

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS



IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y TAXONÓMICA DE ALACRANES
DEL ESTADO DE CHIHUAHUA

Carmen Carolina Alvarado González

TESIS QUE PRESENTA PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN FORMACIÓN BIOMÉDICA



**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y TAXONÓMICA DE ALACRANES
DEL ESTADO DE CHIHUAHUA**

Tesis presentada para obtener el grado de:

**MAESTRO EN FORMACIÓN
BIOMÉDICA**

Nombre del tesista: Carmen Carolina Alvarado González

Nombre del director: Dr. Gerardo Pável Espino Solis

Nombre del Co director: Iván Arenas Sosa

Asesoras: Dra. Susana Aideé González, Dra. María Cecilia Ishida Gutiérrez

Chihuahua, Chihuahua., México

Diciembre 2021

Línea de investigación: Venenos

Sublínea de investigación: Bioquímica y Biología Molecular

Equipo de investigación: Laboratorio de Investigación Traslacional

Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la

UACH México

Web: www.fm.uach.mx

Correo: p274265@uach.mx

Chihuahua, México, 2021

© Universidad Autónoma de Chihuahua

© Los autores

Todos los derechos reservados. Se permite la distribución, uso y copia citando la fuente completa.



UNIVERSIDAD Y CONSEJO
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih. A 14 de diciembre de 2021

Dra. Bertha O. Larrinua Pacheco
Secretaria de Investigación y Posgrado
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
PRESENTE:

Por medio de la presente nos permitimos informar a usted que el **C. CARMEN CAROLINA ALVARADO GONZALEZ**, con número de matrícula **274265**, ha concluido la elaboración de la tesis **IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y TAXONÓMICA DE ALACRANES DEL ESTADO DE CHIHUAHUA**, como requisito para obtener el grado de: **Maestro en Formación Biomédica**.

Así mismo, manifestamos que la tesis ha sido revisada y aprobada por los abajo firmantes, miembros del Comité de Grado.

Sin otro particular, quedamos de usted.

ATENTAMENTE

Director de Tesis
Dr. Gerardo Pável Espino Solís

Co-Director de Tesis
Dr. Iván Arenas Sosa

Asesor de Tesis
Dra. Susana Alejé González Chávez

Asesor de Tesis
Dra. María Cecilia Ishida Gutiérrez

“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”

(Isaac Newton)

Dedicada con amor

*Dedico este trabajo a mis padres
Raúl Alvarado y Carmen González, por
todo su cariño y apoyo a través de los años,
por creer en mi e impulsarme a seguir mis sueños,
sin ustedes nada de esto sería posible.*

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por estar presente durante este camino. A mi papá por ser un elemento indispensable en la colecta de alacranes, sin tu ayuda no habría empezado este proyecto. A mi mamá por todo su apoyo y por siempre impulsarme a no conformarme.

Al Doctor Espino, el “doc”, por la confianza que deposito en mí para el desarrollo de este proyecto, por sus continuas enseñanzas y por su paciencia, por su apoyo en todo momento, por siempre dedicarme tiempo a pesar de todas sus ocupaciones, por su guía e inculcarme las ganas de seguir estudiando.

Al Doctor Corzo y el Doctor Iván por su disposición, sus enseñanzas y su ayuda en todo momento, por su participación en el proyecto, y por la ayuda durante la recolección de alacranes. Agradezco a mis asesoras, la Doctora Susana González y la Doctora Cecilia Ishida por su disposición, apoyo, aportaciones y disponibilidad para concluir este proyecto.

A todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio, por su ayuda incondicional, sus palabras de aliento y por todos los buenos y malos momentos que hemos compartido, desde esas platicas acompañadas con café, hasta los malos días de experimentos fallidos, ha sido un honor compartir tantos momentos con ustedes y verlos superarse cada día más.

A mis compañeros y amigos durante este posgrado, por estar presentes en tantos momentos.

En fin, mi más sincero agradecimiento a todas y cada una de las personas involucradas que de una u otra manera estuvieron vinculadas con el desarrollo de este proyecto.

Este trabajo fue en el Laboratorio de Investigación Traslacional y la Sede en Chihuahua del Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo, ubicado en la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la UACH. Bajo la dirección del Dr. Gerardo Pável Espino Solis, el desarrollo del mismo fue financiado en parte con donativos otorgados al Dr. Espino de CONACyT Ciencia Básica: A1-S-53789, Conacyt en la convocatoria de laboratorios Naciones 2021 No. 315807 y Apoyo para Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación en Salud COVID-19 No. 312147. Apoyos Para Acciones De Fortalecimiento, Articulación de Infraestructura y Desarrollo de Proyectos Científicos, Tecnológicos y de Innovación en Laboratorios Nacionales CONACYT 2021. Apoyo para el desarrollo de inmunoterapias aplicadas en el Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo No. 315807. Se agradece al grupo del Dr. Gerard Zurawski del Baylor Institute for Immunology Research y a los Dres. Lourival D. Posani y Gerardo Corzo por su aporte de reactivos críticos para el desarrollo de este proyecto.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN	11
II.	MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES.....	13
2.1	<i>Morfología</i>	13
2.2	<i>Propiedades de los componentes de los venenos</i>	17
2.3	<i>Aplicaciones clínicas de los compuestos de venenos de alacrán</i>	18
2.4	<i>Péptidos antibacterianos</i>	18
2.5	<i>Escherichia coli</i>	19
2.6	<i>Enterococcus faecalis</i>	19
2.7	<i>Inmunomoduladores</i>	20
2.8	<i>Péptidos con actividad antineoplásica</i>	21
2.9	<i>Péptidos con actividad fosfolipasa</i>	23
III.	DELIMITACIÓN DEL OBJETO DE ESTUDIO.....	25
3.1	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA PREGUNTA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	25
3.2	HIPÓTESIS	26
3.3	OBJETIVOS.....	26
3.3.1	OBJETIVO GENERAL	26
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
IV.	JUSTIFICACIÓN	27
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1	DISEÑO DEL ESTUDIO	29
5.2	POBLACIÓN DE ESTUDIO	29
5.2	DEFINICIÓN DE VARIABLES	29
5.3	TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	30
5.3.1	<i>Material biológico</i>	30
5.3.2	<i>Extracción de ADN, Amplificación y Secuenciación</i>	30
5.3.3	<i>Clasificación taxonómica</i>	32
5.3.4	<i>Obtención del veneno</i>	32
5.3.5	<i>Método para determinación de actividad antimicrobiana</i>	33
5.3.6	<i>Método para la determinación de actividad fosfolipasa</i>	33
5.3.7	<i>Consideraciones éticas</i>	34
•	<i>Instalaciones</i>	34
•	<i>Equipo para alojamiento de los animales</i>	34

