



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

---

---

**ESCUELA DE ESTUDIOS SUPERIORES DEL JICARERO**

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS PRINCIPALES  
COMPONENTES DEL VENENO DEL ALACRÁN *Centruroides  
nigrescens***

**TESIS PROFESIONAL**  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**  
P R E S E N T A  
JOSÉ NOÉ VÁZQUEZ RAMÍREZ

**DIRECTOR**  
DRA. GEORGINA GURROLA BRIONES

**JOJUTLA, MORELOS**

**ABRIL, 2021**

## **MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL**

Director: Dra. Georgina Gurrola Briones

Sínodo: Dra. Ma. Ventura Rosas Echeverría

Sínodo: Mtra. María de los Ángeles Núñez Puente

Sínodo: Mtro. Humberto Flores Bustamante

Sínodo: Mtra. Isaura Quintana Padilla

## **LUGAR DE ELABORACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS**

Laboratorio del Dr. Lourival Domingos Possani Postay, del Departamento de Medicina Molecular y Bioestructura en el Instituto de Biotecnología, UNAM. Campus Cuernavaca.

Este trabajo fue parcialmente financiado por un donativo de DGAPA-UNAM, proyecto IN202619.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Georgina Gurrola Briones, por aceptar ser mi tutora de Licenciatura, por su apoyo incondicional y enseñanzas en el desarrollo de este trabajo, gracias infinitas por su paciencia y por compartir sus conocimientos y valores.

Al Dr. Lourival Domingos Possani Postay, por aceptarme en su laboratorio, gracias por proveernos del equipo y materiales necesarios para el desarrollo de este trabajo.

A mis sínodos, a la Dra. Ma. Ventura Rosas Echeverría, a la Mtra. María de los Ángeles Núñez Puentes, al Mtro. Humberto Flores Bustamante y a la Mtra. Isaura Quintana Padilla, gracias por sus valiosos comentarios, consejos y correcciones en el escrito de la tesis.

Al M en C. Leopoldo Guereca Gurrola, por enseñarme a realizar las electroforesis, por sus valiosas enseñanzas, consejos, por su paciencia, y ayudarme a resolver mis dudas sobre conceptos de la Química de los venenos de alacrán.

Al Dr. Fernando Zamudio Zuñiga, por su apoyo en el análisis de espectrometría de masas, secuenciación, gracias por su apoyo y enseñanzas.

Al Biólogo. Cipriano Balderas Altamirano, por su apoyo en la obtención del veneno y mantenimiento de los alacranes, por ayudarme a realizar los bioensayos, por sus consejos y comentarios valiosos.

A la M en C. Jimena Isaias Cid Uribe, por su apoyo para realizar experimentos, por sus valiosos comentarios, consejos y compartir sus conocimientos sobre la naturaleza de los alacranes.

Al Dr. Edson Norberto Carcamo Noriega, por su apoyo con material y ayudarme a realizar los bioensayos, gracias por sus comentarios y consejos valiosos.

Al Dr. Timoteo Olamendi Portugal, por su apoyo en los bioensayos, gracias por sus consejos y comentarios sobre la cromatografía.

Al Dr. Edmundo González Santillán, por la colecta de los individuos de la especie de alacrán empleadas en este estudio.

## **DEDICATORIA**

A mi Madre. Guadalupe Ramírez Chávez, por todo su amor y cariño a lo largo de toda mi existencia, por su apoyo incondicional, por inculcarme valores, por enseñarme a tenerle respeto a la naturaleza, por todo el esfuerzo que hizo para que tenga una Licenciatura, por todo, muchas gracias.

A mi hermano. Herrol Vázquez, por estar siempre presente, acompañarme, por el apoyo moral, por todos los momentos que hemos vivido.

A mi tío el Dr. Samuel Juan Vázquez Cisneros, por su gran apoyo durante mi carrera universitaria y en los momentos difíciles de la vida, gracias por brindarme su confianza, amistad, por toda su ayuda y buena voluntad.

A mis profesores de Licenciatura, por su apoyo y enseñanzas durante el transcurso de mi carrera universitaria, agradezco que con sabiduría motivaron a desarrollarme como persona y profesional.

A mis compañeros de laboratorio, Guillermo, Juan, Ilse, Hugo, Carmen, Gustavo, Ignacio, Linda, Fredy, Alberto, Ernesto, Rita, Mauricio, Leonel, Ulises, Alejandra, por su amistad y apoyo durante este proyecto.

A mis compañeros de Licenciatura, Humberto, Sergio, Brianda, Lucino, César, por su amistad durante todo este tiempo, muchas gracias por todos y cada uno de los momentos vividos.

A mis amigos y familiares, Ana María, Balbina, Tomás, Jose Manuel, Zaira, Kelly, Dulce, Inés, por ayudarme de manera desinteresada, gracias infinitas por toda su ayuda y buena voluntad.

**“Dentro de veinte años, estarás más decepcionado por lo que no hiciste  
que por lo que hiciste. Así que explora, sueña y descubre.”**

**MARK TWAIN**

# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	9
ÍNDICE DE FIGURAS .....	10
ÍNDICE DE TABLAS .....	11
RESUMEN .....	12
2. ANTECEDENTES .....	18
2.1 Datos taxonómicos .....	18
2.2 Nicho ecológico .....	18
2.3 Componentes del veneno de alacrán .....	19
2.4 Caracterización de venenos de alacrán.....	21
3. JUSTIFICACIÓN .....	22
4. PREGUNTA .....	22
5. HIPÓTESIS .....	22
6. OBJETIVO DEL PROYECTO.....	23
7. MATERIALES Y METODOS .....	24
7.1 Diseño experimental.....	24
7.2 Obtención del veneno.....	25
7.2.1 Recuperación del veneno del alacrán <i>Centruroides nigrescens</i> de ambas regiones.....	26
7.3 BIOENSAYOS.....	27
7.3.1 Toxicidad en mamíferos con veneno total.....	27
7.3.2 Toxicidad en insectos con veneno total.....	27
7.3.3 Toxicidad en crustáceos con veneno total.....	28
7.4 ELECTROFORESIS.....	28
7.4.1 Geles de poliacrilamida.....	28
7.5 PURIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL VENENO .....	31
7.5.1 RP-HPLC.....	31
7.6 Determinación de pesos moleculares.....	31
7.7 Reducción y alquilación de péptidos.....	31
7.8 Secuenciación y análisis de secuencias.....	32

8. RESULTADOS .....	33
8.1 BIOENSAYOS.....	33
8.1.1 Toxicidad del veneno total en ratón .....	33
8.1.2 Toxicidad del veneno total en grillos .....	34
8.1.3 Toxicidad del veneno total en cochinillas .....	35
8.2 PERFIL ELECTROFORÉTICO.....	36
8.2.1 Determinación de los patrones de migración del veneno del alacrán <i>C. nigrescens</i> en geles de poliacrilamida .....	36
8.3 PURIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES.....	38
8.3.1 Purificación de toxinas por RP-HPLC.....	38
8.3.2 Determinación de pesos moleculares del veneno del alacrán <i>C. nigrescens</i> ...	39
8.3.3 Reducción y alquilación de los principales péptidos.....	42
8.3.4 Determinación de las secuencias de aminoácidos de la región N-terminal de péptidos purificados por RP-HPLC .....	43
8.3.4 Comparación de las regiones N-terminal de las principales secuencias de aminoácidos de los péptidos purificados entre ambos venenos.....	44
9. DISCUSIÓN .....	45
10. CONCLUSIONES.....	47
11. PERSPECTIVAS.....	48
12. BIBLIOGRAFÍA .....	49
13. MATERIAL SUPLEMENTARIO .....	57
13.1 Repurificación del péptido 47 reducido y alquilado del veneno del alacrán <i>Centruroides nigrescens</i> región Zihuatanejo .....	57



## ABREVIATURAS

ACN: acetonitrilo

APS: persulfato de amonio

*C*: *centruoides*

Da: dalton

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetra acético

g: gramos

h: horas

mg: miligramo

mL: mililitro

min: minutos

nm: nanómetros

ND: no definido

RP-HPLC: cromatografía líquida de alta resolución, fase reversa (*Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography*)

RPM: revoluciones por minuto

SE: sin espectro

TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina

TFA: ácido trifluoroacético

T, R: tiempo de retención

V: voltios

µg: microgramos

µL: microlitros

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfología básica de un alacrán.....	3
<b>Figura 2.</b> Proporción de diversidad de alacranes en México. (A) Porcentaje de géneros en las familias de alacranes mexicanos. (B) Porcentaje de especies en las familias de alacranes mexicanos.....	4
<b>Figura 3.</b> Porcentaje de las proporciones de componentes que se encuentran en los venenos de alacranes mexicanos.....	20
<b>Figura 4.</b> Diseño experimental del proyecto .....	24
<b>Figura 5.</b> Imagen representativa de la estimulación eléctrica del telson.....	25
<b>Figura 6.</b> Perfil electroforético del veneno del alacrán <i>C. nigrescens</i> .....	37
<b>Figura 7.</b> Cromatogramas del veneno del alacrán <i>C. nigrescens</i> .....	38
<b>Figura 8.</b> Variabilidad de pesos moleculares de los componentes que conforman el veneno del alacrán <i>Centruroides nigrescens</i> de la región costera de Zihuatanejo	40
<b>Figura 9.</b> Variabilidad de pesos moleculares de los componentes que conforman el veneno del alacrán <i>Centruroides nigrescens</i> de la región montañosa de Quechultenango.....	40
<b>Figura 10.</b> Cromatograma de la purificación del péptido 47 reducido y alquilado del veneno del alacrán <i>C. nigrescens</i> de Zihuatanejo.....	42
<b>Figura 11.</b> Cromatograma de la purificación del péptido 50 reducido y alquilado del veneno del alacrán <i>C. nigrescens</i> de Quechultenango.....	43
<b>Figura 1s.</b> Repurificación de la fracción 47 reducida y alquilada del veneno del alacrán <i>C. nigrescens</i> de Zihuatanejo mediante RP-HPLC.....	57

## ÍNDICE DE TABLAS

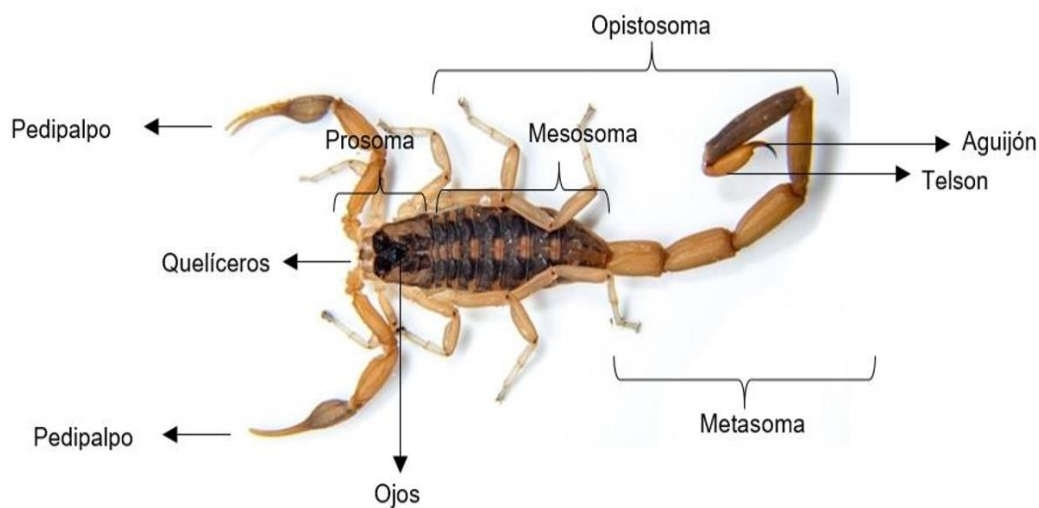
<b>Tabla 1.</b> Número de géneros y especies de alacranes en México.....	15
<b>Tabla 2.</b> Especies de alacrán tóxicos a humanos en México.....	17
<b>Tabla 3.</b> Evaluación de toxicidad en mamíferos del veneno total del alacrán <i>Centruroides nigrescens</i> .....	33
<b>Tabla 4.</b> Evaluación de toxicidad en grillos del veneno total del alacrán <i>Centruroides nigrescens</i> .....	35
<b>Tabla 5.</b> Evaluación de toxicidad en cochinillas del veneno total del alacrán <i>Centruroides nigrescens</i> .....	36
<b>Tabla 6.</b> Pesos moleculares de las 72 fracciones obtenidas de 1 mg del veneno del alacrán <i>C. nigrescens</i> de Zihuatanejo por RP-HPLC .....	41
<b>Tabla 7.</b> Pesos moleculares de las 65 fracciones obtenidas de 1 mg del veneno del alacrán <i>C. nigrescens</i> de Quechultenango por RP-HPLC.....	41
<b>Tabla 8.</b> Secuencia de la región N-terminal de la principal fracción del veneno del alacrán <i>Centruroides nigrescens</i> región Zihuatanejo .....	43
<b>Tabla 9.</b> Secuencia de la región N-terminal de la principal fracción del veneno del alacrán <i>Centruroides nigrescens</i> región Quechultenango.....	44
<b>Tabla 10.</b> Comparación de las secuencias de aminoácidos de las principales fracciones (más abundantes), en el veneno del alacrán <i>Centruroides nigrescens</i> de las regiones de Zihuatanejo y Quechultenango.....	45

## RESUMEN

El alacrán *Centruroides nigrescens* Pocock 1898, es una especie que habita y se restringe en los estados de Guerrero y Michoacán, el objetivo de este proyecto se basó en conocer si existen algunas diferencias en la composición química de su veneno entre miembros de la misma especie, de acuerdo al nicho ecológico en el que esta especie subsiste, los materiales y métodos empleados en este proyecto fueron; la obtención del veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de la región costera de Zihuatanejo en el estado de Guerrero y el veneno de la misma especie, de la región montañosa de Quechultenango del mismo estado. Los venenos fueron obtenidos por estimulación eléctrica del telson y las fracciones solubles de los venenos fueron liofilizadas y se conservaron a -20°C. Se puso a prueba la toxicidad del veneno total en mamíferos (*Mus musculus*), insectos (*Acheta domestica*) y en crustáceos (*Dactylopius coccus*). Los venenos se sometieron a técnicas electroforéticas empleando geles de poliacrilamida y a técnicas de cromatografía líquida de alta resolución fase reversa (RP-HPLC), la finalidad de estas técnicas fueron fraccionar y purificar los principales componentes de los venenos de los alacranes de ambas regiones y conocer si existen algunas diferencias entre ellos. Se determinaron mediante espectrometría de masas los pesos moleculares (Da) de los péptidos obtenidos por RP-HPLC. En los resultados de los bioensayos se demuestran diferencias en el grado de toxicidad de los venenos a diferentes especies de animales dependiendo de la región del que proviene el alacrán. En las técnicas electroforéticas se demuestran migraciones de los componentes del veneno del alacrán de la región de Zihuatanejo diferente al del alacrán de la región de Quechultenango. Existen diferencias en las concentraciones relativas de los péptidos que se muestran en los cromatogramas obtenidos por RP-HPLC y se lograron purificar y secuenciar los principales componentes de ambos venenos. Se encontraron 72 péptidos en el veneno por parte del alacrán de Zihuatanejo y 65 péptidos en el veneno por parte del alacrán de Quechultenango, diferenciando sus pesos moleculares entre ambos venenos, estos componentes varían entre los 300 a los 8000 Da.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los alacranes se encuentran entre los artrópodos terrestres de la clase Arachnida más antiguos (Santibáñez-López et al., 2016), se calcula que existen en nuestro planeta desde hace unos 400 millones de años (Possani, 2005; Polis, 1990), en ese entonces la Tierra, como hace muchos millones de años atrás y como lo hace en este momento, estaba y está en constante evolución, probablemente causada por desastres naturales o por la presencia de organismos que lograron cambiar su entorno, dando origen a múltiples modificaciones tanto en los ecosistemas acuáticos, terrestres y atmosféricos, como en las estructuras anatómicas y fisiológicas de los individuos, además de generar nuevos aspectos físicos y distintos comportamientos de muchos organismos de diferentes especies, estos cambios, aparentemente obligaron a los alacranes a evolucionar y conocerlos morfológicamente al día de hoy (Polis, 1990) (Figura 1).

