): Se encontraron 3 secuencias correspondientes a Ac1147-like, 1 secuencia asociada a Bm342, 4 secuencias de ART2, y 3 secuencias relacionadas con CHK1 checkpoint-like protein, las cuales podrían estar implicadas en funciones específicas como regulación celular o procesos metabólicos.
4. Factores reguladores (5 secuencias): Este grupo incluye 2 secuencias asociadas a General transcription factor II-I repeat domain-containing protein y 3 secuencias relacionadas con Zinc finger BED domain-containing protein 5-like, sugiriendo un papel en la regulación de la expresión génica y en procesos de transcripción.
5. Relación con funciones celulares (5 secuencias): Se identificaron 3 secuencias asociadas a proteasome activator complex subunit 4-like y 2 secuencias relacionadas con putative tumor differentially expressed protein, indicando una posible participación en procesos celulares clave, como el mantenimiento de la homeostasis y la respuesta tumoral.
6. Interacciones moleculares específicas (4 secuencias): En este grupo, se clasificaron 4 secuencias relacionadas con EPM2A-interacting protein 1-like, lo que sugiere un papel en procesos específicos de interacción molecular o señalización celular.
7. Relación con toxinas (3 secuencias): Se identificaron 3 secuencias pertenecientes a la superfamilia 20 de precursores de conotoxinas no asignadas.

DISCUSIÓN

Protocolo adaptado a organismos pequeños

Este protocolo maneja dos especies de artrópodos de tamaño de 4-5 cm para ciempiés y 5-6 cm para escorpiones los cuales muestran que estos organismos de estudio tienen un tamaño pequeño en comparación a organismos que utilizan en otros estudios de tamaño significativamente más grande. Por ejemplo, en un estudio que se realizó un análisis diferencial de la expresión génica de las glándulas venenosas de escorpiones juveniles y adultos, trabajaron con la especie *Androctonus crassicauda* el cual es un escorpión que tiene un tamaño de 10-18 cm, mostrando una diferencia de tamaño considerable (Salabi & Jafari, 2022). El mismo caso se ha visto con ciempiés en donde se realizó un estudio de análisis venómico y transcriptómico con la especie *Scolopendra subspinipes* la cual se caracteriza por tener un tamaño de 20 cm (Liu et al., 2012). Los estudios actuales que trabajan con glándulas de veneno generalmente se enfocan en organismos de tamaño considerablemente superior a los utilizados en este estudio. Esto presentó un desafío significativo y requirió la adaptación del protocolo para ajustarse a las particularidades de trabajar con organismos más pequeños.

Entre las adaptaciones más significativas se encuentra la prevención de daño neuronal en los ciempiés durante el proceso de electroestimulación. Esto fue posible gracias al diseño de una placa metálica adaptada anatómicamente a estos organismos, que permitió aislar y proteger las estructuras del aparato bucal, evitando así el daño neuronal. Cabe mencionar que estas dificultades no han sido reportadas en estudios realizados con organismos de mayor tamaño, lo que dejó sin una base previa para guiar la solución de este problema.

También se destaca el tiempo establecido necesario para anestesiarse y eutanasiarse a organismos de tamaño pequeño. Existen protocolos estandarizados para la anestesia de arañas, en donde utilizan agentes como dióxido de carbono, isoflurano y sevoflurano, además

de técnicas como la monitorización de reflejos y la medición de frecuencia cardíaca mediante transductores Doppler (Lewbart & Mosley, 2012). Sin embargo, estas metodologías, aunque se sugieren como base para su aplicación en escorpiones, no consideran las limitaciones inherentes al tamaño de organismos más pequeños, como escorpiones de aproximadamente 5 cm. Los equipos diseñados para medir frecuencia cardíaca o controlar parámetros anestésicos en animales más grandes no son prácticos ni efectivos en estas especies debido a su anatomía y escala reducida. Asimismo, no existen referencias ni protocolos documentados para la anestesia o inmovilización de ciempiés de tamaño pequeño, lo que representa un vacío importante en la literatura científica. Resaltando el hecho de que las técnicas estandarizadas para arañas y otros artrópodos no son directamente aplicables a todos los taxa. Estas modificaciones fueron esenciales para garantizar una manipulación adecuada y obtener resultados confiables en condiciones experimentales optimizadas.