• <i>Alimentación y provisión de agua</i>	35
• <i>Técnicas experimentales</i>	35
VI. RESULTADOS	36
6.1 <i>Extracción de ADN</i>	36
6.2 <i>Análisis taxonómico</i>	36
6.3 <i>Análisis filogenético</i>	38
6.4 <i>Ensayo de búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana</i>	41
6.5 <i>Prueba de actividad fosfolipasa</i>	42
6.6 TESIS	43
Figura 12. Diagrama ilustrativo del proceso metodológico de esta investigación	43
VII. DISCUSIÓN	44
VIII. CONCLUSIONES	48
IX. REFERENCIAS	49
X. ANEXOS	55
<i>Anexo 1</i>	55
<i>Cromatograma del veneno del alacrán Chihuahuanus crassimanus</i>	55
<i>Prueba de actividad antimicrobiana con fracciones de veneno del alacrán Chihuahuanus crassimanus</i>	56
<i>Prueba de actividad fosfolipasa con fracciones de veneno del alacrán Chihuahuanus crassimanus</i>	57
<i>Anexo 2</i>	58
<i>Anexo 3</i>	59
<i>Anexo 4</i>	60
<i>Anexo 5</i>	61
<i>Protocolo para limpieza de ADN de producto de PCR y gel de agarosa</i>	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales componentes aislados de veneno de alacranes Mexicanos.....	12
Figura 2. Morfología típica de un alacrán.....	14
Figura 3. Partes morfológicas de un alacrán.....	15
Figura 4. Alacrán <i>Chihuahuanus</i>	16
Figura 5. Sitios de acción de las fosfolipasas y estructura del glicerofofolípido.....	24
Figura 6. Productos de PCR amplificados.....	36
Figura 7. Identificación Morfológica.....	37
Figura 8. Análisis Filogenético del gen 12S.....	38
Figura 9. Análisis Filogenético del gen 16S.....	39
Figura 10. Análisis Filogenético del gen COI.....	40
Figura 11. Prueba de péptidos antimicrobianos.....	41
Figura 12. Prueba de actividad fosfolipasa.....	42
Figura 13. Diagrama ilustrativo del proceso metodológico de esta investigación.....	43
Figura 14. Análisis de veneno por medio de HPLC.....	55
Figura 15. Prueba de actividad antimicrobiana en bacteria <i>Acinetobacter baumannii</i>	56
Figura 16. Prueba de actividad enzimática.....	57
Figura 17. Comparación de análisis filogenético.....	58

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sitios de acción de las fosfolipasas.....	24
Tabla 2. Variables y sus características.....	29
Tabla 3. Marcadores moleculares utilizados.....	31
Tabla 4. Configuración de temperatura y tiempo para cada paso de la reacción de PCR usada para amplificar las secuencias.....	32

I. INTRODUCCIÓN

Los alacranes representan a uno de los organismos más antiguos, han existido aproximadamente desde hace 400 millones de años, y han logrado desarrollar mecanismos de defensa a lo largo de este tiempo. Se han adaptado a casi todos los ambientes, su mayor distribución se puede encontrar en los ambientes tropicales de la tierra, pero de manera sorprendente se adaptaron bien al clima desértico. En México se pueden encontrar alrededor de casi 2231 especies en 208 géneros y 20 familias que existen en el mundo, hasta la fecha se sabe que en México hay 8 especies peligrosas para los humanos, entre los estados más afectados se encuentran Jalisco, Morelos, Guerrero, Nayarit, Guanajuato, Michoacán, Puebla, Durango y el Estado de México (1). Los Alacranes comprenden una diversa y altamente exitosa orden de arácnidos. La presencia de alacranes en Chihuahua no es realmente un foco de atención, ya que se encuentran en zonas aisladas a las ciudades, o en la Sierra de Chihuahua, sin embargo aun cuando no presentan un problema epidemiológico, con base en estudios previos en alacranes que no son de importancia médica, se sabe que el veneno de los alacranes puede ser una fuente rica de diversos compuestos que pueden tener aplicación en el área de la salud.