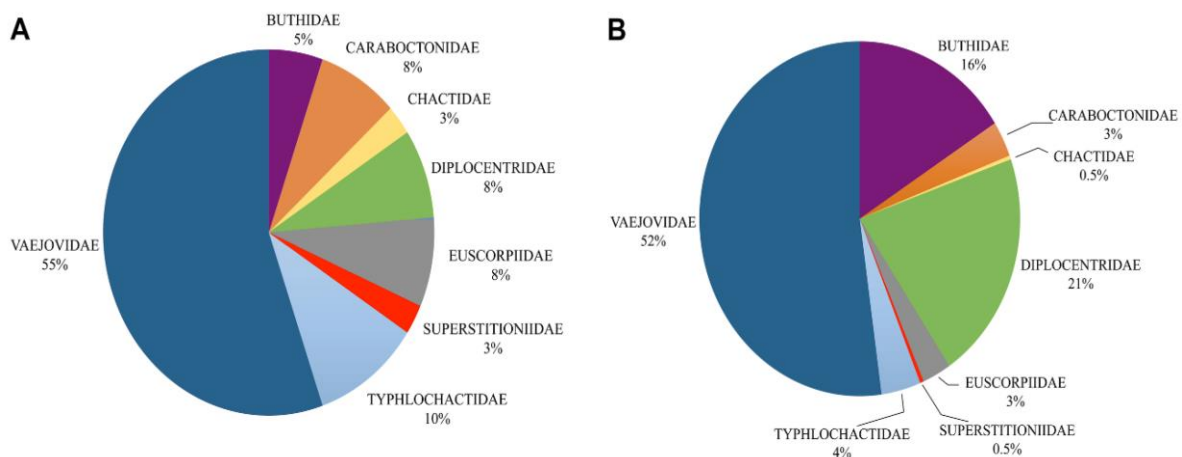


**Figura 1.** Morfología básica de un alacrán. (Tomado de García-Guerrero, 2018)

Muchas especies de alacranes conquistaron casi todos los ambientes ecológicos, exceptuando los círculos polares y algunas islas del pacífico (Santibáñez-López et al., 2016), la mayor parte de las especies de alacranes se distribuyeron en las regiones tropicales y subtropicales de la Tierra y se adaptaron perfectamente a los ambientes desérticos de clima caliente como el existente en México (Possani, 2005). Muchas otras especies de alacranes se especializaron para subsistir en

sustratos, los cuales constituyen sus refugios de las inclemencias del clima y los protegen de posibles depredadores, además de ser el lugar en donde encuentran a su pareja reproductiva y a su alimento (González, 2014), que generalmente consiste de pequeños invertebrados como moluscos, insectos y otros arácnidos, además, estos organismos son capaces de soportar largos periodos de inanición sin tener algún efecto notable, la mayoría de las especies de alacranes son nocturnos y permanecen en reposo durante el día, esto es más frecuente en especies que habitan en zonas desérticas, ya que esto les evita efectos mortíferos como la insolación y la deshidratación, sin embargo, algunas especies de alacranes pueden lograr sobrevivir con la mínima cantidad de agua, incluso les es suficiente con la que toman de su alimento; pero en otras áreas, los alacranes requieren beber agua de vez en cuando para poder complementar sus requerimientos metabólicos, lo que hace que busquen áreas húmedas durante la noche (Polis, 1990).

Actualmente de las 2,597 especies de alacranes que se han reportado en todo el mundo (Rein-Ove, 2021), 289 especies de alacranes se encuentran en nuestro país, lo que representa más del 11% de la diversidad mundial (Figura 2).



**Figura 2.** Proporción de diversidad de alacranes en México. (A) Porcentaje de géneros en las familias de alacranes mexicanos. (B) Porcentaje de especies en las familias de alacranes mexicanos. (Tomado de Santibáñez-López et al., 2016)

Las especies de alacranes registradas en todos los estados de México se incluyen en ocho familias y 38 géneros (Tabla 1) (Santibáñez-López et al., 2016), de las

cuales la familia Vaejovidae Thorell, 1876, es la más diversa (Ponce-Saavedra et al., 2013), cuenta con 15 géneros y 151 especies; la familia Diplocentridae Karsch, 1880, cuenta con 3 géneros y 58 especies; la familia Typhlochactidae Mitchell, 1971, la única endémica del país, cuenta con 4 géneros y 11 especies; la familia Euscorpiidae Laurie, 1896, cuenta con 3 géneros y 8 especies; la familia Caraboctonidae Krapelin, 1905, cuenta con 2 géneros y 9 especies; la familia Chactidae Pocock, 1893, cuenta con 2 géneros y 3 especies; la familia Superstitionidae Stahnke, 1940, de la cual solo se conoce un género con una sola especie y por último la familia de alacranes más estudiada en México, dado el problema de alacranismo que este representa; la familia Buthidae C. L. Koch, 1837, que engloba 2 géneros y 48 especies, de las cuales 44 corresponden al género *Centruroides* Marx, 1860 y 4 especies al género *Chaneke* Francke, 2014 (Santibáñez-López et al, 2016).

**Tabla 1.** Número de géneros y especies de alacranes registradas en México hasta el 2016. (Tomado de Ponce-Saavedra et al., 2016)

Familia	No. de géneros	No. de especies
Vaejovidae	20	151
Typhlochactidae	4	11
Euscorpiidae	3	8
Diplocentridae	3	58
Caraboctonidae	2	9
Chactidae	2	3
<b>Buthidae</b>	2	48
Superstitionidae	1	1
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>289</b>

Se reconoce que la familia Buthidae, está equipada con un arsenal de venenos distintos a otras familias (Miyashita et al., 2007), se pueden observar diferencias en la abundancia de componentes en el veneno entre géneros, especies e inclusive individuos dentro de una especie (Batista et al., 2007; Dyason et al., 2002; Pimenta et al., 2003).

Teniendo en consideración que, en México, se han reportado veinte especies de alacranes tóxicos a humanos del género *Centruroides* (Riaño-Umbarila et al., 2017) (Tabla 2), de las cuales, las principales especies son: *C. noxius* Hoffmann, 1932, en Nayarit, *C. limpidus limpidus* Karsch, 1839, en Colima, Jalisco, México, Guerrero, Morelos, Michoacán y Querétaro, *C. infamatus* C. L. Koch, 1844, en Aguascalientes, Colima, Guanajuato, Michoacán, Jalisco, Nayarit y Querétaro, *C. elegans* Thorell, 1877, en Jalisco y Nayarit, *C. suffusus* Pocock, 1902, en Durango, *C. sculpturatus* Ewing, 1928, en Sonora y *C. limpidus tecomanus* Hoffmann, 1932, en Colima, Guerrero, Jalisco y Michoacán (Tay-Zavala et al., 2004; De Armas et al., 2003; Riaño-Umbarila et al., 2017).

**Tabla 2.** Especies de alacrán tóxicos a humanos en México. (Modificado de Riaño-Umbarila et al., 2017)

	<b>Especie</b>	<b>Estado donde reporta presencia</b>
1	<i>C. noxius</i>	Nayarit.
2	<i>C. limpidus limpidus</i>	Colima, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos y Querétaro.
3	<i>C. infamatus</i>	Aguascalientes, Colima, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Nayarit y Querétaro.
4	<i>C. elegans</i>	Jalisco y Nayarit.
5	<i>C. suffusus</i>	Durango.
6	<i>C. sculpturatus</i>	Sonora.



---

<b>7</b>	<i>C. limpidus tecomanus</i>	Colima, Guerrero, Jalisco y Michoacán.
<b>8</b>	<i>C. ornatus</i>	Guanajuato, Jalisco y Michoacán.
<b>9</b>	<i>C. hirsutipalpus</i>	Colima.
<b>10</b>	<i>C. villegasi</i>	Guerrero.
<b>11</b>	<i>C. cumpas</i>	Sonora.
<b>12</b>	<i>C. sp. nov.</i>	Oaxaca (Huajuapán).
<b>13</b>	<i>C. meisei</i>	Guerrero.
<b>14</b>	<i>C. balsasensis</i>	Guerrero, México, Michoacán, Morelos y Puebla.
<b>15</b>	<i>C. huichol</i>	Nayarit.
<b>16</b>	<i>C. bonito</i>	Guerrero.
<b>17</b>	<i>C. ruana</i>	Michoacán.
<b>18</b>	<i>C. serrano</i>	Oaxaca
<b>19</b>	<i>C. mascota</i>	Jalisco
<b>20</b>	<i>C. chamela</i>	Jalisco

---

La convivencia de los alacranes con el ser humano es de suma importancia, estos artrópodos son miembros vitales de las redes tróficas, por lo que es importante tener en cuenta esta función ecológica, cuando se les encuentra en jardines y parques, en los que, si no se trata de alacranes de importancia médica, pudieran considerarse como benéficos, al consumir diariamente insectos y pequeños arácnidos (Ponce-Saavedra et al., 2016). Sin embargo, existe una parte negativa, como se mencionó anteriormente, el género *Centruroides*, que representa un peligro mortal para los humanos, se encuentra en convivencia con la población mexicana y es importante el estudio de la naturaleza del veneno de las diferentes especies de alacranes para comprender como estos actúan en nuestro organismo, de manera que se encuentren mejores soluciones ante su picadura, dentro de este género se encuentra la especie en estudio; *Centruroides nigrescens* Pocock, 1898, el veneno de esta especie de alacrán no ha sido caracterizado hasta el momento, y, por ende, se sabe poco sobre los componentes de su veneno, en la actualidad no se cuenta

con datos en los que se haya reportado que tenga importancia médica, ni algún péptido de su veneno que tenga alguna función específica.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Datos taxonómicos**

Dominio: Eukarya Margulis & Chapman, 2009

Reino: Animalia Linnaeus, 1758

Phylum: Arthropoda Latreille, 1829

Subphylum: Chelicerata Heymons, 1901

Clase: Arachnida Lamarck, 1801

Orden: Scorpiones C. L. Koch, 1837

Familia: Buthidae C. L. Koch, 1837

Género: *Centruroides* Marx, 1860

Especie: *Centruroides nigrescens* Pocock, 1898

### **2.2 Nicho ecológico**

De acuerdo con (Soberón & Miller, 2009), el término “nicho” ha sido un concepto complejo de definir, dado la maraña de conceptos que tratan de construir un tema común, sin embargo, se ha hecho una basta recopilación de datos para que (Peterson, 2006), pueda dar un concepto más claro de nicho ecológico, este incluye a todos los factores bióticos y abióticos o físico-químicos (Hutchinson, 1980), con los cuales, los organismos se relacionan y se desarrollan en el tiempo actual (Peterson, 2006). Es decir, aquellos factores ecológicos que permiten la existencia de una especie, junto con los impactos que dicha especie tiene sobre dichos factores (Soberón & Miller, 2009). En otras palabras, el nicho ecológico impregna toda la ecología importante para la biología de una especie (Hutchinson, 1980; Pianka 1982; Giller 1984).

Para que los individuos de una población puedan sobrevivir en un área geográficamente determinada, deben enfrentarse a procesos de adaptación, especiación, extinción, dispersión y a barreras biogeográficas (Illoldi, 2008). De manera que el nicho ecológico incluye a todas las interacciones que sostiene el alacrán *Centruroides nigrescens* con los factores ambientales que lo rodean.

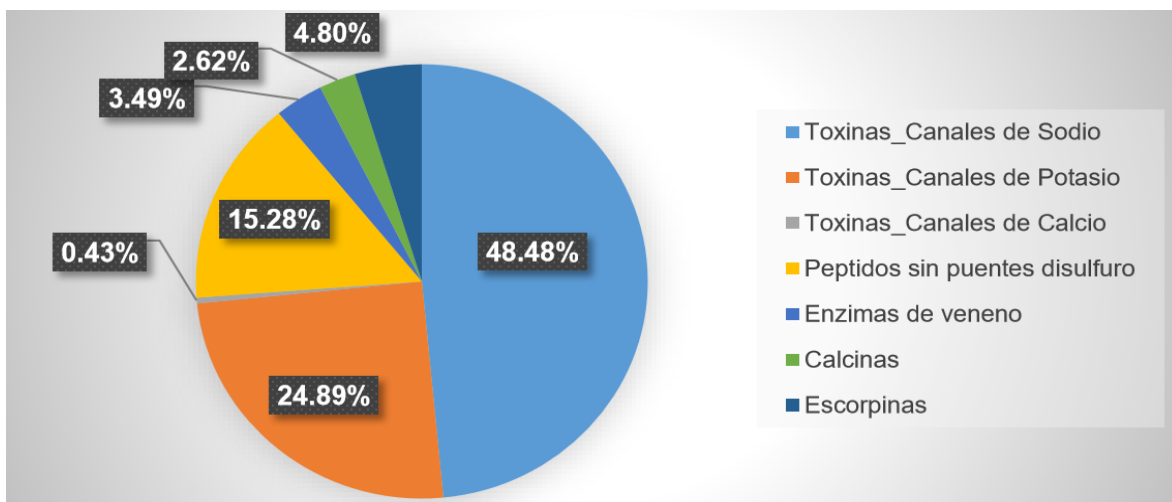
Por lo anterior, el alacrán *Centruroides nigrescens*, se enfrenta a factores abióticos, como precipitaciones y temperatura, y a factores bióticos, como la vegetación en la cual subsiste y el tipo de fauna de la cual se puede alimentar (Peterson, 2006).

Este estudio se enfocó en dos nichos ecológicos diferentes, con base a (INEGI, 2020), Zihuatanejo cuenta con un clima cálido subhúmedo, las rocas son de tipo sedimentaria, el relieve muestra que existen pastizales, dunas costeras y distintos tipos de vegetación acuática, por otra parte, en Quechultenango, predominan los climas seco y semiseco, las rocas son de tipo ígneo extrusivo o volcánico, donde predomina el relieve montañoso con selva baja caducifolia, ambas regiones se encuentran en el estado de Guerrero, donde se han registrado que habitan mamíferos, insectos y crustáceos (CONABIO, 2019), de los cuales se puede alimentar el alacrán *Centruroides nigrescens*, es por ello que se eligieron a ratones, grillos y cochinillas como modelos experimentales.