Como también se evidenció diferencias en la calidad de las muestras, se resalta el hecho de que, a pesar de las variaciones en las bibliotecas, ya sea por tamaños inesperados debido a posibles errores en la fragmentación del cDNA, preparación de la biblioteca, por bajas cantidades relacionadas con errores en la amplificación o pérdida de material durante el protocolo; la secuenciación de las seis bibliotecas permite realizar una exploración preliminar de los datos. Esto podría generar información suficiente para llevar a cabo análisis exploratorios o validar hipótesis iniciales. Además, ayuda a comprender las características del transcriptoma y a identificar problemas en la preparación de bibliotecas para optimizar el protocolo en futuros experimentos. La secuenciación también permitió una evaluación del funcionamiento del protocolo, ya que analizar las seis bibliotecas ayuda a identificar problemas recurrentes tanto en la preparación de muestras como en el proceso general, proporcionando información práctica para mejorar la metodología.

Potencial toxicológico

El estudio de las glándulas venenosas ha permitido comprender el potencial toxicológico de diferentes tipos de artrópodos. En particular, en el caso de los escorpiones, se ha logrado caracterizar su veneno, compuesto principalmente por neurotoxinas que pueden reconocer canales iónicos en artrópodos, crustáceos o mamíferos. Estas neurotoxinas son modelos ideales para estudios sobre la relación entre la estructura y la función de proteínas (De Roodt, 2015). La identificación de proteínas en el veneno permite determinar la función de las toxinas y sirve como guía para el desarrollo de nuevos fármacos. Un estudio que analizó el transcriptoma de las glándulas venenosas de cuatro especies de escorpiones iraníes *Hemiscorpius lepturus*, *Mesobuthus eupeus*, *Androctonus crassicauda* y *Hottentotta saulcyi* identificó de manera comparativa isoformas de las proteínas LVP1_like en tres de estas especies. Estas proteínas, relacionadas con las subunidades alfa y beta de BotLVP1/BmLVP1, pertenecen a la superfamilia CS $\alpha\beta$ y podrían estar involucradas en la homeostasis del colesterol (Salabi et al., 2023). Mostrando y evidenciando la funcionalidad de la identificación de proteínas con potencial toxicológico.

En el caso de los ciempiés, se destaca que las proteínas activadoras de catabolitos (CAP) son un componente principal de su veneno. Estas proteínas funcionan como moduladores de canales iónicos, vasodilatadores o miotoxinas, destacando funciones potencialmente dañinas para los organismos afectados, alterando su sistema nervioso, circulatorio y muscular (Undheim et al., 2015). Además, la diversidad molecular de los péptidos de veneno de ciempiés es de gran relevancia, ya que se ha demostrado que los péptidos estabilizados por uno o más enlaces disulfuro son de interés en el descubrimiento de fármacos e insecticidas, debido a su estabilidad y plasticidad frente a mutaciones de aminoácidos (Undheim et al., 2015).

Con todos estos antecedentes, se destacan los precursores de conotoxinas, elementos toxicológicos que se detectaron en la especie de ciempiés como en la de escorpión de este estudio. Se debe resaltar el hecho de que las conotoxinas son pequeñas proteínas bioactivas que se caracterizan por tener complejos ricos en residuos de cisteína, que forman múltiples puentes disulfuro responsables de estabilizar su estructura tridimensional. Además, su clasificación se basa en diferentes familias en base a su actividad biológica y las secuencias de aminoácidos presentes en los dominios funcionales. Este último relacionado con la afinidad específica de los canales iónicos, incluyendo a canales de sodio, calcio y potasio, como también a receptores neuronales. Su importancia radica en su tamaño pequeño y su estabilidad estructural, lo que las convierte en herramientas valiosas para estudiar fisiología neuronal y en potenciales candidatos para el desarrollo de fármacos terapéuticos, como analgésicos para tratar el dolor crónico (Layer & McIntosh, 2006). La complejidad de los dominios ricos en cisteína no solo les otorga estabilidad, sino que también permite una alta diversidad funcional y especificidad, haciéndolas un modelo ideal para entender interacciones proteína-receptor (Robinson & Norton, 2014). La identificación de precursores de estas proteínas podría estar relacionada tanto con similitudes estructurales como funcionales, ya sea por la presencia de motivos ricos en cisteína, que estabilizan su estructura tridimensional, o por su acción específica sobre diferentes canales iónicos. Estas observaciones plantean importantes implicaciones, incluyendo la posibilidad de que estas variaciones sean el resultado de eventos evolutivos convergentes o, alternativamente, que reflejen la conservación de estas toxinas a partir de un ancestro común. Este hallazgo abre la puerta a explorar la evolución molecular de estas proteínas y su papel funcional en distintos organismos.