La identificación de los componentes del veneno del alacrán (en su mayoría péptidos y proteínas), y la clonación de los genes respectivos son algunos de los aspectos más estudiados de los alacranes mexicanos (2). Los alacranes utilizan sus venenos para capturar presas o defenderse de los depredadores. Millones de años de evolución les ha permitido seleccionar y ampliar su repertorio de péptidos o proteínas específicas con actividad enzimática que normalmente interfieren con la comunicación celular entre las células de los individuos cuando los alacranes inyectan el veneno. Los péptidos identificados son ligandos que bloquean o modifican la función de los canales iónicos. Cabe resaltar que su función es bastante selectiva. Hay péptidos que reconocen solo canales de iones de mamíferos, crustáceos o insectos (3). Estos componentes de los venenos son específicos para las especies, dos componentes principales han sido encontrados y descritos, los primeros son péptidos que enlazan a los canales de sodio y modifican los mecanismos de apertura (4) los segundos son péptidos que reconocen canales de potasio y bloquean su función (4,5). Otros componentes descritos que se han encontrado en los venenos son los que reconocen los canales de calcio (6), enzimas específicas que actúan como factores de

propagación como las hialuronidasas están presentes en todos los venenos de los alacranes estudiados a la fecha (2) de manera sobresaliente las enzimas hidrolíticas, como las fosfolipasas o metaloproteinasas pueden también estar presentes en los venenos (7). En estudios recientes en alacranes mexicanos pertenecientes a la familia *Centruroides*, se han identificado diferentes péptidos relevantes, los cuales se ilustran en la figura que representa la distribución de componentes farmacológicos importantes. Los péptidos más abundantes descritos son los que modifican los mecanismos de apertura de los canales de Na^+ , o bloquean las funciones de canales de K^+ estos componentes son los responsables del proceso de la intoxicación en humanos. Muchas enzimas han sido identificadas y descritas sus funciones, péptidos anti parasíticos que tienen efectos contra la malaria, etc. (3).

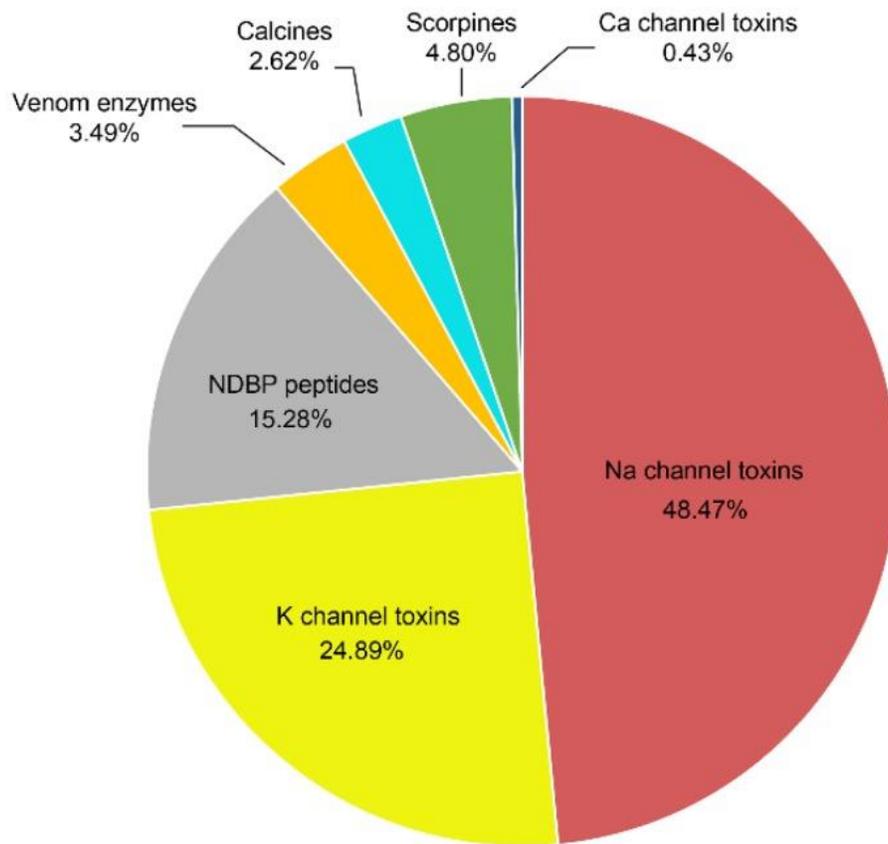


Figura 1. Principales componentes aislados de veneno de alacranes Mexicanos. Proporción de los diferentes péptidos aislados del veneno de los escorpiones mexicanos, Santibáñez-López, et al., 2015

II. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

2.1 Morfología

La morfología de los alacranes está dividida en dos partes principales conocidas como prosoma o cefalotórax en el que se encuentra un caparazón sin segmentos y el opistosoma que se divide en dos partes, el mesosoma (cuerpo) que se encuentra dividido en siete segmentos y el metasoma (cola) que contiene cinco segmentos (figura 2) (8,9). Todas las especies de alacranes conocidas actualmente muestran la misma morfología, las únicas diferencias que se presentan son distintas dimensiones dependiendo de la especie y sus coloraciones que abarcan desde colores claros como el amarillo claro a colores más oscuros incluso el color negro (10). En el prosoma se encuentran los ojos del alacrán, un par en la parte central y de dos a cinco pares dependiendo de la especie ubicados al frente en los extremos laterales (figura 3A), la boca está compuesta de pequeñas pinzas llamadas quelíceros que ayudan a desmenuzar a sus presas para consumirlas, un par de pinzas llamadas pedipalpos cuya función es la de atrapar a sus presas y para defenderse, además de ser utilizados para excavar madrigueras y para el cortejo, estos además están cubiertos de cabellos sensoriales (figura 3B). La clasificación taxonómica de algunas especies se realiza por medio del número de las pectinas (figura 3C) con las que cuentan los especímenes, tal es el caso del género *Chihuahuanus*, dependiendo del sexo del alacrán, Williams en 1968 (11), estandarizó las medidas de sus partes morfológicas, dando a conocer un estándar de tamaño para las diferentes especies con las que trabajó, además de contar el rango promedio de pectinas pertenecientes a la especie dependiendo si se trataba de machos o hembras, en total Williams recolectó 227 especímenes a lo largo de dos años, las mediciones que tomó fueron por medio de un microscopio equipado, con un micrómetro calibrado.