### **2.3 Componentes del veneno de alacrán**

La identificación de los componentes del veneno de alacrán y su caracterización funcional, son algunos de los aspectos más estudiados de los alacranes mexicanos (Santibáñez-López et al., 2016), dichos componentes incluyen una mezcla de diferentes moléculas, entre ellas; polisacáridos, mucoproteínas, aminas bioactivas (histamina y serotonina), metales y sales (iones de cobre, zinc, calcio, magnesio, hierro, plomo, manganeso, arsénico y níquel), aminoácidos libres, nucleótidos, lípidos, calcinas, componentes de bajo peso molecular con actividad anticoagulante (adenosina), péptidos de cadena larga (55 a 76 residuos de longitud con generalmente cuatro puentes disulfuro, estos son conocidas como toxinas de

canales de sodio), péptidos de cadena corta (23 a 64 residuos de longitud con tres o cuatro puentes disulfuro, conocidas como toxinas de canales de potasio) que bloquean o modifican la función de los canales iónicos activados por voltaje, también se encuentran en el veneno de los alacranes enzimas como las hialuronidasas, fosfolipasas, metaloproteasas y proteasas (Almeida et al., 2002; Schwartz et al., 2008; Tiwari et al., 2009; Fletcher et al., 2010; Bordon et al., 2015; Ortiz et al., 2015; Al-Asmari et al., 2016; Xiao et al., 2016; Thien et al., 2017; Tran et al., 2017) (Figura 3), que normalmente interfieren con la comunicación celular entre las células de los individuos a los que los alacranes inyectan su veneno. Sin embargo, su función es bastante selectiva, existen péptidos que reconocen solo canales iónicos de mamíferos, crustáceos o insectos (Possani, 1984; Valdivia et al., 1994; Rodríguez de la Vega et al., 2004; Pucca et al., 2015).



**Figura 3.** Porcentaje de las proporciones de componentes que se encuentran en los venenos de alacranes mexicanos. (Tomado de García-Guerrero, 2018) (Modificado de Santibáñez-López et al., 2016)

Además de los péptidos específicos que son activos en los canales iónicos de las células excitables y no excitables, se han reportado varios péptidos con diferentes funciones de interés para las industrias biotecnológicas y farmacéuticas, tales como: péptidos antimicrobianos (Conde et al., 2000; Torres-Larios et al., 2000; Carballar et al., 2008; Hernández-Aponte et al., 2011; De Melo et al., 2015; Parente et al., 2018), péptidos antipalúdicos (García et al., 2007), péptidos anticonvulsivos (Corona

et al., 2003; Chow et al., 2020), péptidos con efecto antiviral (Li et al., 2011; Zhao et al., 2012), péptidos con efecto analgésico (Li et al., 2019; Rigo et al., 2019), péptidos con efecto anticancerígeno (Bernardes-Oliveira et al., 2019; Gómez-Rave et al., 2019), fosfolipasas heterodiméricas (Valdez-Cruz et al., 2007), actividad metaloproteasa (Ortíz et al., 2014) y péptidos inmunomoduladores (Gurrola et al., 2012; Varga et al., 2012).

#### **2.4 Caracterización de venenos de alacrán**

Muchos componentes de venenos de alacranes peligrosos y no peligrosos para los humanos ya han sido aislados y caracterizados (Valdez-Cruz et al., 2004; Torres-Larios et al, 2000; Schuwartz et al, 2006; Ramírez-Carreto et al, 2012), empleando técnicas cromatográficas, mediante RP-HPLC, se obtienen péptidos o proteínas puros, además se emplea espectrometría de masas para identificar una mayor cantidad de componentes en el veneno para su respectiva caracterización bioquímica y determinación de las diferencias entre venenos de diferentes especies de alacranes (Possani et al., 1999; Valdez-Velázquez et al., 2013; Batista et al., 2007; Rodríguez de la Vega et al., 2010).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El alacrán de la especie *Centruroides nigrescens* habita en las costas y montañas de los estados de Guerrero y Michoacán, y al parecer, no es tóxico para humanos, ni para el resto de los mamíferos. En esta investigación queremos saber si influyen de manera significativa los factores del nicho ecológico en la composición química de su veneno.

Por ello, en este proyecto se caracterizaron y se compararon a los principales componentes del veneno del alacrán *C. nigrescens* por primera vez en más de un siglo de descubrimiento de la especie, también se corroboró que existe una relación entre los factores del nicho ecológico y la composición química de los venenos de la especie en estudio.

### **4. PREGUNTA**

¿Los factores del nicho ecológico influyen en la composición química del veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de la región costera de Zihuatanejo y de la región montañosa de Quechultenango?

### **5. HIPÓTESIS**

Existen evidencias de que la composición química de los venenos de alacrán es influida por el entorno en el que se desarrolla la especie (Ruiming et al., 2010), si el alacrán *Centruroides nigrescens* se encuentra en dos nichos ecológicos diferentes, entonces el veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* será diferente dependiendo del lugar en el que habita.

## 6. OBJETIVO DEL PROYECTO

Caracterizar y comparar los principales componentes bioquímicos del veneno de alacrán de la especie *Centruroides nigrescens* de dos regiones en el estado de Guerrero: La región costera de Zihuatanejo y la región montañosa de Quechultenango.

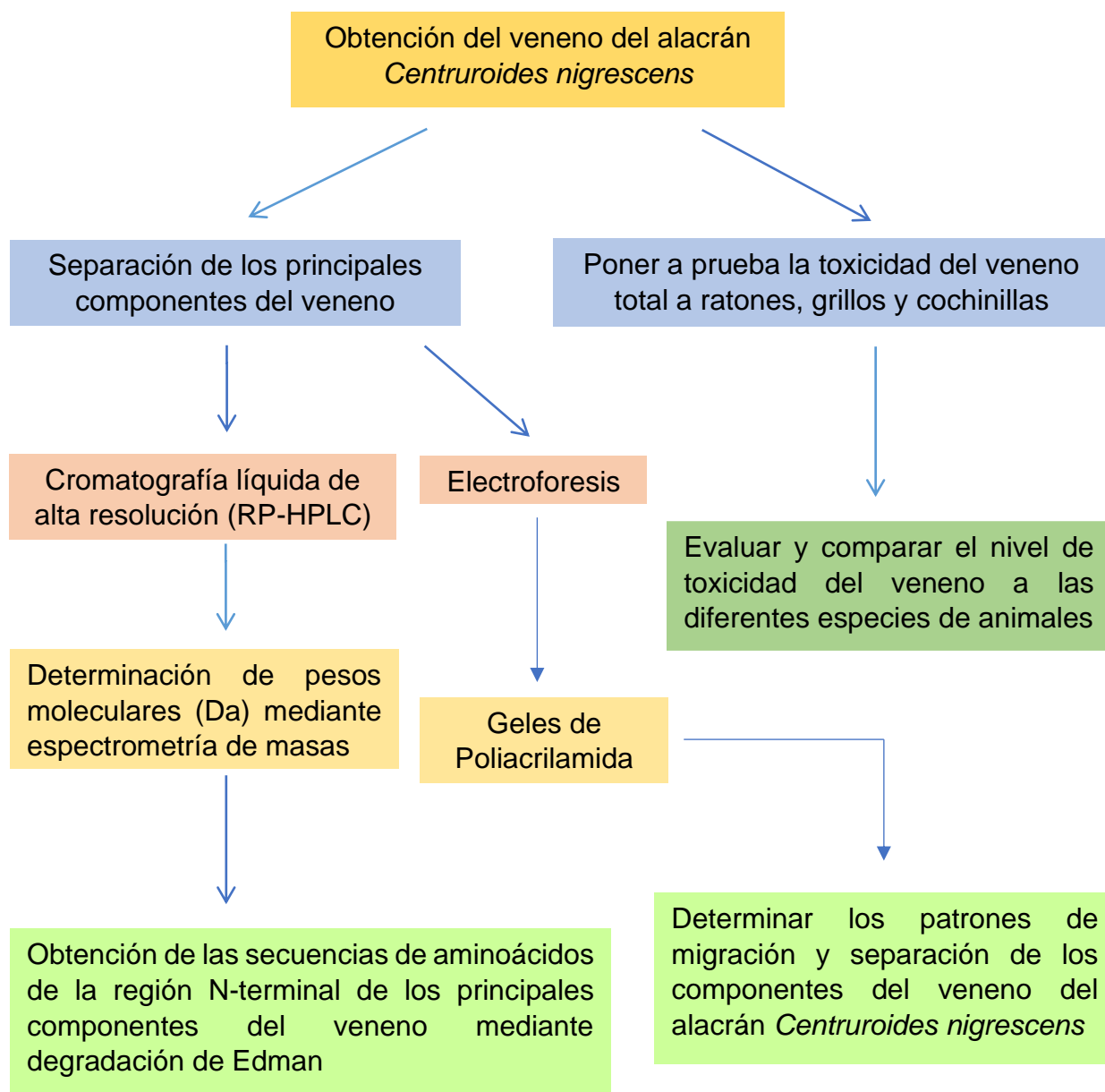
### 6.1 Objetivos particulares

1. Evaluar y comparar la toxicidad del veneno total del alacrán *Centruroides nigrescens* de las regiones de Zihuatanejo y Quechultenango en mamíferos, insectos y crustáceos.
2. Determinar los patrones de migración y separación de los componentes del veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* mediante técnicas electroforéticas empleando geles de poliacrilamida.
3. Purificar los principales componentes del veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* mediante cromatografía de intercambio catiónico o RP-HPLC.
4. Determinar y comparar la región N-terminal de las secuencias de aminoácidos de las principales fracciones obtenidas.
5. Demostrar que la composición química de los venenos de alacrán es diferente en la región costera de Zihuatanejo y la región montañosa de Quechultenango.

## 7. MATERIALES Y METODOS

### 7.1 Diseño experimental

El siguiente esquema fue diseñado para cumplir con los objetivos establecidos anteriormente (Figura 4).



**Figura 4.** Diseño experimental para la caracterización y comparación de los principales componentes del veneno del alacrán *Centruroides nigrescens*



## 7.2 Obtención del veneno

Los individuos de la especie *Centruroides nigrescens* fueron colectados en Zihuatanejo, localidad ubicada en el Suroeste del estado de Guerrero, en las coordenadas geográficas 17° 33' y 18°05' de latitud Norte y entre los 101° 15' y 101° 44' de longitud Oeste respecto al meridiano de Greenwich y en Quechultenango; municipio que pertenece a la región Centro del mismo estado; se localiza al Sureste de Chilpancingo, entre las coordenadas 17° 08' 10" y 17° 29' 49" de latitud norte, y los 99° 00' 39" y 99° 19' 26" de longitud Oeste.

Los alacranes fueron llevados al Alacranario del Instituto de Biotecnología de la UNAM y se obtuvo el veneno por medio de estimulación eléctrica del telson (Figura 5).



**Figura 5.** Imagen representativa de la estimulación eléctrica del telson. Se puede observar el electrodo de contacto y el estimulador (en rojo), las pinzas sostienen la cola del alacrán para la obtención adecuada del veneno. (Tomado de Possani, 2007)

### 7.2.1 Recuperación del veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de ambas regiones

Utilizando el método descrito y modificado de García-Guerrero et al., 2018, el veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de la región de Zihuatanejo fue depositado en 6 tubos eppendorf, luego, cada tubo fue resuspendido con 50  $\mu$ L de agua tetradestilada, el volumen de cada tubo fue depositado en un solo tubo eppendorf, resultando un volumen total de 300  $\mu$ L, con la finalidad de obtener la mayor cantidad de fracción soluble del veneno, los 6 tubos fueron lavados con 100  $\mu$ L de agua tetradestilada, después del paso del agua por los tubos, el volumen se vertió junto a los 300  $\mu$ L anteriormente obtenidos, este lavado se repitió 3 veces más con 50  $\mu$ L de agua tetradestilada por lavado, resultando en un volumen total de 550  $\mu$ L, el cual se centrifugó en una condición de 4 grados centígrados a 12,500 RPM por un tiempo de 15 min, el veneno se llevó a dilución de 1:10 y se midió la absorbancia A280 nm en un equipo *NanoDrop*, el cual permite cuantificar la concentración proteínica en un determinado volumen, asumiendo que una unidad de absorbancia equivale a 1 mg/mL de proteína, se recuperó un promedio de 4.21 mg/mL de proteína en el veneno.

Utilizando el mismo procedimiento de recuperación antes descrito, el veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de la región de Quechultenango depositado en 6 tubos eppendorf, fue resuspendido en 50  $\mu$ L de agua tetradestilada, el contenido de todos los tubos fue depositado en un solo tubo eppendorf. Para lavar los tubos y recuperar la mayor cantidad de fracción soluble del veneno, se agregaron 100  $\mu$ L de agua tetradestilada, después del paso del agua por los tubos, el volumen se vertió junto a los 300  $\mu$ L anteriormente obtenidos, el lavado se repitió 6 veces más con 50  $\mu$ L de agua tetradestilada, resultando en un volumen total de 700  $\mu$ L, el cual se sometió a centrifugación en una condición de 4 grados centígrados a 12,500 RPM por un tiempo de 15 min, el veneno se llevó a dilución de 1:10 y se midió la absorbancia A280 nm, resultando en un promedio de 28.62 mg/mL de proteína en el veneno.

## 7.3 BIOENSAYOS

### 7.3.1 Toxicidad en mamíferos con veneno total

Para la prueba de toxicidad del veneno total en mamíferos y de acuerdo con el método descrito por García-Guerrero et al., 2018 se utilizó como modelo experimental 3 ratones albinos (*Mus musculus*) cepa CD1 con un peso promedio de 21 g, la inyección del veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de la región de Zihuatanejo se realizó por vía intraperitoneal, un primer ratón fue inyectado con 20 µg de veneno diluido en 50 µL de agua tetradestilada, el segundo ratón fue inyectado con 40 µg de veneno diluido en 100 µL de agua tetradestilada, los ratones inyectados se dejaron con agua y alimento. Se observaron los efectos durante 24 h post inyección.

Para la parte comparativa de toxicidad del veneno de *Centruroides nigrescens* de la región de Zihuatanejo, se utilizó el veneno de la misma especie, pero de diferente región: Quechultenango, el veneno fue inyectado al ratón por vía intraperitoneal con 40 µg de veneno diluido en 100 µL de agua tetradestilada, el ratón se dejó con su respectivo alimento y agua. Se observaron los efectos durante 24 h post inyección.

### 7.3.2 Toxicidad en insectos con veneno total

Se puso a prueba la toxicidad del veneno total en 12 grillos (*Acheta domestica*) de acuerdo con el método descrito por García-Guerrero et al., 2018. Se inyectaron 2 grupos de grillos, cada uno con 3 individuos con el veneno de alacrán *Centruroides nigrescens* de la región de Zihuatanejo en el tercer segmento de la parte dorsal del grillo con la cantidad de 20 µg a cada uno de los 6 individuos. Se inyectaron 3 grillos con 15 µL de agua destilada que sirvieron como controles. Los grillos inyectados se les dejó con agua y se observó sus efectos durante 24 h post inyección.

Se inyectaron 2 grupos de grillos cada uno con 3 individuos con el veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de la región de Quechultenango con la cantidad de

20 µg a cada uno de los 6 grillos, los individuos inyectados se dejaron con agua y se observaron sus efectos durante 24 h post inyección.

### **7.3.3 Toxicidad en crustáceos con veneno total**

Para la prueba de toxicidad a crustáceos del veneno total de acuerdo con el método descrito y modificado de García-Guerrero et al., 2018, se utilizó como modelo experimental 6 cochinillas (*Dactylopius coccus*), se inyectó el veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de la región de Zihuatanejo en la parte baja abdominal a 3 cochinillas con la cantidad de 5 µg a cada uno de los 3 individuos. Se inyectaron 3 cochinillas con 3 µL de agua destilada, los cuales sirvieron como controles. Los individuos inyectados se dejaron con agua y se observaron sus efectos durante las 24 h post inyección.

Se inyectó el veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de la región de Quechultenango con la cantidad de 5 µg a cada una de las 3 cochinillas, los individuos inyectados se dejaron con agua y se observaron sus efectos durante 24 h post inyección.