En el contexto de la búsqueda de proteínas con potencial toxicológico, este estudio brinda un protocolo funcional desde la colecta hasta la identificación de proteínas con

potencial toxicológico, que permite realizar una extrapolación de todo el flujo de trabajo en organismos de interés médico. Por un lado, el orden Scorpiones incluye varias familias, siendo la familia Buthidae la que agrupa la mayoría de los escorpiones de interés toxicológico. De las aproximadamente 2,000 especies de escorpiones descritas en el mundo, alrededor de 30 se consideran peligrosas para los seres humanos, y casi todas pertenecen a esta familia (Roodt & Rafael, 2015). Dentro de Buthidae, se encuentra el género *Tityus*, conocido por causar envenenamientos que constituyen emergencias pediátricas (Borges et al., 2014). En Ecuador, se han registrado 16 especies pertenecientes a este género. Aunque hasta la actualidad solo se han reportado casos aislados de escorpionismo, los casos más conocidos se han presentado en la provincia de Manabí, en el año 2014, en donde se presentaron más de 30 casos de picaduras, en donde dos menores de dos años murieron a causa de insuficiencia cardiorrespiratoria debido a la picadura de *Tityus asthenes*, de igual forma entre el 2015-2016 en la provincia de Morona Santiago, se presentaron más de 20 casos de escorpionismo, en donde tres niños menores de cuatro años murieron por edema pulmonar e insuficiencia respiratoria a causa de la picadura de *Tityus asthenes* y *Tityus obscurus* (Román et al., 2018; Flores et al., 2020).

Por otro lado, el orden Scolopendromorpha se caracteriza por incluir a los centípedos más agresivos y voraces, siendo unos de los depredadores venenosos evolutivamente más antiguos del planeta (Undheim et al., 2015b). Existen cerca de 800 especies descritas, categorizadas en cinco familias: Scolopendridae, Cryptopidae, Scolopocryptopidae, Mimopidae y Plutoniumidae (Giribet, 2015). En Ecuador, a diferencia de los casos de envenenamiento por escorpiones, la información tanto taxonómica como clínica sobre escolopendras es muy limitada. La sintomatología de sus mordeduras se ha descrito principalmente a partir de reportes en países cercanos, como Venezuela. Los síntomas pueden incluir dolor de intensidad variable que se extiende a otras zonas del cuerpo, y en casos

graves, puede presentarse isquemia miocárdica, infarto, hemoglobinuria, hematuria, hemorragia y rabdomiolisis, siendo los niños especialmente vulnerables a cuadros severos (Acosta & Cazorla, 2004). A pesar de la limitada información se destaca a la especie *Scolopendra galapagoensis* que tiene una distribución en la costa ecuatoriana y en el archipiélago de Galápagos, en donde es considerado como el animal más temido por sus forcípulas capaces de generar una mordedura dolorosa y venenosa (Horwell & Oxford, 2011). A pesar de no contar con un registro claro sobre cómo el veneno de las escolopendras puede afectar al ser humano, no se debe subestimar su incidencia, no solo con la especie presente en Galápagos, sino también con aquellas presentes en zonas continentales.