Los alacranes tienen una amplia distribución geográfica, muchos viven en la superficie, otros bajo cortezas, piedras y hojarasca, son nocturnos y se esconden durante el día en lugares húmedos y oscuros (9). Los alacranes pueden percibir su entorno por medios visuales, táctiles y por órganos quimiosensoriales. Son incapaces de formar imágenes claras pero sus ojos centrales son de los más sensibles receptores de luz conocidos en el reino animal lo que les permite moverse fácilmente por las noches, sus ojos laterales son solo capaces de sentir los cambios de la intensidad de la luz y ayudan a poder establecer los ritmos diarios de actividad (8).

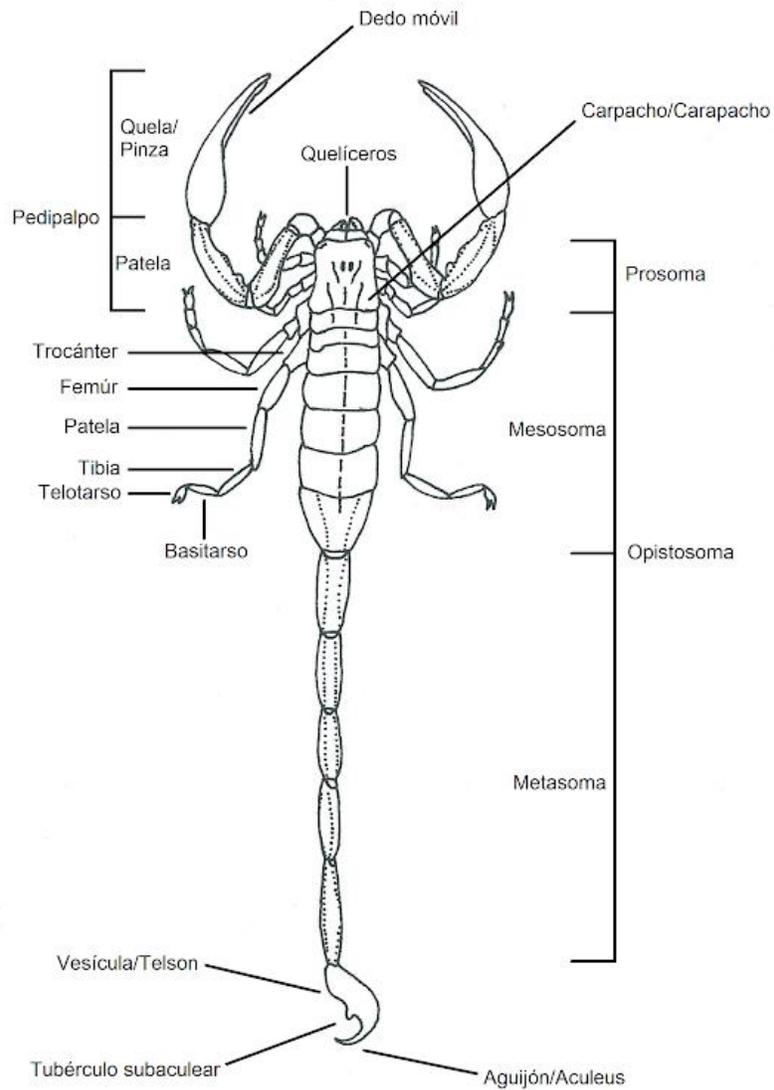


Figura 2. Morfología típica de un alacrán. Los alacranes tienen una morfología con dos divisiones corporales: la cabeza y tórax combinados, denominados como prosoma y opistosoma. Tienen un par de pinzas conocidas como pedipalpos y cuatro pares de patas. El apéndice al final de la cola de los alacranes se le conoce telsón. Ilustración a tinta de Guillermo Sánchez Gómez.