## **7.4 ELECTROFORESIS**

### **7.4.1 Geles de poliacrilamida**

En la determinación de los patrones de migración y separación de los componentes del veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de ambas regiones, se realizaron separaciones electroforéticas mediante geles de poliacrilamida elaborados en el laboratorio de acuerdo con el protocolo descrito y modificado de García-Guerrero et al., 2018, los geles consisten en: una solución stock elaborada con 14.5 g de acrilamida y 0.5 g de bis-acrilamida, 30% T, 3.33% C, en 50 mL de agua destilada; un buffer del gel separador elaborado con 1.65 g de Acetato de Potasio disuelto en 50 mL de agua destilada; un buffer del gel concentrador que consiste en 1.76 g de

Acetato de potasio diluido en 40 mL de agua destilada; una solución de glicerol 50% v/v de 10 mL (5 mL agua destilada y 5 mL de glicerol); una solución de riboflavina 0.1% P/v (10 mg de riboflavina en 10 mL de agua destilada, el tubo contenedor se cubrió con papel aluminio); una solución de persulfato de amonio 10% P/v (100 mg de persulfato de amonio disuelto en 1 mL de agua destilada); Tricloroetanol (30  $\mu$ L) y TEMED (la cantidad depende de la cantidad a preparar), empleado de la siguiente manera:

En un tubo Falcon se añadió las soluciones medidas en el siguiente orden;

Para preparar el gel separador (6 mL): Agua tetradestilada (2.05 mL), Acrilamida 30% 12% T (2.4 mL), Buffer del gel separador (1.5 mL), APS 10% (6  $\mu$ L), Riboflavina 0.1% (30  $\mu$ L), Tricloroetanol (30  $\mu$ L) y TEMED (6  $\mu$ L).

Para preparar el gel concentrador (1 mL): Agua tetradestilada (390  $\mu$ L), Acrilamida 30% 4.5% T (150  $\mu$ L), Buffer del gel concentrador (250  $\mu$ L), Glicerol 50% (200  $\mu$ L), APS 10% (1  $\mu$ L), Riboflavina 0.1% (8  $\mu$ L) y TEMED (1  $\mu$ L).

Una primera mezcla de 1 mL del gel concentrador se vierte en un molde de dos placas de vidrio de 8x10 cm (la mezcla sirve como sellador de la parte inferior de los vidrios), se le agrega 50  $\mu$ L de agua destilada para emparejar la superficie, hecho esto, se deja a una exposición de luz blanca o neutra (puede usarse una lámpara de 13W 110-127V) durante aproximadamente 10 minutos en lo que polimeriza el gel, después se retira el agua y se vierte los seis mL del gel separador y se deja a exposición de luz blanca o neutra durante aproximadamente 10 minutos, se agregan 50  $\mu$ L de agua destilada para emparejar la superficie, una vez polimerizado el gel, se retira el agua y se vierte una segunda solución de 1 mL de buffer del gel concentrador, asegurándose de que la solución llegue casi al tope del vidrio, garantizando una correcta elaboración de los pozos donde será vertida la muestra.

Antes de correr en el gel las muestras de veneno del alacrán *C. nigrescens* de ambas regiones, se preparó un buffer de corrida (2.7 g de Beta Alanina y 2 mL de ácido acético glacial disuelto en 500 mL de agua tetradestilada) el cual nos dará la

polaridad del campo, y un buffer de muestra 2X (0.5 mL de glicerol 50% v/v en 0.5 mL de buffer del gel concentrador y se añadió verde de metilo).

Se midió la absorbancia de la muestra correspondiente al veneno del alacrán *C. nigrescens* de la región costera de Zihuatanejo, sabiendo que por absorbancia A280 nm tenemos 1.59 µg/µL, la muestra se resuspendió en 60 µL de agua tetradestilada y se vertió en tres tubos eppendorf, un tubo conteniendo 10 µg de proteína equivalente a 6.28 µL, un segundo tubo con 20 µg de proteína equivalente a 12.57 µL y un tercer tubo con 30 µg de proteína equivalente a 18.86 µL.

Para la parte comparativa, se midió la absorbancia de la muestra correspondiente al veneno del alacrán *C. nigrescens* de la región de Quechultenango, sabiendo que por absorbancia A280 nm tenemos 1.83 µg/µL, la muestra se resuspendió en 60 µL de agua tetradestilada y se vertió en tres tubos eppendorf, un tubo conteniendo 10 µg de proteína equivalente a 5.46 µL, un segundo tubo con 20 µg de proteína equivalente a 10.92 µL y un tercer tubo con 30 µg de proteína equivalente a 16.39 µL.

A los seis tubos con las muestras se le agregaron 7 µL de agua tetradestilada y 7 µL de buffer de muestra 2X, se vertieron en los pozos del gel en el orden de 10, 20 y 30 µg (carriles 2, 3 y 4 respectivamente) de proteína del veneno del alacrán *C. nigrescens* de la región de Zihuatanejo y 30, 20 y 10 µg (carriles 5, 6 y 7 respectivamente) de proteína del veneno del alacrán de la misma especie pero de la región de Quechultenango, vertiendo un volumen total de 20.28, 26.57 y 32.86 µL de veneno del alacrán de Zihuatanejo a cada pozo y un volumen total de 19.46, 24.92 y 30.39 µL de veneno del alacrán de Quechultenango respectivamente, se vertió 10 µg (carriles 1 y 8) de veneno del alacrán *Centruroides limpidus limpidus* como control, este nos mostrará si se realizó una correcta electroforesis.

Se corrieron las muestras en 50 V constantes hasta que la muestra entró al gel separador y posteriormente a 100 V hasta que el colorante (verde de metilo) llegó al fondo del gel (aproximadamente 2.30 h). Terminada la separación, se tiñó el gel con una solución de tinción (azul brillante Coomassie G-250 al 0.1% en solución de ácido acético-metanol 10%/40% v/v) durante 30 minutos y se lavó dos veces, la

primera con solución de desteñir I (solución de ácido acético-metanol 10%/40% v/v) por 30 minutos y la segunda con solución de desteñir II (solución de ácido acético-metanol 7%/10% v/v) durante 16 h aproximadamente con agitación suave.

## **7.5 PURIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL VENENO**

### **7.5.1 RP-HPLC**

Se realizó la separación de los componentes del veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* tanto de la región de Zihuatanejo como de la región de Quechultenango mediante RP-HPLC utilizando el protocolo descrito por Valdez-Velázquez et al., 2018, se inyectó 1 mg de proteína de ambos venenos utilizando una columna de fase reversa (C18 analítica 4.6 x 250 mm, Vydac, Hysperia, EUA). Se utilizó una mezcla de agua con 0.12% de TFA (solución A) y una mezcla de ACN con 0.1% de TFA (solución B), las corridas se hicieron en un gradiente lineal de 0% a 60% de B en 60 minutos y el flujo fue de 1 mL/min, las muestras fueron colectadas manualmente, fueron secadas en un equipo *Savant SpeedVac* y se mantuvieron a -20°C.

### **7.6 Determinación de pesos moleculares**

De acuerdo con el protocolo descrito por Valdez-Velázquez et al., 2018, las principales fracciones obtenidas mediante RP-HPLC, fueron disueltas en una solución de 60% de ACN y 40% de agua con 0.1% de ácido acético. El volumen de cada muestra fue ajustado de acuerdo con la absorbancia A280 nm por cada pico obtenido de la cromatografía, para posteriormente inyectar al equipo una cantidad máxima de 1 µg de proteína. Los pesos moleculares fueron determinados mediante el espectrómetro de masas *LCQFleet* (Thermo Scientific, CA, EUA).

### **7.7 Reducción y alquilación de péptidos**

La fracción 47 (T, R 36.26) del veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de Zihuatanejo y la fracción 50 (T, R 39.47) del veneno del alacrán de Quechultenango,

(siendo estos los dos componentes principales de su veneno), se redujeron y alquilaron de acuerdo al protocolo descrito por Olamendi-Portugal et al., 2017, para la reducción, los péptidos purificados se disolvieron en buffer de TRIS-HCl 200 mM pH 8.6 con un 1mg/mL de EDTA y cloruro de guanidino 6 M, se agregaron 200 µg de DTT por cada 50 µg de proteína y se incubó en una condición de 55 grados centígrados, por 45 min en un ambiente de N<sub>2</sub>, transcurrido el tiempo, se le agregaron a la mezcla 200 µg de iodoacetamina por cada 50 µg de proteína, se colocó en un ambiente de N<sub>2</sub>, se protegió de la luz, y se dejó transcurrir la reacción durante 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción, se inyectó inmediatamente la mezcla al equipo de HPLC para eliminar los reactivos, para esto, se utilizó una columna C18 analítica, se colectaron los dos péptidos alquilados (en dos corridas independientes) de forma manual, se determinaron sus pesos moleculares (Da) mediante espectrometría de masas, y se estimaron el número de cisteínas por la diferencia del peso molecular de los péptidos nativos y la ganancia en peso por el agente alquilante, las muestras se secaron en un equipo *Savant SpeedVac*.

Un último paso que se puede llevar a cabo es la digestión de los péptidos, la región N-terminal se obtiene directamente del péptido, el resto de la secuencia se obtiene al digerir el péptido con enzimas proteolíticas para así obtener la secuencia de los fragmentos y ensamblar la secuencia peptídica completa, sin embargo, en este estudio no se llevó a cabo la digestión.

## **7.8 Secuenciación y análisis de secuencias**

Los principales péptidos purificados del veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de ambas regiones tanto por RP-HPLC y electroforesis, fueron secuenciados para obtener la región N-terminal, lo anterior se realizó mediante degradación de Edman Edman y Begg, 1967, empleando un secuenciador automático PPSQ-31A (Shimadzu Instruments, Inc. Columbia, MD, EUA). Las principales secuencias obtenidas fueron comparadas entre ambos venenos.



## 8. RESULTADOS

### 8.1 BIOENSAYOS

#### 8.1.1 Toxicidad del veneno total en ratón

Con la inyección de ambas cantidades de veneno (40 µg) del alacrán *C. nigrescens* de Zihuatanejo, los ratones solo presentaron dificultad para caminar y pelaje erizado en la parte de la nariz, los mismos signos presentó el ratón inyectado con 40 µg del veneno del alacrán de la región de Quechultenango (Tabla 3) (Solo se inyectaron 3 ratones, sabiendo que el veneno del alacrán *C. nigrescens* de Zihuatanejo no era fatal con una cantidad de 20 µg, no se inyectó un ratón con esa cantidad con el veneno del alacrán de Quechultenango).

**Tabla 3.** Evaluación de toxicidad a ratón del veneno total del alacrán *Centruroides nigrescens* de ambas regiones

Especie/Región	Vía de administración	Cantidad inyectada (µg)	Resultado muertos/vivos	Efecto
<i>Centruroides nigrescens</i> Zihuatanejo	Intraperitoneal	20 µg	0/1	No fatal
<i>Centruroides nigrescens</i> Zihuatanejo	Intraperitoneal	40 µg	0/1	No fatal
<i>Centruroides nigrescens</i> Quechultenango	Intraperitoneal	40 µg	0/1	No fatal

### 8.1.2 Toxicidad del veneno total en grillos

Se evaluó la toxicidad del veneno total del alacrán *C. nigrescens* de ambas regiones, inyectando 20 µg de veneno a 12 grillos. El primer grupo de tres individuos inyectados con el veneno del alacrán de Zihuatanejo entre el lapso de 10 a 30 segundos, los tres grillos presentaron los mismos efectos de intoxicación; dificultad para caminar, pérdida del equilibrio y consecuentemente llegaron a paralizarse, después de 24 h de observación dos grillos murieron y uno se encontraba parcialmente paralizado. El segundo grupo de tres individuos inyectados con el mismo veneno presentaron signos de intoxicación iguales a los descritos en el primer grupo de grillos, después de las 24 h de observación dos grillos murieron y uno se encontraba parcialmente paralizado.

En el caso del veneno del alacrán de la región de Quechultenango, el primer grupo de tres individuos inyectados presentaron entre el lapso de 5 a 15 segundos efectos de intoxicación como pérdida del equilibrio y dificultad para caminar, sin embargo, estos no quedaban paralizados como sucedió con los grillos inyectados con el veneno del alacrán de Zihuatanejo, después de 24 h de observación un grillo murió y dos estaban en aparente buen estado, podían moverse y caminar. El segundo grupo de tres individuos inyectados con el mismo veneno presentaron signos de intoxicación iguales a los descritos en el primer grupo, al cabo de 24 h de observación un grillo murió y dos estaban en buen estado. Los tres controles inyectados con 15 µL de agua destilada se encontraban en perfecto estado después de 24 h post inyección (Tabla 4).

**Tabla 4.** Evaluación de toxicidad en grillos del veneno total del alacrán *Centruroides nigrescens* de ambas regiones

Especie/Región	Vía de administración	Cantidad inyectada (µg)	Resultado muertos/vivos
<i>Centruroides nigrescens</i> Zihuatanejo	Tercer segmento dorsal (primer grupo)	20 µg	2/1

---

	Tercer segmento dorsal (segundo grupo)	20 µg	2/1
<i>Centruroides nigrescens</i> Quechultenango	Tercer segmento dorsal (primer grupo)	20 µg	1/2
	Tercer segmento dorsal (segundo grupo)	20 µg	1/2
CONTROLES	Tercer segmento dorsal	0 µg	0/3

---

### 8.1.3 Toxicidad del veneno total en cochinillas

Se evaluó la toxicidad del veneno total del alacrán *C. nigrescens* de ambas regiones a 6 cochinillas, inyectando 5 µg del veneno. El grupo de tres cochinillas inyectadas con el veneno del alacrán *C. nigrescens* de Zihuatanejo, presentaron entre el lapso de 40 a 120 segundos signos de intoxicación como: dificultad para caminar y enroscamiento total, después de las 24 h de observación, se confirmó la muerte de las tres cochinillas.

Por otra parte, después de la inyección del veneno del alacrán de Quechultenango, el grupo de tres cochinillas entre el lapso de 25 a 40 segundos presentaron signos de intoxicación como: dificultad para caminar e inmovilidad, después de 24 h de observación todas las cochinillas murieron. Los controles inyectados con 3 µL de agua destilada se encontraban en perfecto estado (Tabla 5).