CONCLUSIONES

Por un lado, se evidenció la estandarización de un protocolo funcional desde la colecta, hasta la detección de proteínas, lo cual permite aplicar este flujo de trabajo en otras especies que contengan glándulas de veneno. Lo cual refleja el potencial de encontrar compuestos con posibles aplicaciones biomédicas en especies que no han sido categorizadas como también en especies de importancia médica. Además, se logró la evaluación del potencial toxicológico de *Otostigmus silvestrii* y *Teuthraustes atramentarius*, esto principalmente por la identificación en ambos organismos de proteínas con potencial toxicológico con los precursores de conotoxinas, lo cual incita a pensar en posibles aplicaciones biomédicas en especies comunes en zonas urbanas de Quito. Por otro lado, se recomienda realizar un estudio estructural y funcional de los precursores de las conotoxinas que se encontraron ya que con esa información se podría contrastar como se observa las proteínas cuando se encuentran en su forma activa. Además de ver posibles relaciones evolutivas que se pueden presentar en estos tipos de proteínas con potencial toxicológico. Finalmente, se recomienda conseguir un genoma de referencia completo, ensamblado y anotado de especies más cercanas a las especies con las que se están trabajando para evitar sesgos en el análisis o en su defecto realizar un ensamblado *de novo* para contrastar la información obtenida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, M., & Cazorla, D. (2004). Envenenamiento por ciempiés (*Scolopendra* sp.) en una población rural de la zona semiárida del estado Falcón, Venezuela. *Revista de investigación clínica*, 56(6 (NOV-DIC)), 712–717.
- Bhardwaj, S. K., Dwivedi, K., & Agarwal, D. D. (2015). *Review Article A Review: HPLC Method Development and Validation*.
- Borges, A., Cedillo, Y., Anchundia, D., Gamboa, L., Luzardo, M., Macías, D., Medina, D., Méndez, M., Mero, P., Meza, E., Moncada, E., Mora, G., Morán, V., Moyano, D., Naranjo, K., Pazmiño, A., Peñaherrera, J., Pillajo, A., Soledispa, J., ... Zabala, D. (2014). Los Artrópodos Venenosos de Importancia Médica en Ecuador: Estado del Conocimiento y Perspectivas de Investigación. *Revista Científica Ciencias Naturales y Ambientales*, 8(2), Article 2. <https://doi.org/10.53591/cna.v8i2.218>
- Brahma, R. K., McCleary, R. J. R., Kini, R. M., & Doley, R. (2015). Venom gland transcriptomics for identifying, cataloging, and characterizing venom proteins in snakes. *Toxicon*, 93, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.022>
- Cao, Z., Yu, Y., Wu, Y., Hao, P., Di, Z., He, Y., Chen, Z., Yang, W., Shen, Z., He, X., Sheng, J., Xu, X., Pan, B., Feng, J., Yang, X., Hong, W., Zhao, W., Li, Z., Huang, K., ... Li, W. (2013). The genome of *Mesobuthus martensii* reveals a unique adaptation model of arthropods. *Nature Communications*, 4(1), 2602. <https://doi.org/10.1038/ncomms3602>
- Casewell, N. R., Wüster, W., Vonk, F. J., Harrison, R. A., & Fry, B. G. (2013). Complex cocktails: The evolutionary novelty of venoms. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(4), 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.10.020>

- Chitty, J. R. (2022). Myriapods (centipedes and Millipedes). In *Invertebrate Medicine* (pp. 399–412). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119569831.ch17>
- Collins, G., Schneider, C., Boštjančić, L. L., Burkhardt, U., Christian, A., Decker, P., Ebersberger, I., Hohberg, K., Lecompte, O., Merges, D., Muelbaier, H., Romahn, J., Römbke, J., Rutz, C., Schmelz, R., Schmidt, A., Theissing, K., Veres, R., Lehmitz, R., ... Bálint, M. (2023). The MetaInvert soil invertebrate genome resource provides insights into below-ground biodiversity and evolution. *Communications Biology*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05621-4>
- Cupul-Magaña, F. G., Terán-Flores, H., Bueno-Villegas, J., & Escobedo-Galván, A. H. (2015). Mordedura de ciempiés (Chilopoda) en humanos: Un registro de cuatro casos en México. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 55(2), 199–203.
- De Roodt, A. R. (2015). Veneno de escorpiones (alacranes) y envenenamiento. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. <http://ref.scielo.org/zqs683>
- Flores, M., Corzo, G., & Morera, V. (2020). *Determination of the biological activities of the components present in the venom from the endemic Ecuadorian scorpion Teuthraustes aff. Atramentarius* [bachelorThesis, Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay]. <http://repositorio.yachaytech.edu.ec/handle/123456789/142>
- Garb, J. E. (2014). Extraction of Venom and Venom Gland Microdissections from Spiders for Proteomic and Transcriptomic Analyses. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 93, 51618. <https://doi.org/10.3791/51618>
- Giribet, G. (2015). Orden Scolopendromorpha. *Ibero Diversidad Entomológica, ISSN 2386-7183*.
- Gómez Rave, L. J., Muñoz Bravo, A. X., Sierra Castrillo, J., Román Marín, L. M., & Corredor Pereira, C. (2019). Veneno de escorpión: Una nueva promesa en el