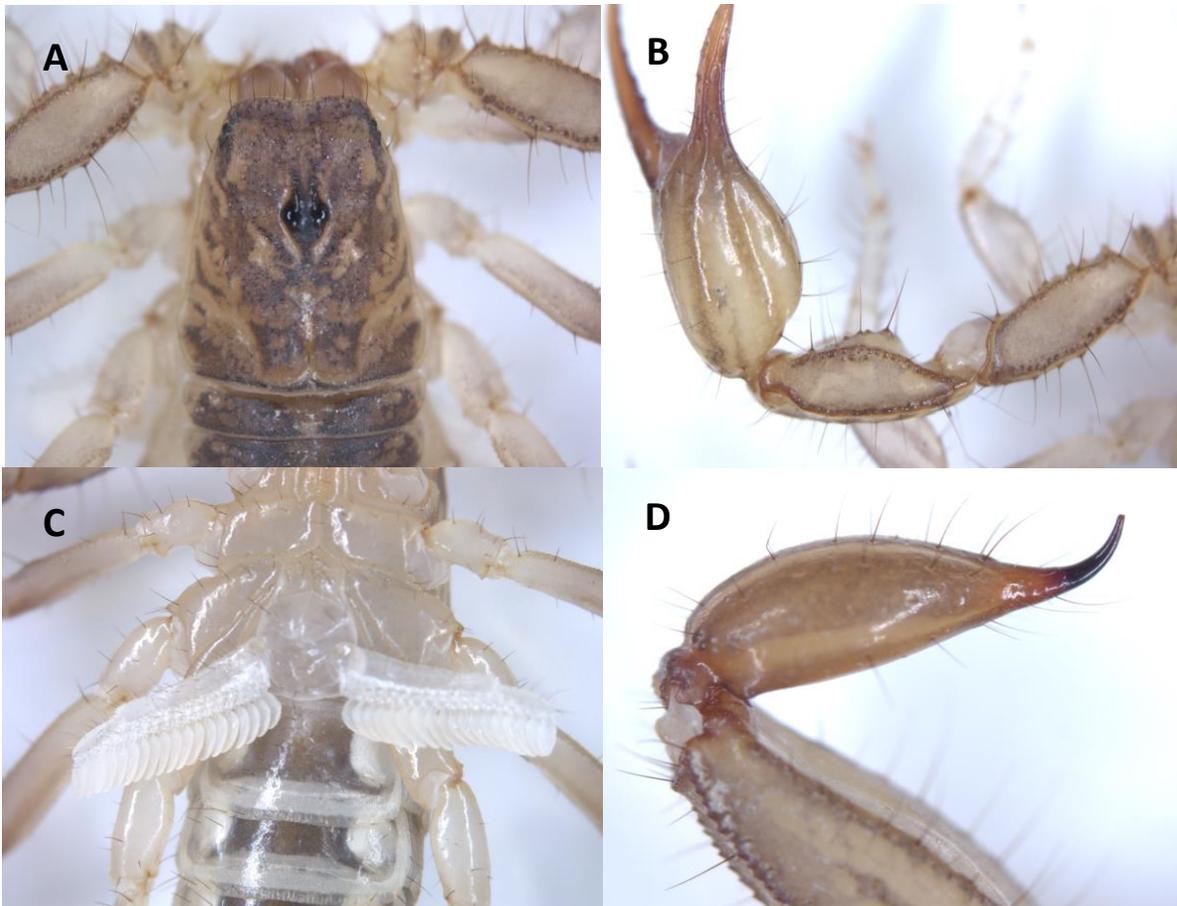


Figura 3. Partes morfológicas de un alacrán. (A) Vista del prosoma de un alacrán, donde se muestra un par de ojos centrales y dos pares de ojos laterales. (B) Pedipalpo de un alacrán cubierto de pelos sensoriales. (C) Foto ventral de un alacrán donde se muestran sus pectinas. (D) Se muestran la glándula venenosa (telson/vesícula) con el aguijón (Imágenes propias).

Los alacranes son capaces de detectar e interceptar vibraciones del aire y el suelo, los cabellos situados en sus pedipalpos ayudan a sentir las vibraciones del aire, mientras las delgadas cutículas que cubren las rendijas de los segmentos del tarso de la pata, ayudan a detectar las vibraciones producidas en el suelo, en conjunto esto les permite a los alacranes detectar a sus presas, depredadores, encontrar a sus parejas y los ayuda a moverse con facilidad por las noches (8). Sus quimiorreceptores se encuentran en su boca para percibir sabores y en sus pectinas utilizadas como detector de feromonas, además de que también funcionan como receptores táctiles para sentir la textura y la vibración de las superficies.

Los alacranes, a diferencia de las arañas son vivíparos, las hembras pueden llegar a presentar una gestación que puede extenderse por unos pocos meses hasta incluso dos años dependiendo de la especie, después de que sus crías hayan tenido su desarrollo embrionario estas nacen y suben a la

espalda de la madre (figura 4A) durante un tiempo aproximado de 1 a 3 semanas dependiendo de la especie o hasta que hayan tenido su primer muda. Los alacranes tienen una película fina y transparente en la capa más externa de su esqueleto llamada cutícula. Esta cutícula contiene dos moléculas fluorescente que brillan con luz ultravioleta (12). Después de que el alacrán muda, éste se vuelve blando y brilla con menor intensidad, pero cuando el tejido hialino se endurece aumenta la intensidad de su brillo, entre los componentes químicos que permiten esta fluorescencia está la β -Carbolina. Existen diversas teorías sobre la fluorescencia de los alacranes y la utilidad que tiene que tiene para ellos, sin embargo, es un fenómeno bastante peculiar que permite su recolección de manera sencilla en la oscuridad. Por otra parte se ha encontrado que algunas especies tienen ausencia de este fenómeno, como el caso de la familia *Chaerilidae* (figura 4B) (8,12).

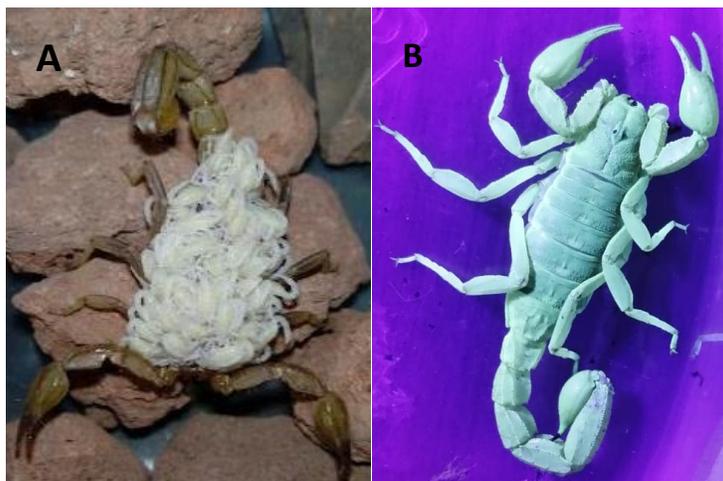


Figura 4. Alacrán *Chihuahuanus*. (A) Alacrán *Chihuahuanus* hembra cargando a sus crías en la espalda. (B) Alacrán *Chihuahuanus* macho adulto bajo luz UV (imágenes propias).