**Tabla 5.** Evaluación de toxicidad en cochinillas del veneno total del alacrán *Centruroides nigrescens* de ambas regiones

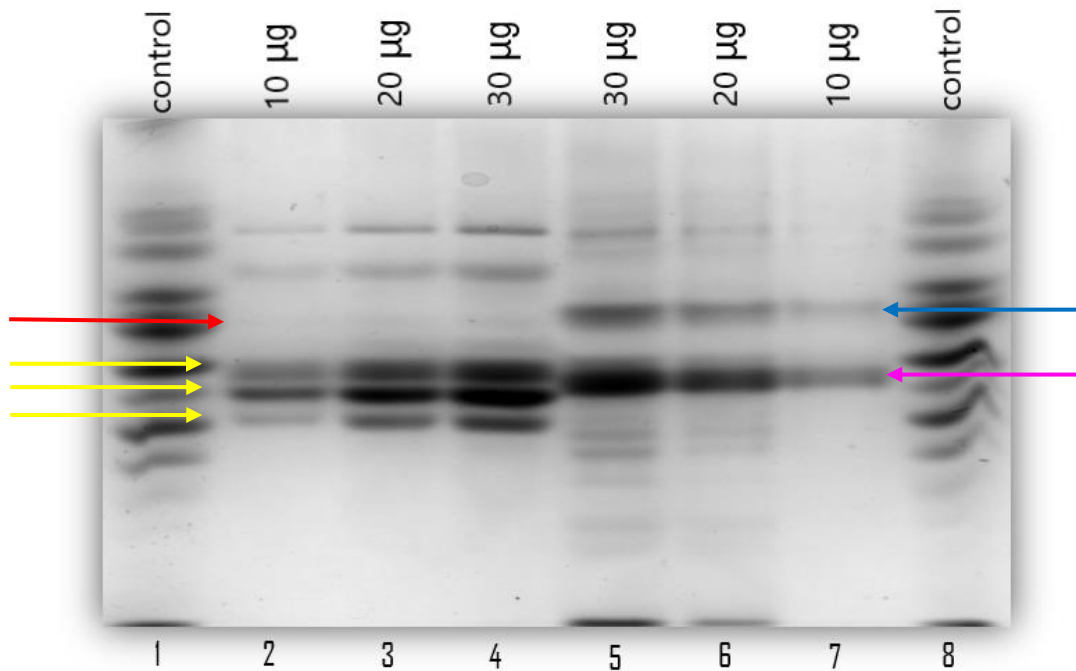
Especie/Región	Vía de administración	Cantidad inyectada ( $\mu\text{g}$ )	Resultado muertos/vivos
<i>Centruroides nigrescens</i> Zihuatanejo	Parte baja abdominal	5 $\mu\text{g}$	3/0
<i>Centruroides nigrescens</i> Quechultenango	Parte baja abdominal	5 $\mu\text{g}$	3/0
CONTROLES	Parte baja abdominal	0 $\mu\text{g}$	0/3

## 8.2 PERFIL ELECTROFORÉTICO

### 8.2.1 Determinación de los patrones de migración del veneno del alacrán *C. nigrescens* en geles de poliacrilamida

Con el uso de geles de poliacrilamida, en la electroforesis se pudieron identificar los patrones de separación, migración y la similitud de componentes en el veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de las diferentes regiones. Se muestra una diferencia en los niveles de separación de los componentes que se encuentran en la parte central del gel, el veneno de alacrán de Zihuatanejo tiene tres componentes separados muy marcados que pueden verse en los carriles 2, 3 y 4 (flechas amarillas), dicha separación no puede apreciarse en el veneno del alacrán de Quechultenango (flecha rosa), además, existe una ausencia o baja concentración proteínica en la banda del veneno del alacrán de Zihuatanejo que se encuentra en la parte superior del gel (flecha roja), siendo la banda del veneno del alacrán de Quechultenango diferenciándose por tener una banda con mayor concentración proteínica (flecha azul) y también muestra un número significativo de bandas en la

parte inferior del gel, los cuales pueden tratarse de proteínas de bajo peso molecular en las que en el veneno del alacrán de Zihuatanejo se encuentran ausentes o con una concentración proteínica menor (Figura 6).

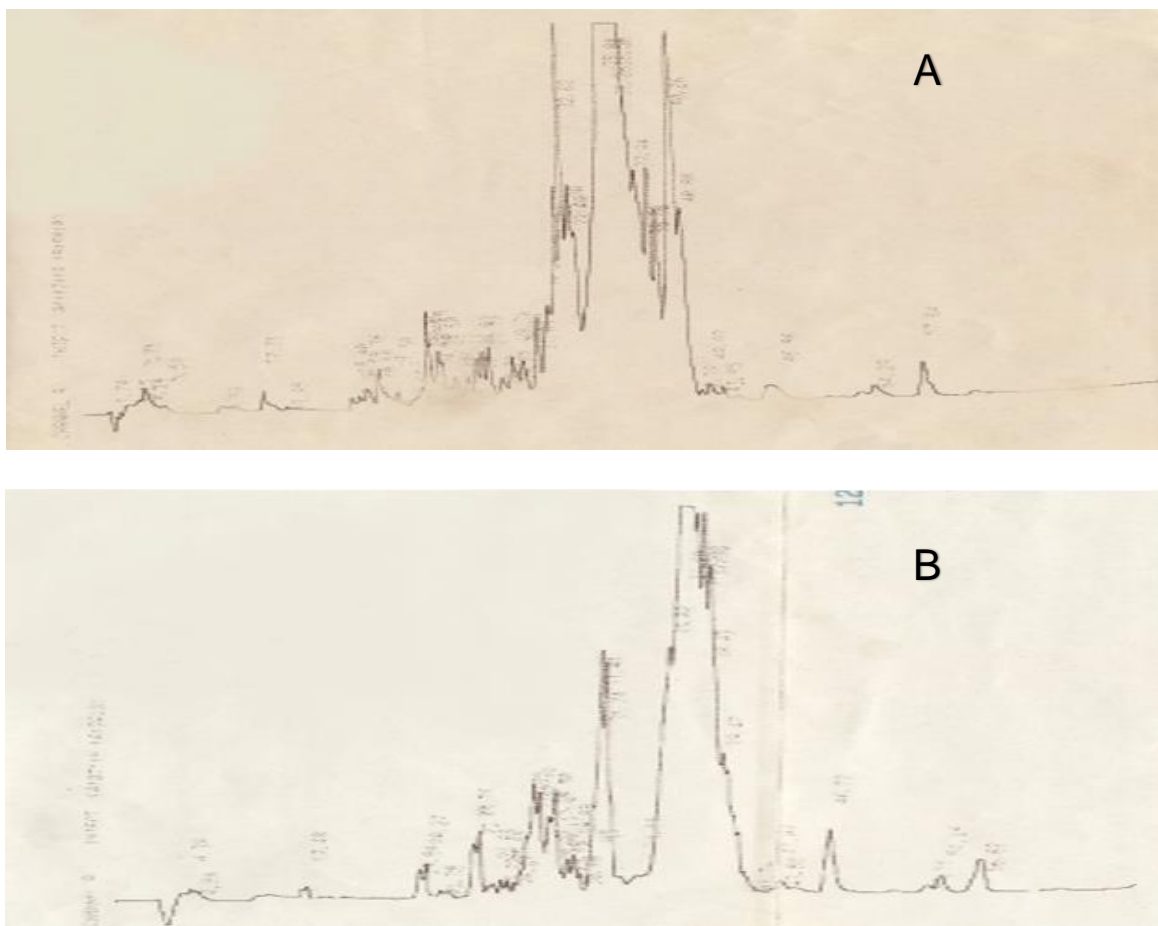


**Figura 6.** Electroforesis empleando gel de poliacrilamida vertiendo 10, 20 y 30  $\mu\text{g}$  de veneno del alacrán *C. nigrescens* de la región de Zihuatanejo (carriles 2, 3 y 4) y 30, 20 y 10  $\mu\text{g}$  de veneno del alacrán de la región de Quechultenango (carriles 5, 6 y 7), los carriles 1 y 8 corresponden a 10  $\mu\text{g}$  del veneno del alacrán *Centruroides limpidus limpidus*, las tres flechas amarillas indican la separación de tres componentes en el veneno del alacrán de Zihuatanejo, la flecha indica un componente del veneno del alacrán de Quechultenango que aparentemente no se encuentra en el veneno del alacrán de Zihuatanejo y también en el veneno del alacrán de Quechultenango se aprecia una banda en la parte superior del gel (flecha azul), ausente o en menor concentración en el veneno del alacrán de Zihuatanejo (flecha roja)

## 8.3 PURIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES

### 8.3.1 Purificación de toxinas por RP-HPLC

En dos corridas independientes se aplicaron 1 mg del veneno soluble del alacrán *Centruroides nigrescens* al equipo HPLC, en la primera corrida correspondiente al veneno del alacrán de la región de Zihuatanejo, se colectaron 72 fracciones, cada una correspondiente a un pico observado en el cromatograma, se realizó una segunda corrida de 1 mg del veneno soluble del alacrán *C. nigrescens* de la región de Quechultenango que arrojó 65 fracciones, cada uno correspondiente a un pico observado en el cromatograma (Figura 7).

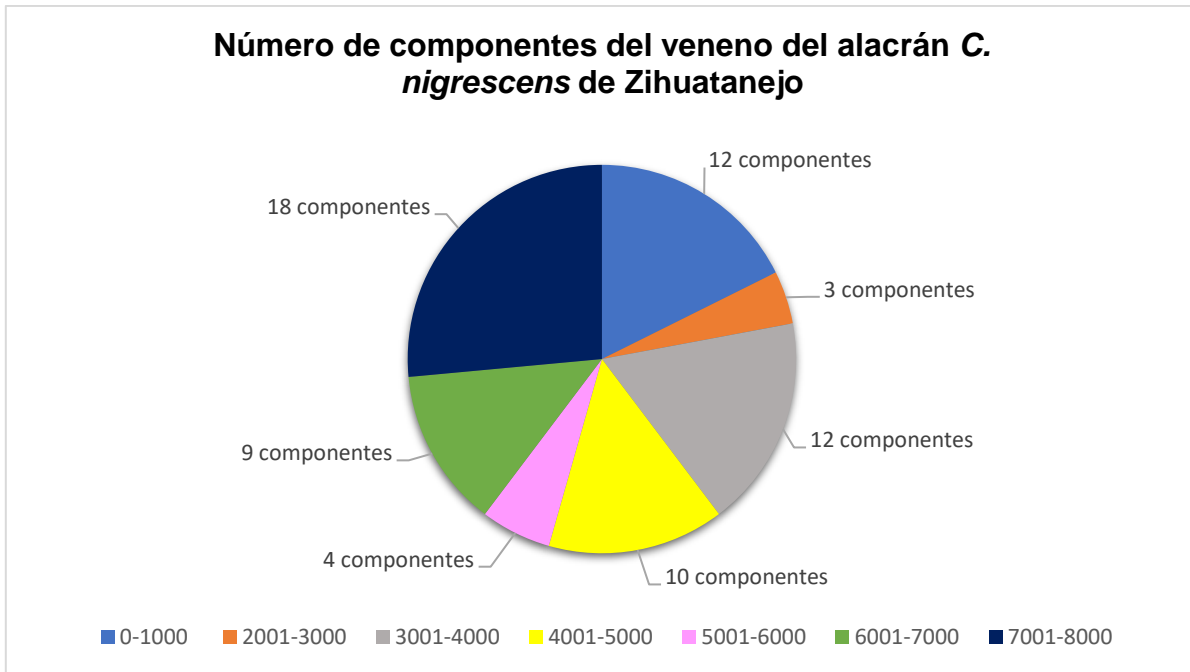


**Figura 7.** Cromatogramas obtenidos de 1 mg de veneno del alacrán *C. nigrescens* de la región de Zihuatanejo (A) y de 1 mg de veneno de la especie de

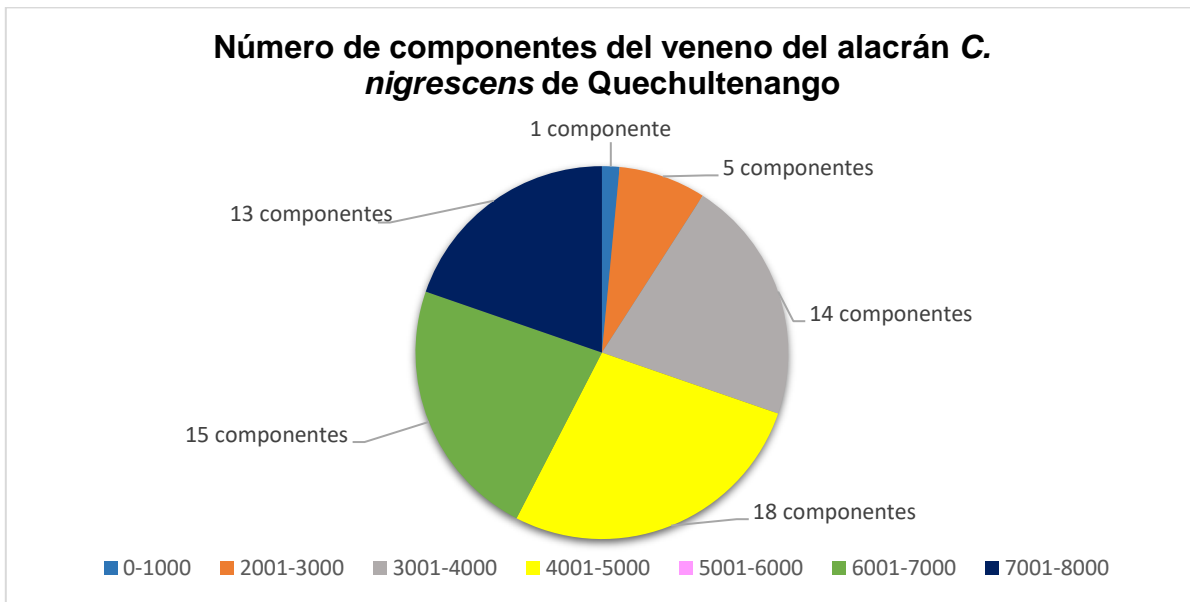
Quechultenango (B). La fase móvil fue una mezcla de solución A (agua con 0.12% de TFA) y solución B (ACN con 0.1% de TFA) en una columna C18 analítica

### **8.3.2 Determinación de pesos moleculares del veneno del alacrán *C. nigrescens***

Se determinaron los pesos moleculares de las fracciones obtenidas de las corridas de 1 mg de veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de ambas regiones por RP-HPLC, mediante espectrometría de masas (Tabla 7 y 8). Se demuestra que existe una gran variabilidad en los pesos moleculares de los componentes en el veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de la región costera de Zihuatanejo, determinando que en su veneno están presentes 12 componentes en el rango de peso molecular, expresado en Daltones (Da) de entre 0 a 1000 Da, 3 componentes entre 2001 y 3000 Da, 12 componentes entre los 3001 y 4000 Da, 10 componentes entre los pesos de 4001 y 5000 Da, 4 componentes entre 5001 y 6000 Da, 9 componentes entre los 6001 y 7000 Da y 18 componentes que van desde los 7001 a las 8000 Da (Figura 8). Mientras que en el veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de la región montañosa de Quechultenango, se determinaron solo 1 componente con peso molecular menor a los 1000 Da, 5 componentes entre los 2001 y 3000 Da, 14 componentes entre los 3001 y 4000 Da, 18 componentes entre los 4001 y 5000 Da, 15 componentes entre 6001 y 7000 Da y 13 componentes entre los pesos moleculares de 7001 y 8000 Da (Figura 9). En ambos venenos hay una ausencia de componentes entre los pesos moleculares de 1001 a 2000 Da, sin embargo, en el veneno del alacrán de Quechultenango hay también una ausencia de componentes entre los pesos moleculares de entre los 5001 a 6000 Da.