- tratamiento del cáncer. *Acta Biológica Colombiana*, 24(2), 213–223.
<https://doi.org/10.15446/abc.v24n2.71512>
- Gonzalez-Ponce, E., Rodríguez-Rangel, S., Martínez, R., Alvarado, A., Ruiz-Baca, E., Miranda, P., Sánchez-Rodríguez, J. E., & Lopez-Rodriguez, A. (2023). Scorpions, Science and Folklore in Durango City. *Diversity*, 15(6), Article 6.
<https://doi.org/10.3390/d15060743>
- Horwell, D., & Oxford, P. (2011). *Galapagos Wildlife*. Bradt Travel Guides.
- Layer, R. T., & McIntosh, J. M. (2006). Conotoxins: Therapeutic Potential and Application. *Marine Drugs*, 4(3), 119–142.
- Lewbart, G. A., & Mosley, C. (2012). Clinical Anesthesia and Analgesia in Invertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 21(1), 59–70.
<https://doi.org/10.1053/j.jepm.2011.11.007>
- Liu, Z.-C., Zhang, R., Zhao, F., Chen, Z.-M., Liu, H.-W., Wang, Y.-J., Jiang, P., Zhang, Y., Wu, Y., Ding, J.-P., Lee, W.-H., & Zhang, Y. (2012). Venomic and Transcriptomic Analysis of Centipede *Scolopendra subspinipes dehaani*. *Journal of Proteome Research*, 11(12), 6197–6212. <https://doi.org/10.1021/pr300881d>
- Melic, A. (1995). Animales Venenosos 1. Generalidades. 2. Invertebrados terrestres venenosos. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, 11 (1995): 23-31. http://sea-entomologia.org/PDF/BOLETIN_11/B11-008-023.pdf
- Rádis-Baptista, G., & Konno, K. (2020). Arthropod Venom Components and Their Potential Usage. *Toxins*, 12(2), 82. <https://doi.org/10.3390/toxins12020082>
- Robinson, S. D., & Norton, R. S. (2014). Conotoxin Gene Superfamilies. *Marine Drugs*, 12(12), 6058–6101. <https://doi.org/10.3390/md12126058>
- Roodt, D., & Rafael, A. (2015). Veneno de escorpiones (alacranes) y envenenamiento. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 49(1), 55–71.

- Saenz, C., Carracedo, S., Caballero, C., Hurtado, C., Leite Ribeiro, A., Luna, F., Ortiz, Z., Palmero, A., Peralta, G., Ponce Testino, R., Reveiz, L., & Sisa, I. (2024). Research priority-setting is an ethics exercise: Lessons from the Global Forum on Bioethics in Research for the Region of the Americas. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 48, 1. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2024.32>
- Salabi, F., & Jafari, H. (2022). Differential venom gland gene expression analysis of juvenile and adult scorpions *Androctonus crassicauda*. *BMC Genomics*, 23(1), 636. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08866-1>
- Salabi, F., Vazirianzadeh, B., & Baradaran, M. (2023). Identification, classification, and characterization of alpha and beta subunits of LVP1 protein from the venom gland of four Iranian scorpion species. *Scientific Reports*, 13(1), 22277. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49556-6>
- Senji Laxme, R. R., Suranse, V., & Sunagar, K. (2019). Arthropod venoms: Biochemistry, ecology and evolution. *Toxicon*, 158, 84–103. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.11.433>
- Undheim, E. A. B., Fry, B. G., & King, G. F. (2015a). Centipede Venom: Recent Discoveries and Current State of Knowledge. *Toxins*, 7(3), 679–704. <https://doi.org/10.3390/toxins7030679>
- Undheim, E. A. B., Fry, B. G., & King, G. F. (2015b). Centipede Venom: Recent Discoveries and Current State of Knowledge. *Toxins*, 7(3), 679–704. <https://doi.org/10.3390/toxins7030679>