2.2 Clasificación taxonómica y molecular

La identificación de especies permite identificar filogenias (es decir, la relación de parentesco entre especies) y proporciona una herramienta útil para investigar la diversidad de especies en el Estado, al igual que identificar los principales componentes de los venenos y corroborar si existe relación entre especies y contenido del veneno. Se producirán un conjunto de secuencias moleculares, utilizando oligos específicos para encontrar secuencias parciales de ADN mitocondrial (ADNmt) mediante extracción total de ADN y amplificación por PCR. Estos marcadores moleculares se han convertido en una poderosa herramienta para evaluar el estado taxonómico de poblaciones, subespecies y especies animales. Fet y Poindexter (1992)

presentaron la primera información sobre la aplicabilidad del análisis de ADNmt a la taxonomía de *Centruroides* a nivel de especie. Recientemente, las comparaciones de secuencias de ADNmt (ADN mitocondrial) y ARNr (ARN ribosómico) han permitido aclarar la filogenia a nivel de especie entre las poblaciones (13,14). De los marcadores moleculares utilizados para tales fines, se encuentran las secuencias mitocondriales de la subunidad 16S del ARN ribosómico (16S), la subunidad 12S del ARN ribosomal (12S), el gen de la citocromo oxidasa I (COX1), entre otros (15,16).

La idea de utilizar el método “Maximum Likelihood” (ML) para la inferencia filogenética fue utilizado por primera vez en 1967 para datos de frecuencia genética (17). El método ML intenta deducir un árbol evolutivo al encontrar el árbol que maximiza la probabilidad de observar los datos en ese árbol. El método ML es un método estadístico bien establecido (18). Al utilizar cualquier método de máxima probabilidad, se tiene que tener un modelo desde el que trabajar. En filogenética, este modelo describe cómo se producirán las distintas tasas y probabilidades de una sustitución de nucleótidos. Por ejemplo, el software estándar que se utiliza para determinar un modelo a utilizar, prueba 56 modelos diferentes para su uso en el análisis de ML. Cuando el método ML calcula la probabilidad de un árbol o topología determinados, la precisión de este cálculo se basa en qué tan bien se ajusta el modelo elegido al conjunto de datos. Si se elige un modelo que no se ajusta bien a los datos, el árbol tendrá fallas. Se pueden asignar valores de arranque para mostrar la confianza en el árbol producido.

2.3 Propiedades de los componentes de los venenos

El veneno es un líquido lechoso blanquecino con diversos componentes, es producido en el telson por un par de glándulas venenosas, cada glándula está rodeada por una gruesa pared de células epiteliales secretoras, cada glándula tiene un canal, la contracción muscular expulsa violentamente el líquido, por el orificio del aguijón (9). Las toxinas son los componentes del veneno de los alacranes más conocidos por sus efectos nocivos sobre células, tejidos y organismos, sin embargo, paradójicamente se ha demostrado que algunas de ellas muestran actividades que podrían ser relevantes para el desarrollo de fármacos (19,20). Algunos de los componentes presentes en los venenos de alacrán que se han estudiado hasta la fecha son los “péptidos sin puentes disulfuro” (NDBP) y los “péptidos con puentes disulfuro” (DBP). Los componentes del veneno pertenecientes al grupo de NDBP son péptidos pequeños de 13 a 56

aminoácidos, con secuencias muy diversas (21). La mayoría de ellos son catiónicos y muestran una notable flexibilidad estructural, dentro de este grupo se han determinado que cuentan con actividades citolítica, inmunomoduladora, antimicrobiana y anticancerígena (22). Los DBP poseen entre 30 y 70 residuos de aminoácidos, y se caracterizan por tener una estructura alfa-hélice anfipática, en este grupo se encuentran las neurotoxinas, las cuales actúan principalmente en los canales iónicos del sistema nervioso, ya sea causando una activación o un bloqueo, además también son los responsables de los síntomas que produce la picadura de alacrán (22,23)

2.4 Aplicaciones clínicas de los compuestos de venenos de alacrán

El estudio de los venenos de alacranes en México se remonta aproximadamente a 1980 (10), cuando investigadores empiezan a notar el problema del alacranismo en el país y que no existía una solución, ya que los antídotos de la época no eran los mejores, se inició estudiando los venenos de los alacranes de los estados de Nayarit, Durango y después Morelos, que son los que causan mayores problemas de salud, ahí es cuando se dan cuenta que el veneno tiene cientos de componentes, péptidos tóxicos, no tóxicos, y moléculas desconocidas, en ese momento es donde surge la duda de si estos componentes tendría algún uso de interés clínico (10,19). A lo largo de varias décadas de investigación con el veneno de estos animales, el grupo de investigación del Instituto de Biotecnología de la UNAM ha detectado qué función tienen los componentes del veneno, identificado si mata ratones o insectos, si tienen actividad antimicrobiana, si posee alguna acción inmunomoduladora o si es eficiente para controlar ciertos parásitos como la malaria, entre otros (1,2). Toda la literatura disponible a la fecha, habla de potenciales compuestos para tratar diferentes enfermedades, sin embargo, no se ha documentado el uso de estos compuestos en seres humanos, se sabe que ciertos componentes tienen usos para tratar tuberculosis, artritis reumatoide, diferentes tipos de cáncer, o que cuentan con actividad antimicrobiana, pero esto sólo se ha realizado en ensayos de laboratorio con modelos animales o *pruebas in vitro* (1,19).