**Figura 8.** Variabilidad de pesos moleculares de los componentes que conforman el veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de la región costera de Zihuatanejo



**Figura 9.** Variabilidad de pesos moleculares de los componentes que conforman el veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de la región montañosa de Quechultenango



**Tabla 6.** Pesos moleculares de las 72 fracciones obtenidas de 1 mg del veneno del alacrán *C. nigrescens* de Zihuatanejo mediante RP-HPLC

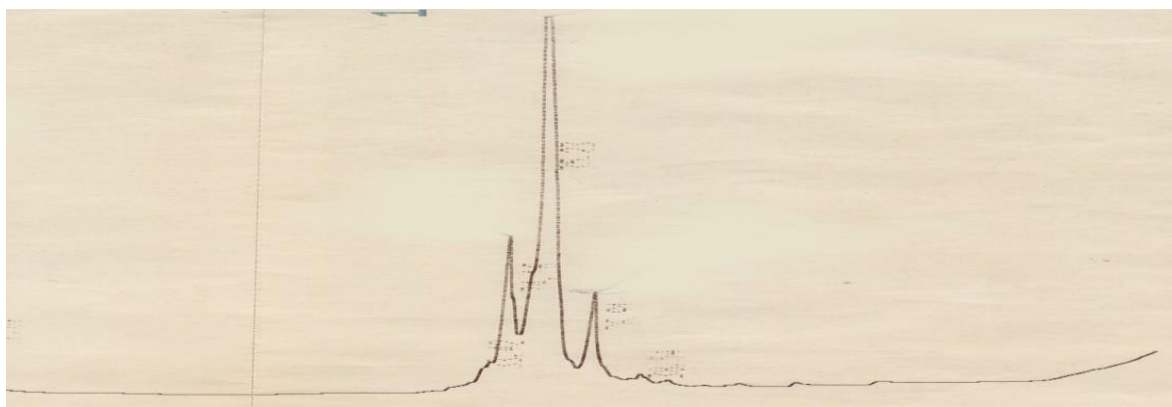
Pico	T,R	PM
1	1.74	372.96
2	1.75	372.92
3	3.15	ND
4	3.71	ND
5	4.14	ND
6	5.5	336.67-654.00
7	9.5	ND
8	11	268.00-372.92-654.08
9	12	ND
10	12.31	ND
11	12.4	363.08
12	12.5	363.08-654.00
13	13.95	213.008-425.17
14	15	213.0-425.17-654.0-247-276
15	15.6	345.08-654.
16	15.7	ND
17	16.9	244.08
18	18.4	3617.23
19	18.88	3617.1-3675.47
20	19.36	ND
21	19.5	3725.26-3837.47
22	20.18	2610.7
23	21	2652-2610-2512
24	21.5	ND
25	22.56	3730.4
26	23.21	891
27	23.45	4254.94
28	23.65	3305.6-4256.34
29	24.28	4365.6-2101.3-4255.45
30	25.46	ND
31	25.72	ND
32	26.34	3981.16
33	26.92	4007.7-3982.5
34	27.3	3986.88
35	27.7	4298.48-4409.19-3986.52
36	28.73	ND
37	29.38-29.73	3177.64-4297.55-4657.69
38	30.16	7486.6-4123.44-3177.6
39	31.08	7270
40	31.85	5632.8-7270.6
41	32.29	6920.86-5683.9
42	32.62	6986.6-6921.7-5698.7
43	33.2	6986.29-7042.2-5698
44	33.6	ND
45	35.81	7134.68-77.47.3
46	35.81	7134.28-7552.57
47	36.26-36.58	7134.7-6991.72
48	36.58	6992.65-7024.5-7133.35
49	37.84	6992.78-7025.79-7902.7
50	37.84	ND
51	38.4	7175.67-6889.97
52	39.24	7542.07-7174.8-6889.8
53	40.26	7073.62
54	40.88	7517.99-7073.62
55	42	ND
56	42.38	ND
57	42.93	ND
58	43.85	ND
59	44	ND
60	44.46	ND
61	46.96	ND
62	46.96	ND
63	47.5-49.8	ND
64	49.8-51.2	ND
65	51.2-52.4	ND
66	52.4-53.7	ND
67	54.29	ND
68	55.56	ND
69	56-57.5	ND
70	57.64	ND
71	58-60	ND
72	60-61.5	ND

**Tabla 7.** Pesos moleculares de las 65 fracciones obtenidas de 1 mg del veneno del alacrán *C. nigrescens* de Quechultenango mediante RP-HPLC

Pico	T,R	PM
1	SE	ND
2	SE	ND
3	4.38	ND
4	4.84	ND
5	SE	ND
6	SE	ND
7	SE	724.16
8	12.48	ND
9	SE	ND
10	SE	ND
11	SE	ND
12	SE	ND
13	SE	ND
14	SE	ND
15	SE	ND
16	SE	ND
17	19.84	2636.53-2749.7
18	20.27	2636.49
19	21.3	3164.89-3136
20	SE	ND
21	23.36	4255.08-4365.3
22	23.65	4253.08-3304.7
23	SE	ND
24	24.68	3872.23-4626.36
25	25.22	4033.86-4874.14
26	25.62	4034.14-4872.7
27	26.05	3981.03
28	26.78	4006.7-2942.45
29	27.12	3986.72-4006.7-7501.7
30	27.49	4297.56-3985.94
31	28.14	4261.19
32	28.5	ND
33	28.77	3950.8-4793.86-4173
34	29.17-29.45	4151.15-3980.7
35	29.89	ND
36	30.4	3921.8
37	SE	3985.4-4006.7
38	31.41	6945.34-7047
39	31.74	6946.06-6583.69
40	SE	5712.84-7048.77
41	SE	
42	34.11	5220.19
43	34.82	5846.27
44	35.82	6976.80-7468.16-6845.8
45	36.8	6977.2
46	36.8	6976.3-7020.67
47	37.55	7481.56-6060.6
48	37.98	7496.52-6961.64
49	38.43	6961.8-7069-7137.7
50	39.47	6960.98
51	SE	6961.54-7515.69
52	SE	7516.19
53	41.24	ND
54	SE	ND
55	43.07	ND
56	43.58	6475.95-2892.7
57	SE	ND
58	46.72	ND
59	46.72	ND
60	SE	ND
61	SE	ND
62	53.31	ND
63	54.16	ND
64	56.62	ND
65	56.62	ND

### 8.3.3 Reducción y alquilación de los principales péptidos

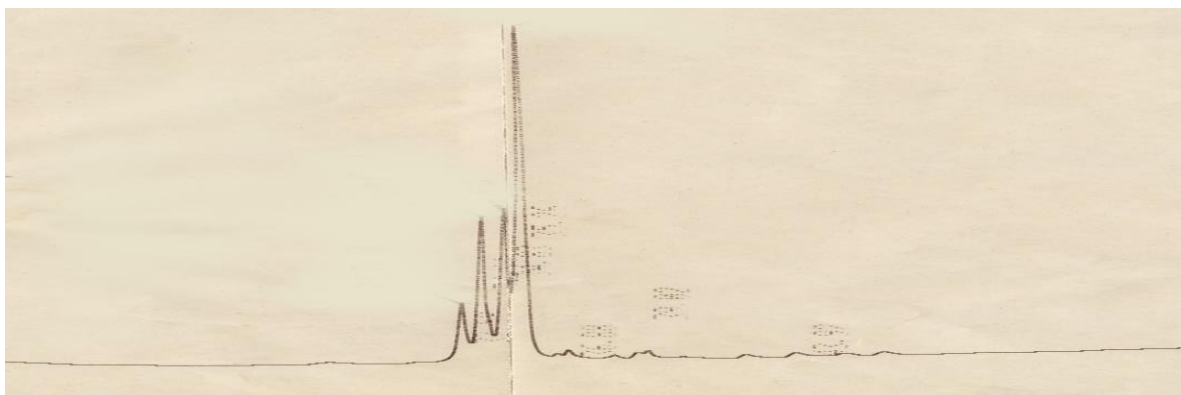
Se redujo y alquiló el principal componente del veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de Zihuatanejo, siendo esta la fracción 47 con un T, R de 36.26 y un PM de 7134.7 Da (Ver tabla 6). Los componentes reducidos y alquilados se separaron por cromatografía de fase reversa, se obtuvieron tres fracciones como se muestra en el cromatograma (Figura 10), a las cuales se les determinaron sus pesos moleculares para conocer el número de cisteínas en el principal componente del veneno. El peso molecular del principal componente ahora es de 7597.6 Da, conociendo que cada cisteína aporta un valor de 57 Da al peso original, entonces este péptido debe de tener 8 cisteínas. Debido a que la muestra no estaba purificada en su totalidad, se repurificó para su secuenciación (Ver material suplementario).



**Figura 10.** Cromatograma de la purificación del péptido 47 reducido y alquilado del veneno del alacrán *C. nigrescens* de Zihuatanejo, utilizando un columna C18 analítica, con un gradiente de 0-60 % B/ 60 min

El péptido 50 con un T,R de 39.47 y un PM de 6960.9 (Ver tabla 8), siendo este el componente principal del veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de la región de Quechultenango se redujo y alquiló. Los componentes reducidos y alquilados se separaron mediante RP-HPLC (Figura 11), se determinaron los pesos moleculares de las fracciones obtenidas y se calculó el número de cisteínas del principal

componente de este veneno, el peso molecular de esta fracción es ahora de 7441.28 Da, entonces este péptido debe de tener 8 cisteínas.



**Figura 11.** Cromatograma de la purificación del péptido 50 reducido y alquilado del veneno del alacrán *C. nigrescens* de Quechultenango, utilizando un columna C18 analítica, con un gradiente de 0-60 % B/ 60 min

### 8.3.4 Determinación de las secuencias de aminoácidos de la región N-terminal de péptidos purificados por RP-HPLC

Se purificaron varios péptidos del alacrán *Centruroides nigrescens* de ambas regiones mediante RP-HPLC, se identificó el componente principal del veneno del alacrán *C. nigrescens* Zihuatanejo, siendo la fracción 47 (T, R 36.26) con PM de 7134.7, el cual se secuenció utilizando el método de degradación de Edman (Tabla 8).

**Tabla 8.** Secuencia de aminoácidos de la región N-terminal del principal componente del veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* región de Zihuatanejo

Fracción	TR	PM (Da)	Secuencia de la región N-terminal
47	36.26	7134.7	KDGYLVKKSDBGCKYSCTPLFGDASHCNTECKAKNQGGTYXXCYAFXXC

Se determinó la secuencia de aminoácidos de la región N-terminal mediante degradación de Edman, el componente principal del veneno del alacrán

*Centruroides nigrescens* de Quechultenango, siendo la fracción 50 (T, R 39.47) con PM de 6960.9, el cual se secuenció mediante degradación de Edman (Tabla 9).

**Tabla 9.** Secuencia de aminoácidos la región N-terminal del principal componente del veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* región Quechultenango

Fracción	TR	PM (Da)	Secuencia de la región N-terminal
50	39.47	6960.9	KDGYLVKKS D GCKYSCV MLV GDSNCDSE CXA

### 8.3.4 Comparación de las regiones N-terminal de las principales secuencias de aminoácidos de los péptidos purificados entre ambos venenos

La secuenciación de la fracción 47 reducida y alquilada (T, R 36.26) de *C. nigrescens Zihuatanejo*, nos muestra 45 aminoácidos en la región N-terminal (siendo 4 de ellos no identificados), para la parte comparativa, la secuenciación de la fracción 50 reducida y alquilada (T, R 39.47) de *C. nigrescens* Quechultenango, nos muestra 31 aminoácidos (siendo uno no identificado), las fracciones principales de ambos venenos cuentan con la región N-terminal semejante, sin embargo, se pueden diferenciar en la secuencia ciertos aminoácidos que cambian, en el aminoácido en la posición 17, la fracción 47 correspondiente al veneno de *C. nigrescens* Zihuatanejo tiene una Treonina, mientras que la fracción 50 del veneno de *C. nigrescens* Quechultenango, tiene en la misma posición, una valina, en la posición 18 se encuentra una Prolina mientras que en la otra secuencia se encuentra una Metionina, en la posición 20 se encuentra una Fenilalanina, mientras que en la otra secuencia se encuentra una Valina, en la posición 24 se encuentra una Histidina, mientras que en la otra secuencia se encuentra una Asparagina, en la posición 26 se encuentra una Asparagina, mientras que en la otra secuencia se encuentra un Aspartato, y la última diferencia se encuentra en la posición 27, donde se encuentra una Treonina, mientras que en la otra secuencia se encuentra una Serina. Estas diferencias de los aminoácidos en las dos secuencias hacen distinto un veneno de otro, probablemente cada péptido tenga una conformación tridimensional diferente y, por ende, su función sea distinta (Tabla 10).

**Tabla 10.** Comparación de las secuencias de aminoácidos de las principales fracciones (más abundantes), en el veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* de las regiones de Zihuatanejo y Quechultenango

Fracción	T, R	PM (Da)	Secuencia de la región N-terminal
47 Zihuatanejo	36.26	7134.7	KDGYLVKKS <del>SDGCKYSC</del> T <del>PL</del> E <del>GDS</del> H <del>CNT</del> E <del>CKAKNQQGGTY</del>
50 Quechultenango	39.47	6.960.9	KDGYLVKKS <del>SDGCKYSC</del> V <del>ML</del> V <del>GDS</del> N <del>CDS</del> ECXA

## 9. DISCUSIÓN

El alacrán *Centruroides nigrescens*, fue descrito desde hace más de un siglo, es una especie considerada no tóxica a mamíferos, pues no se ha reportado hasta el momento alguna intoxicación humana por parte de esta especie de alacrán, ni estudios de la composición química de su veneno. Gracias a las colectas de alacranes que se llevaron a cabo en dos nichos ecológicos distintos, nos permitió hacer un estudio comparativo entre venenos de los miembros de la misma especie. De acuerdo con Ruiming et al., 2010, la composición química del veneno de los alacranes es influida por el entorno en el que la especie subsiste, por lo cual, debe de haber una relación de los recursos bióticos y abióticos con el alacrán *Centruroides nigrescens* que pueden influir en la composición química de su veneno. Por lo que en este trabajo reportamos la purificación, caracterización parcial de sus principales componentes y la comparación entre el veneno del alacrán de la región costera y el veneno del alacrán de la región montañosa.

La composición de ambos venenos se analizó mediante RP-HPLC y espectrometría de masas. Se identificaron los pesos moleculares de al menos 40 componentes del veneno del alacrán proveniente de la costa (ver Tabla 6), los más abundantes fueron los de peso molecular de 7000 a 8000 Da (ver Figura 8), y al menos 33 componentes del veneno del alacrán proveniente de la montaña (ver Tabla 7), los más abundantes fueron los de peso molecular de 4000 a 5000 Da (ver Figura 9). La separación mediante RP-HPLC permitió purificar directamente algunos componentes de los

venenos. Los principales péptidos se redujeron y alquilaron para su posterior determinación de peso molecular y secuencia (ver Tabla 8 y 9), además, para conocer el número de cisteínas presentes en los principales componentes, se determinó que cada péptido tiene 8 cisteínas. De acuerdo con Valdivia et al., 1994, estos deben tratarse de ligandos de cadena larga con 55 a 76 residuos de longitud con cuatro puentes disulfuro, y de acuerdo con Ortíz et al., 2015 estas deben ser toxinas que afectan los canales de sodio.

Se determinó la secuencia de la región N-terminal de al menos seis toxinas del veneno del alacrán de Zihuatanejo, y al menos dos toxinas del veneno del alacrán de Quechultenango. Los péptidos principales por abundancia fueron la fracción 47 por parte del veneno del alacrán de la costa y la fracción 50 por parte del veneno del alacrán de la montaña, sus pesos moleculares fueron muy semejantes (ver Tabla 6 y 7). De acuerdo con Berg et al., 2008, las secuencias de aminoácidos son los que determinan la estructura tridimensional de las proteínas las cuales determinan su función biológica. Las secuencias de los péptidos de ambos venenos se obtuvieron mediante degradación de Edman y se compararon las secuencias de los principales componentes para conocer si existen alguna ausencia o presencia de aminoácidos en la conformación de la cadena polipeptídica, en este trabajo se reporta que existen aminoácidos diferentes en la misma posición de las cadenas polipeptídicas (ver Tabla 10), lo que probablemente hace diferente la conformación tridimensional entre ambas proteínas modificando su función y especificidad.

La composición del veneno también fue evaluada mediante electroforesis, empleando geles de poliacrilamida, se determinó que el patrón de migración de los componentes es diferente entre ambos venenos, también, se demostró que existe una ausencia o una menor concentración de componentes entre los venenos (ver Figura 6).