2.5 Péptidos antibacterianos

Desde el descubrimiento de la ampicilina en los años 40's, la síntesis y uso de diferentes antibióticos han tenido una gran importancia en la salud de la humanidad. El surgimiento de cepas resistentes han hecho las infecciones más difíciles de tratar con los antibióticos que existen

a la fecha (24,25). Las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos para modificar sus genes y acelerar su mecanismo de adaptación para sobrevivir. El problema de la resistencia a antibióticos han motivado a buscar nuevas alternativas para controlar las infecciones por bacterias (26,27). Los péptidos antimicrobianos (AMP) de alacrán se han clasificado dentro de varios grupos, entre ellos las Escorpinas, estos péptidos tienen una composición muy especial con un dominio N-terminal. Estos péptidos se han encontrado hasta el momento solo en alacranes no peligrosos para el ser humano (los que no pertenecen a la familia *Buthidae*) (28). Los AMP se pueden encontrar en una gran variedad de organismos que incluyen desde bacterias, artrópodos (insectos y arácnidos), plantas, anfibios, mamíferos (incluidos los humanos) e incluso organismos unicelulares (19,29,30). La razón por la que son buenos candidatos para la elaboración de nuevos antibióticos es debido a que tienen un amplio espectro de actividad y señalamiento, a su rápida acción, los péptidos son objetivos de las membranas bacterianas y de moléculas intracelulares de varios caminos de señalamiento y especialmente a su bajo potencial para inducir resistencia (3,29).

2.6 *Escherichia coli*

Son bacilos Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados. En cultivo sólido sobre placas de Petri, sus colonias se observan ligeramente blanquecinas, con una superficie suave brillante y un aspecto húmedo, su consistencia es blanda y con una elevación convexa. Forman parte del grupo de los “coliformes”, *E. coli* es una bacteria presente en la microbiota normal gastrointestinal de animales de sangre caliente y se elimina por las heces (31). Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas cepas han adquirido factores de virulencia, generando una incidencia anual de aproximadamente 630 millones de casos de enfermedades gastrointestinales en el mundo, de los cuales entre 5 y 6 millones de pacientes mueren (32).

2.7 *Enterococcus faecalis*

E. faecalis es una bacteria inmóvil, anaerobia facultativa y fermenta la glucosa sin producir gas. Perteneció al género *Enterococcus*, puede causar infecciones fuertes en humanos, es una bacteria Gram positiva que habita el tracto gastrointestinal en mamíferos. Son indicadores de contaminación fecal, por lo que su presencia en los alimentos indica falta de higiene o

defectuosa condiciones de conservación, excepto en alimentos en los que interviene como flora bacteriana natural de procesos fermentativos, como es el caso de quesos, embutidos crudos e incluso productos cárnicos (33).

2.8 Inmunomoduladores

En los casos de envenenamiento severo por piquete de alacrán, se desencadena una respuesta inflamatoria sistémica, con la liberación de citocinas inflamatorias que contribuyen al desequilibrio inmunológico, la disfunción de múltiples órganos y la muerte (19). Se han informado altos niveles de citocinas pro-inflamatorias y antiinflamatorias en suero humano después del envenenamiento. El veneno de alacrán también induce un aumento en el recuento de neutrófilos en la sangre y una reducción simultánea en el recuento de neutrófilos maduros en la médula ósea de la rata. Esta neutrofilia en la sangre es una consecuencia de la movilización de neutrófilos de la médula ósea que a su vez depende de la activación de los receptores del factor activador de plaquetas (19). Los venenos de alacrán tienen un importante efecto inmunomodulador en los macrófagos y nos brindan información importante para comprender el envenenamiento por picadura de alacrán y los mecanismos involucrados en la activación de los macrófagos después del envenenamiento. Esta información amplía el campo de investigación del veneno de alacrán como una herramienta biotecnológica útil para tratar enfermedades inmunomediadas (3). La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica y sistémica que afecta a aproximadamente 1.3 millones de personas en los Estados Unidos. Implica inflamación de las articulaciones sinoviales. Los sinoviocitos similares a los fibroblastos (FLS) son células de la articulación sinovial residentes que juegan un papel central en la progresión de la AR. Estas células desarrollan un fenotipo altamente invasivo y secretan proteasas, factores de crecimiento y citocinas pro-inflamatorias, lo que conduce a la degradación de las articulaciones. Las terapias actuales para la AR se centran en suprimir el componente inmune de la AR y aun no se han diseñado terapias para atacar específicamente los FLS (34). Los FLS de pacientes con AR (RA-FLS) y de ratas con el modelo de artritis inducida por pristano (PIA) de RA expresan el canal de potasio KCa1.1 (Maxi-K, BK, Slo 1, *KCNMA1*) en su membrana plasmática. La inhibición de la expresión o función de este canal reduce la invasividad, proliferación y secreción de proteasa del FLS, al tiempo que modula la adhesión celular y la regulación de la integrina, además, el bloqueo de KCa1.1 con el inhibidor de molécula paxillina

reduce la gravedad de la enfermedad en la PIA y en los modelos de ratas de artritis inducida por colágeno (CIA) de la AR (35). Aunque la paxillina fue eficaz en el tratamiento de la enfermedad en estos modelos de RA en ratas, su desarrollo como potencial terapéutico está limitado por sus efectos secundarios. Las subunidades α formadoras de poros de KCa1.1 se encuentran en una variedad de tejidos, incluido el sistema nervioso central (SNC), músculo liso, testículos, páncreas y riñón, además de FLS. Paxilline bloquea KCa1.1 a través de la unión alostérica a la subunidad α formadora de poros y su administración sistémica conduce al bloqueo de KCa1.1 en todo el cuerpo, causando efectos secundarios perjudiciales que impiden su uso en humano (34,35).