También se evaluó toxicidad del veneno total en diferentes modelos animales, como el alacrán *Centruroides nigrescens* no ha reportado algún caso de intoxicación en México, se utilizaron ratones albinos cepa CD1 para corroborar que el veneno del alacrán no fuera tóxico a mamíferos y, por ende, a humanos, efectivamente fue así,

en los bioensayos se demostró que no existen signos de intoxicación durante las 24 h de observación (ver Tabla 3). Como se mencionó anteriormente, la hipótesis de este proyecto es en resumen, que la composición del veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* debe ser diferente de acuerdo al nicho ecológico en el que este subsiste, de acuerdo con CONABIO, 2019 las regiones donde se encuentran el alacrán en estudio; Zihuatanejo (costa) y Quechultenango (montaña), muestran que en su fauna existen (entre muchos otros) crustáceos e insectos, que posiblemente el impacto en la abundancia de estos animales en la dieta del alacrán *Centruroides nigrescens* pueden tener alguna relación con la composición química de su veneno que hacen diferente uno de otro, no olvidemos algunos otros factores, como la humedad y la temperatura que también pueden tener algún tipo de relación.

En el caso de la inyección del veneno total a insectos (grillos), el veneno del alacrán de ambas regiones se caracterizó por causar intoxicación, y los signos observados fueron: parálisis de sus extremidades en los primeros segundos, siendo el veneno del alacrán de la costa el que tiene el índice de letalidad más alto (ver Tabla 4), lo que pudimos observar como resultado es que posiblemente el veneno del alacrán empleado en este estudio, está diseñado para paralizar a sus presas y consumirlas en los primeros minutos. Por otra parte, también se corroboró la intoxicación a crustáceos (cochinillas), se demostró que la inyección del veneno total del alacrán *Centruroides nigrescens* es muy efectivo para matar a las cochinillas, se corroboró que con los venenos del alacrán de ambas regiones tienen un efecto fatal a crustáceos (ver Tabla 5). Por lo anterior y de acuerdo con Ruiming et al., 2010, se revela que los péptidos y proteínas del veneno de la misma especie de alacrán de diferentes nichos ecológicos se pueden llegar a diversificar, ocasionando que de manera aleatoria los alacranes evolucionen y se adapten al entorno, alterando la secuencia de aminoácidos y la abundancia de péptidos y proteínas en su veneno.

## 10. CONCLUSIONES

Conclusión 1. Se corroboró que el veneno total del alacrán *Centruroides nigrescens* de ambas regiones, no es tóxico a mamíferos. Ambos venenos son fatales para los insectos (grillos) y para los crustáceos (cochinillas).

Conclusión 2. Se demostró una migración y separación de los componentes de los venenos diferente en los geles de poliacrilamida, además, existe una ausencia o una concentración relativa distinta en los componentes del veneno del alacrán *C. nigrescens* de Zihuatanejo a comparación del que proviene de Quechultenango.

Conclusión 3. Existen diferencias entre la cantidad de fracciones obtenidas entre los venenos, teniendo en cuenta que en el veneno del alacrán *C. nigrescens* de la región de Zihuatanejo presenta 72 péptidos, mientras que el alacrán de Quechultenango presenta en su veneno 65 péptidos.

Conclusión 4. De acuerdo con la secuenciación de las regiones N-terminal de los principales péptidos de ambos venenos, se demuestra que existen diferencias en los aminoácidos que conforman la cadena peptídica, lo que probablemente influye en que las proteínas se plieguen de manera diferente.

## 11. PERSPECTIVAS

Se requieren ampliar los estudios faunísticos de las regiones en las que se encuentra el alacrán *Centruroides nigrescens*, para conocer con exactitud si las especies de animales de las que se puede alimentar este alacrán tienen una relación directa que pueda influir en la composición química de su veneno, sin embargo, existen muchos otros factores bióticos y abióticos de los cuales también deberán de hacerse estudios para conocer si el conjunto de estos factores o factores independientes tienen relación entre sí y que estos puedan influir en la composición química de los venenos de los alacranes.



## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Asmari, A.K., Kunnathodi, F., Al Saadon, K., Idris, M.M. (2016). Elemental analysis of scorpion venoms, *J. Venom Res.*, 7, 16-20.
- Almeida, F.M., Pimenta, A.M.C., De Figueiredo, S.G., Santoro, M.M., Martin-Eauclarie, M.F., Diniz, C.R., De Lima, M.E. (2002). Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. *Toxicon*, 40, 1041-1045.
- Batista, C., Román-González, S. A., Salas-Castillo, S. P., Zamudio, F. Z., Gómez-Lagunas, F., & Possani, L. D. (2007). Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical physiological comparison with other *Tityus* species. *Comp Biochem and Physic.*, 147-157.
- Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L. (2007). Bioquímica (6a ed) Barcelona: Editorial Reverté. 25-57.
- Bernardes-Oliveira, E., Farias, K.J.S., Gomes, D.L., de Araújo, J.M.G., da Silva, W.D., Rocha, H.A.Q., Donadi, E.A., de Fernandes-Pedrosa, M.F., de Crispim, J.C.O. (2019). *Tityus serrulatus* Scorpion Venom Induces Apoptosis in Cervical Cancer Cell Lines. *Evid. Based Complementary Altern. Med.*, 1-8.
- Bordon, K.C.F., Wiezel, G.A., Amorim, F.G., Arantes, E.C. (2015). Arthropod venom Hyaluronidases: Biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 21, 43.
- Carballar-Lejarazú, R., Rodríguez, M.H., De la Cruz Hernández-Hernández, F., Ramos-Castañeda, J., Possani, L.D., Zurita-Ortega, M., Reynaud-Garza, E., Hernández-Rivas, R., Loukeris, T., Lycett, G., *et al.* (2008). Recombinant scorpine: A multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65, 3081-3092.
- Chow, C.Y., Chin, Y.K.Y., Walker, A.A., Guo, S., Blomster, L.V., Ward, M.J., Herzig, V., Rokyta, D.R., King, G.F. (2020). Venom Peptides with Dual Modulatory

- Activity on the Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.1 Provide Novel Leads for Development of Antiepileptic Drugs. *ACS Pharm. Transl. Sci.*, 3, 119-134.
- CONABIO. (2019). Catálogo de autoridades taxonómicas de los invertebrados no artrópodos con distribución en México. Base de datos SNIB-CONABIO, México.
- Conde, R., Zamudio, F.Z., Rodríguez, M.H., Possani, L.D. (2000). Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett.*, 471, 165-168.
- Corona, M., Coronas, F., Merino, E., Becerril, B., Gutiérrez, R., Rebolledo-Antúnez, S., García, D., Possani, L. D. (2003). A novel class of peptide found in scorpion venom with neurodepressant effects in peripheral and central nervous system of the rat.
- De Armas, L., Martín-Frías, E., Estévez-Ramírez, J. (2003). Lista anotada de las especies mexicanas del género *Centruroides* Marx, 1890. (Scorpiones: Buthidae). *Rev Iber Aracnol.*, 8, 93-98.
- De Melo, E.T., Estrela, A.B., Santos, E.C.G., Machado, P.R.L., Farias, K.J.S., Torres, T.M., Carvalho, E., Lima, J.P.M.S., Silva-Junior, A.A., Barbosa, E.G., *et al.* (2015). Structural characterization of a novel peptide with antimicrobial activity from the venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus*. *Peptides*, 68, 3-10.
- Diego-García, E., Schwartz, E., D'Suze, G., Roman-González, S., Batista, C., García, B., de la Vega, R., Possani, L. D. (2007). Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: Identification of "orphan" components.
- Dyason, K., Brandt, W., Prendini, L. (2002). Determination of species-specific components in the venom of Parabuthus scorpions from southern Africa using matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. 768-773.

- Edman, P., & Begg, G. (1967). A protein sequenator. *Europen J. Biochem.*, 1, 80-91.
- Fletcher, P.L., Fletcher, M.D., Weninger, K., Anderson, T.E., Martin, B.M. (2010). Vesicle-associated Membrane Protein (VAMP) Cleavage by a New Metalloprotease from Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *J. Biol. Chem.*, 285, 7405-7416.
- García-Guerrero, A, I. (2018). Caracterización bioquímica de los componentes del veneno del alacrán *Centruroides ornatus*, una especie de interés médico. Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca Mor. 1-89.
- Giller, P.S. (1984). Community structure and the niche. Chapman & Hall, London.
- González, S, E. (2014). "Diversidad, taxonomía y hábitat de alacranes". Instituto de Biología, UNAM. México. 25-35.
- Gómez Rave, L.J., Muñoz Bravo, A.X., Sierra Castrillo, J., Román Marín, L.M., Corredor Pereira, C. (2019). Scorpion Venom: New Promise in the Treatment of Cancer. *Acta Biol Colomb.*, 24, 213-223.
- Gurrola, G.B., Hernández-López, R., de la Vega, R., Varga, Z., Batista, C.F., Salas-Castillo, S., Panyi, G., Del Rio Portilla, F., Possani, L. D. (2012). Structure, function and chemical synthesis of *Vaejovis mexicanus* peptide 24: A novel potent blocker of Kv1.3 potassium channels of human T lymphocytes.
- Hernández-Aponte, C.A., Silva-Sánchez, J., Quintero-Hernández, V., Rodríguez-Romero, A., Balderas, C., Possani, L. D., Gurrola, G. (2011). Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus*. *Toxicon*, 57, 84–92.
- Hutchinson, G.E. (1980). Ecología de poblaciones. Ed Blume, Barcelona.
- Illold, P., Escalante, T. (2008). De los modelos de nicho ecológico a las áreas de distribución geográfica. *Biogeografía*, 3, 6-12.

- INEGI. (2020). Carta de Climas 1:1 000 000, obtenido de [www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/gro/territorio/clima](http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/gro/territorio/clima)
- Li, Q., Zhao, Z., Zhou, D., Chen, Y., Hong, W., Cao, L., Yang, J., Zhang, Y., Shi, W., Cao, Z. (2011). Virucidal activity of a scorpion venom peptide variant mucroporin-M1 against measles, SARS-CoV and influenza H5N1 viruses. *Peptides*, 32, 1518-1525.
- Li, Z., Hu, P., Wu, W., Wang, Y. (2019). Peptides with therapeutic potential in the venom of the scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Peptides*, 115, 43-50.
- Miyashita, M., Otsuki, J., Hanai, Y., Nakagawa, Y., Miyagawa, H. (2007). Characterization of peptide components in the venom of the scorpion *Liocheles australasiae*. (Hemoscopiidae). *Toxicon*. 428-437.
- Olamendi-Portugal, T., Resstano-Cassulini, R., Riaño-Umbarila, L., Becerril, B., Possani, L. (2016). Functional and immuno-reactive characterization of a previously undescribed peptide from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus*, *Peptides*, 87, 34-40.
- Ortíz, E., Gurrola B., G., Schwartz, E. F., & Possani, L. D. (2015). Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon*, 93, 125-135.
- Ortiz, E., Rendón-Anaya, M., Rego, S.C., Schwartz, E.F., Possani, L. D. (2014). Antarease-like Zn-metalloproteases are ubiquitous in the venom of different scorpion genera. *Biochim. Biophys.*, 1738–1746.
- Parente, A.M.S., Daniele-Silva, A., Furtado, A.A., Melo, M.A., Lacerda, A.F., Queiroz, M., Moreno, C., Santos, E., Rocha, H.A.O., Barbosa, E.G., *et al.* (2018). Analogs of the Scorpion Venom Peptide Stigmurin: Structural Assessment, Toxicity, and Increased Antimicrobial Activity. *Toxins*, 10, 161.
- Peterson, A. (2006). Uses and requirements of ecological niche models and related distributional models. *Biodiversity informatics*, 3, 79-72.
- Pianka, E.R. (1982). *Ecología evolutiva*. Ediciones Omega S.A., Barcelona. 365

- Pimenta, A., De Marco, F., De Lima, M., Marin-Eauclaire, M., Bougis, P. (2003). Individual variability in *Tytus serrulatus* (Scorpiones: Buthidae) venom elicited by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.
- Polis, G. (1990). *The Biology of Scorpions*; Stanford University Press: Palo Alto, CA, USA.
- Ponce-Saavedra, J., & Francke, O, F. (2013). “Actualización taxonómica sobre alacranes del Centro Occidente de México”. Laboratorio de Entomología “Biol. Sócrates Cisneros Paz”. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; Colección Nacional de Arácnidos. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 73-77.
- Ponce-Saavedra, J., Francke, O, F., Quijano-Ravell, A., Cortés-Santillán, R. (2016). “Alacranes (Arachnida:Scorpiones) de importancia para la salud pública en México”. Univerasidad Nacional Autónoma de México. Folia Entomológica Mexicana (*nueva serie*), 2(3): 45–70. 44-77.
- Possani, L.D. (1984). Structure of scorpion toxins. In *Handbook of Natural Toxins*; Tu, A.T., Ed.; Marcel Dekker Inc: New York, NY., 2, 513–550.
- Possani, L. D., Becerril, B., Delepierre, M., Rytgat, J. (1999). Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup>channels. *Eur. J. Biochem. FEBS.*, 264, 287-300.
- Possani, L. D. (2005). “El alacrán y su piquete”. Ciudad Universitaria UNAM, México D.F. 6-24.
- Possani, L. D. (2007). “El estudio de los componentes del veneno de alacranes en el contexto de la biología molecular, la farmacología y la medicina”. *Biotecnología*, 14, 177-187.
- Pucca, M.B., Peigneur, S., Cologna, C.T., Cerni, F.A., Zoccal, K.F., Bordon, K.D.C.F., Faccioli, L.H., Tytgat, J., Arantes, E.C. (2015). Electrophysiological characterization of the first *Tityus serrulatus* Alpha-like toxin, Ts5: Evidence of a pro-inflammatory toxin on macrophages. *Biochimie.*, 115, 8-16.

- Ramírez-Carretero, S., Quintero-Hernández, V., Jiménez-Vargas, J.M., Corzo, G., Possani, L.D., Becerril, B., Ortiz, E. (2012). Gene cloning and functional characterization of four novel antimicrobial-like peptides from scorpions of the family Vaejoidea. *Peptides*, 34.
- Rein-Ove, J. (7 de abril de 2021). The Scorpion files, obtenido de [https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/higher\\_phylogeny.php](https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/higher_phylogeny.php)
- Riaño-Umbarila, L., Rodríguez-Rodríguez, E., Santibañez-López, C., Guereca, L., Uribe-Romero, S., Gómez-Ramírez, I., Becerril, B. (2017). Updating knowledge on new medically important scorpion species in Mexico. *Toxicon*, 138, 130-137.
- Rigo, F.K., Bochi, G.V., Pereira, A.L., Adamante, G., Ferro, P.R., Dal-Toé De Prá, S., Milioli, A.M., Damiani, A.P., da Silveira Prestes, G., Dalenogare, D.P., *et al.* (2019). TsNTxP, a non-toxic protein from *Tityus serrulatus* scorpion venom, induces antinociceptive effects by suppressing glutamate release in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 855, 65-74.
- Rodríguez de la Vega, R., Possani, L.D. (2004). Current views on scorpion toxins specific for K<sup>+</sup>-channels. *Toxicon*, 43, 865-875.
- Rodríguez de la Vega, R., Schwartz, E., & Possani, L. D. (2010). Mining on Scorpion venom biodiversity. *Toxicon*, 56, 1152-1161.
- Ruiming, Z., Yibao, M., Yawen, H, *et al.* (2010). Comparative venom gland transcriptome analysis of the scorpion *Lychas mucronatus* reveals intraespecific toxic gene diversity and new venomous components. *BMC Genom.*, 11-452.
- Santibañez-López, C., Francke, O., Ureta, C., & Possani, L. D. (2016). Scorpions from Mexico: From Species Diversity to Venom Complexity. *Toxins*, 8(2), 1-18.
- Schwartz, E.F., Camargos, T.S., Zamudio, F.Z., Silva, L.P., Bloch, C., Caixeta, F., Schwartz, C.A., Possani, L.D. (2008). Mass spectrometry analysis, amino

- acid sequence and biological activity of venom components from the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon*, 51, 1499-1508.
- Schwartz, E.F., Schwartz, C.A., Gómez-Lagunas, F., Zamudio, F., Possani, L.D. (2006). HgeTx1, the first K<sup>+</sup>-channel specific toxin characterized from the venom of the scorpion *Hadrurus gertschi* Soleglad.
- Soberón, J. & Miller, C.P. (2009). Evolución de los Nichos Ecológicos. Universidad de Kansas, Lawrence, KS, 49, 83-99.
- Tay-Zavala, Díaz-Sánchez, G. J., Sánchez-Vega, Alarcón-Castillo, L., Ruíz-Sánchez, D., & Romero, C. L. (2004). "Picaduras por alacranes y arañas ponzoñosas de México". *Rev Fac Med.*, 1, 6-12.
- Thien, T.V., Anh, H.N., Trang, N.T.T., Trung, P.V., Khoa, N.C., Osipov, A.V., Dubovskii, P.V., Ivanov, I.A., Arseniev, A.S., Tsetlin, V.I. (2017). Low-molecular-weight compounds with anticoagulant activity from the scorpion *Heterometrus laoticus* venom. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 476, 316-319.
- Tiwari, A.K., Mandal, M.B., Deshpande, S.B. (2009). Role of serotonergic mechanism in gastric contractions induced by Indian Red Scorpion (*Mesobuthus tamulus*) venom. *Indian J. Pharm.*, 41, 255-257.
- Torres-Larios, A., Gurrola, G.B., Zamudio, F.Z., Possani, L. D. (2000). Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*, *Eur. J.*
- Tran, T.V., Hoang, A.N., Nguyen, T.T.T., Phung, T.V., Nguyen, K.C., Osipov, A.V., Ivanov, I.A., Tsetlin, V.I., Utkin, Y.N. (2017). Anticoagulant Activity of Low-Molecular Weight Compounds from *Heterometrus laoticus* Scorpion Venom. *Toxins*, 9, 343.
- Valdez-Cruz, N.A., Batista, C.V.F., Possani, L. D. (2004). Phaiodactylipin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A2, from the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *Eur. J. Biochem.*, 271, 1453–1464.

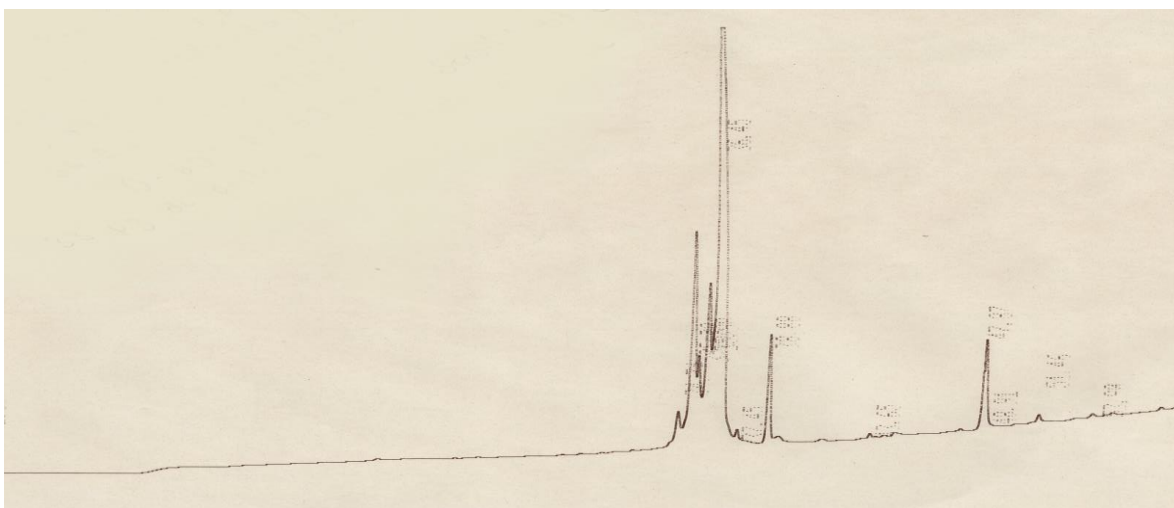
- Valdez-Cruz, N.A., Segovia, L., Corona, M., Possani, L. D. (2007). Sequence analysis and phylogenetic relationships of genes encoding heterodimeric phospholipases A2 from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*.
- Valdez-Velazquéz, L. L., Quintero-Hernández, V., Romero-Gutiérrez, M. T., Corona, F. I., & Possani, L. D. (2013). Mass fingerprinting of the venom and transcriptome of venom gland of Scorpion *Centruroides tecomanus*. *PLOS one*, 8(6), 1-15.
- Valdez-Velázquez, L. L., Olamendi-Portugal, T., Restano-Cassulini, R., Zamudio, F. Z., & Possani, L. D. (2018). Mass fingerprinting and electrophysiological analysis of the venom from the scorpion *Centruroides hirsutipalpus* (Scorpiones: Buthidae). *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 24, 17.
- Valdivia, H.H., Martin, B.M., Ramírez, A.N., Fletcher, P.L., Possani, L.D. (1994). Isolation and pharmacological characterization of four novel Na<sup>+</sup> channel-blocking toxins from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *J. Biochem.*, 116, 1383-1391.
- Varga, Z., Gurrola, G.B., Papp, F., de la Vega, R., Pedraza-Alva, G., Tajhya, R.B., Gaspar, R., Cárdenas, L., Rosenstein, Y., Beeton, C. (2012). Vm24, a natural immunosuppressant peptide potently and selectively blocks Kv1.3 potassium channels of human T cells. *Mol. Pharmacol.*, 82, 372–382.
- Xiao, L., Gurrola, G.B., Zhabag, J., Valdivia, C.R., SanMartin, M., Zamudio, F.Z., Zhang, L., Possani, L.D., Valdivia, H.H. (2016). Structure-function relationships of peptides forming the calxin family of ryanodine receptor ligands. *J. Gen. Physiol.*, 147, 375-394.
- Zhao, Z., Hong, W., Zeng, Z., Wu, Y., Hu, K., Tian, X., Li, W., Cao, Z. (2012). Mucroporin-M1 Inhibits Hepatitis B Virus Replication by Activating the Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Pathway and Down-regulating HNF4 $\alpha$  in Vitro and in Vivo. *J. Biol. Chem.*, 287, 30181-30190.



## 13. MATERIAL SUPLEMENTARIO

### 13.1 Repurificación del péptido 47 reducido y alquilado del veneno del alacrán *Centruroides nigrescens* región Zihuatanejo

Para la secuenciación y comparación entre los péptidos principales de ambos venenos se repurificó la fracción 47 reducida y alquilada (Fig. 1s) con un T, R de 35.23 con PM 7134.7, se inyectó 33 µg de proteína al equipo HPLC, la corrida se realizó en una columna C18 analítica, la muestra obtenida se colectó manualmente y se le determinó su peso molecular para verificar que se trata del componente principal.



**Figura 1s.** Repurificación de la fracción 47 reducida y alquilada del veneno del alacrán *C. nigrescens* de Zihuatanejo mediante RP-HPLC, utilizando una columna C18 analítica, con un gradiente de 0-60% B/60 min



El Jicarero, Jojutla, Morelos, 16 de Abril 2021.

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**PRESENTE.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Licenciado en Biología: **C. JOSÉ NOÉ VÁZQUEZ RAMÍREZ**, con el título del trabajo: **CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DEL VENENO DEL ALACRÁN *Centruroides nigrescens***

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI

VOTO EN CONTRA: \_\_\_\_\_

NECESITA ARREGLAR O ELIMINAR ALGO: \_\_\_\_\_

COMENTARIOS: \_\_\_\_\_

**ATENTAMENTE**

\_\_\_\_\_  
**Dra. Georgina Garrota Briones**



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

GEORGINA GURROLA BRONES | Fecha: 2021-06-16 17:28:42 | Firmante  
 aDnTfwTAKDLGc10S8Kro8dF40UyqRvJ9J429WAnrFMUyglQc2u1GpTQeO6wR0RLLpFKUCb+N1uU15b6uHTJaCka3Yl9mQH0dMRa+YRSJRdbH4uS3VUP5T1?F0hA2S0m0K9K0Vggh8f13Ld8m6AU8eZ05/OVL9t866uJ87amb6H8R3L17v0qSPASWuAD00uATNPz+KUNM4M8yyA8hKZTadV988r06T0p8La0A9C0K08vV73P137UyQC0r19zTMDR1g2SSAydR8S78u2y78y8yM8ta+uPq+3doYK462q8O==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[Gf8xdi](#)

<https://efirma.uaem.mx/Repudio/vpMqGn81DnRj8gUk3hTR8U12y0j>



Una universidad de excelencia

RECTORIA  
2017-2022



El Jicarero, Jajulla, Morelos, 16 de Abril 2021.

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**PRESENTE.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Posante de Licenciado en Biología: **C. JOSÉ NOÉ VÁZQUEZ RAMÍREZ**, con el título del trabajo: **CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DEL VENENO DEL ALACRÁN *Centruroides nigrescens***

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI

VOTO EN CONTRA: \_\_\_\_\_

NECESITA ARREGLAR O ELIMINAR ALGO: \_\_\_\_\_

COMENTARIOS: \_\_\_\_\_

**ATENTAMENTE**

\_\_\_\_\_  
**Dra. Ma. Ventura Rosas Echeverría**



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

MA VENTURA ROSAS GONZALEZ | Fecha:2021-04-19 20:47:06 | Firmante:

ZcEPvMmT8Rz0zQ6wZ7nQw6T6Q1E+e08D00G0M+CoM0L YtrvH8s-Nu0R0g0u0J0wAMSP56k0R0u0n0LCT0rV0w0U0B0v0w0U0v00DF0F0V0H0g0M0u0M0C  
AC0P0L0E0M+gR0jv0E0R0b0S0G0C0c0EY0T0n0w0e0q0r0F0L0K0B0+Cu0F0e0u0D0W0D0h0Z0W0g0C0n0D0M0Q0n0w07J0e0M0g0l0n0I0G0T0B0+M0Q0e0n0Y0D0g0V0u0T0W0P0j  
V0h0Q0v0C0L0A0C0v0M0e0u0K0p0A0y0p0L0U0c0h0E0M0S0Z0n0j0p0p0H0g0h0v0s0t0e0K0L0L0z0g0F0n0F0m



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

[K2e4LE](#)

<https://firma.uaem.mx/Reputaci0n0Z0p0C1j0T0n0I0W0k0D0U0E0P0a0E0>



Una universidad de excelencia

SECTORIA  
2017-2022



El Jicarero, Jajala, Morelos, 16 de Abril 2021.

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**PRESENTE.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Licenciado en Biología: **C. JOSÉ NOÉ VÁZQUEZ RAMÍREZ**, con el título del trabajo: **CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DEL VENENO DEL ALACRÁN *Centruroides nigrescens***

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI

VOTO EN CONTRA: \_\_\_\_\_

NECESITA ARREGLAR O ELIMINAR ALGO: \_\_\_\_\_

COMENTARIOS: \_\_\_\_\_

**ATENTAMENTE**

\_\_\_\_\_  
**Mtra. María de los Ángeles Núñez Puente**



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

MARIA DE LOS ANGELES NUÑEZ PUENTE | Fecha: 2021-06-21 10:48:24 | Firmante  
 2icxGRASok1eWn0nJm9gshweGnTEx0aCzPTn6ZyL2BU5oaRbaWbR7Cp9pRacLz+GeG8k200pya+YFesjydn0Uo6Utpv77vG826DcoN7h0PkaUv6qjMhG806upP  
 C06caQpaxzUaw8eCzyY0Aju111yKQLAuP0Stu1+mlAuOw8epW6ZyeTIm6y+QJatCP8PpkYv1eufNtM82nng-Ra2bc2yrd0W0M2h6k8Zkzhy+Ad68UCYAC0hVCO  
 Um06LH+5mAutvsszHwus2KAvPec+poq27x8Oyd1pH6ET0ar7m880cm8g+\*

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
 escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



U2Bx0A

<http://veritas.uaem.mx/Reputaci6n/2VfRth6Auu8Ieg0epu8m8WU0z>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
 2017-2023

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**PRESENTE.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Licenciado en Biología: **C. JOSÉ NOÉ VÁZQUEZ RAMÍREZ**, con el título del trabajo: **CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DEL VENENO DEL ALACRÁN *Centruroides nigrescens***

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI

VOTO EN CONTRA: \_\_\_\_\_

NECESITA ARREGLAR O ELIMINAR ALGO: \_\_\_\_\_

COMENTARIOS: \_\_\_\_\_

**ATENTAMENTE**

\_\_\_\_\_  
**M. en C. Humberto Flores Bustamante**





Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

**HUMBERTO FLORES BUSTAMANTE | Fecha: 2021-06-16 14:28:41 | Firma:**

G/P4g+ev9vLWMykxOKkGGTAV98CM7yE6K/QPaf7L4tF2h6uLjvDx0TtF7BqHT6r1N6tAgouJGnt6Kw6obuycv+h759e0CjocL6D0omk0d0e0Hy6M+HxvF950y6t  
wH6CJGR5dhngeH+8Cu7b0V6ndrHFQvLxK2u26tr1t0A1jy20pCRzN0C7wG26t0cu966v0y9Gnt6Q+6AMCJ0z6.dQ6hUAd0uKUMy21T7gl\_Au0C06v9H4\_R06t  
LMSu0G06wK3G0x152rCuz2Qv6N6Fv0C06W66W6nt6C06g72h6y7vV06\*\*

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[e07830a](#)

<http://firma.uaem.mx/ReporteGeyK0XLEKtHvWozvU2667spRt1>



Una universidad de excelencia

SECTORIA  
2017-2023

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**PRESENTE.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Licenciado en Biología: **C. JOSÉ NOÉ VÁZQUEZ RAMÍREZ**, con el título del trabajo: **CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DEL VENENO DEL ALACRÁN *Centruroides nigrescens***

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI

VOTO EN CONTRA: \_\_\_\_\_

NECESITA ARREGLAR O ELIMINAR ALGO: \_\_\_\_\_

COMENTARIOS: \_\_\_\_\_

**ATENTAMENTE**

\_\_\_\_\_  
**M. en M. Isaura Quintana Padilla**



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

**DAURA QUINTANA PADILLA | Fecha:2021-04-26 16:36:34 | Firma:**  
 sSAuM5GACTV9Dy2r5n5coZTEuKvICa66-Hpup9Y-5YD94DQp-CuZn5h5GQu0hCupnH5g6H5RojA2u5aC6h765dy-vr1sJ4NDvWH-g9auT591r5h56h5D0G0L2994502DW  
 13R6i9Rv9KJouL0C0u5G9M555HLL5c365up67K9y5g9GCE25a51ebc7yM0Y9hZaM55vQ5na5DKu5v5t5V3P5h5a5C5e5h5P56E5h5a5G5e5p5h5-85p5-5P5-11p55P5v  
 Y1Z1vN5U4OP5k5p5+5A5u455h5vA5o5R5u5k5p55k5y5k02H5m505zT5m5C595M5Q251G255Q5=

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



0h505

<https://www.uaem.mx/Repositorio/UAEM/COO/verificar/050505195ca5P5>



Una universidad de excelencia

SECTORIA  
2017-2022