Aunque las subunidades α KCa1.1 tienen una distribución tisular amplia, muchos canales KCa1.1 están físicamente asociados con subunidades β reguladoras que afectan la activación del canal y tienen distribuciones tisulares restringidas. En contraste, KCa1.1 α en el SNC está asociado con la subunidad β 4, mientras que la subunidad β 1 se expresa en las células del músculo liso (34). Debido a la distribución tisular limitada de KCa1.1 con la subunidad β 3, puede ser posible usar un bloqueador que afecte a KCa1.1 $\alpha\beta$ 3, pero no a KCa1.1 $\alpha\beta$ 4, como un paso hacia una nueva terapia de AR que no induzca efectos secundarios en el SNC y como prueba de concepto de que la focalización de subunidades específicas de KCa1.1 puede usarse para farmacología específica de tejido. La Iberiotoxina (IbTX), un péptido de 37 aminoácidos del veneno del escorpión *tamhus Buthus* (3,36), es un bloqueador selectivo de KCa1.1 que inhibe el canal cuando contiene las subunidades β 1, β 2 o β 3 sin tener ningún efecto sobre KCa1.1 que contiene la subunidad β 4 encontrada en el SNC. IbTX, por lo tanto, puede inhibir los FLS mediante el bloqueo de KCa1.1 $\alpha\beta$ 3, mientras que deja al SNC no afectado al preservar KCa1.1 $\alpha\beta$ 4. Si IbTX es eficaz en el tratamiento de modelos de AR, podría servir como armazón para el desarrollo de bloqueadores específicos de KCa1.1 $\alpha\beta$ 3 para el tratamiento de la AR.

2.9 Péptidos con actividad antineoplásica

En las últimas décadas se ha dado un avance significativo en el diagnóstico y tratamiento terapéutico para el cáncer, a pesar de que se han hecho avances favorables, los métodos clásicos, aún muestran una tasa de éxito relativamente baja y un alto riesgo de recurrencia (37). Los péptidos anticancerígenos representan un recurso importante para el diseño de fármacos dirigidos a tumores que podrían permitir abordar el proceso de desarrollo del cáncer desde diferentes

ángulos (38). Algunas de estas pequeñas moléculas muestran una penetración y absorción eficiente de los tejidos por parte de las células cancerosas heterogéneas. Podrían actuar sobre los tumores directamente por su actividad intrínseca, mediante la sinergia con la quimioterapia existente, o al funcionar como vehículos portadores de medicamentos con menor selectividad o biodisponibilidad (39). Los componentes del veneno de alacrán son una fuente prometedora de moléculas biológicamente activas con un potencial para combatir el cáncer. Algunas proteínas y péptidos escorpión han mostrado efectos tanto *in vitro* como *in vivo* sobre las células cancerosas, y uno de ellos llegó incluso a los ensayos clínicos de fase I y fase II (39). La clorotoxina (CITx) es un péptido que contiene 36 aminoácidos y 4 enlaces disulfuro, purificado del veneno del alacrán *Leiurus quinquestriatus* (40). Posee un solo residuo de tirosina disponible para la radioyodación. El primer estudio demostró que la CITx es capaz de bloquear los canales de Cl de pequeña conductancia, derivados de células epiteliales. Posteriormente, se demostró su unión a canales de cloruro expresados específicamente en astrocitoma humano y células de glioma. Estos experimentos permitieron la identificación de los canales de cloruro activados por voltaje presentes en los astrocitos. De hecho, se ha demostrado que CITx inhibe estos canales de cloruro por su unión a metaloproteasa-2 (MMP-2) (41) (3). CITx causa la endocitosis de MMP-2 con CIC-3, un subtipo de canal de Cl regulado en forma ascendente en las membranas de glioma, agotando la superficie celular de los canales de Cl. CITx bloqueó efectivamente la migración de células de glioma humano STTGI y U251-MG, pero el agotamiento del canal iónico solo no pudo bloquear completamente la invasión de células de glioma. Se ha demostrado que la interacción del complejo CITx-MMP-2 es específica para las células neuro-ectodérmicas de glioma y tumores (41).

De las especies de escorpión, *Androctonus mauritanicus* (AMa) y *Androctonus australis* (Egipto) (AAu) se realizó la secuenciación de ARN. En total, se generaron 514,974 y 625,389 lecturas sin procesar. En total, se analizaron 22 péptidos con 19 líneas celulares para identificar sus posibles actividades antiproliferativas, después de lo cual se descubrió que cuatro péptidos (péptidos 4, 6, 10 y 13) inhiben la proliferación de las líneas celulares de cáncer de colon humano HCT116, DLD- 1, Hke3, Dks8 y la línea celular de glioma humano U - 251. También se probaron dos tipos de líneas celulares epiteliales humanas normales, incluida la línea celular de colon FHC y la línea celular de mama MCF 10A, y se descubrió que los péptidos tenían efectos insignificantes en su proliferación incluso a concentraciones más altas. Del Péptido 13

(Gonearrestide), se descubrió que tenía la actividad más potente en la línea celular de cáncer de colon humano HCT116, por lo que se eligió como un péptido principal para una investigación más amplia. Además, se realizó una valoración de ensayos biológicos para Gonearrestide, se realizaron pruebas de lactato deshidrogenasa (LDH), esta se libera cuando la integridad de la membrana celular se ve comprometida. En este ensayo, Gonearrestide no indujo la liberación de LDH de las células HCT116 después de 24 horas de incubación. Este resultado sugiere que Gonearrestide no interrumpe la membrana celular y no induce la muerte celular. Al mismo tiempo, los resultados de LDH fueron consistentes con los datos de secuenciación de ARN junto con la combinación de resultados de MTT. Tomados en conjunto, estos datos confirmaron que Gonearrestide afectó la proliferación de células cancerosas a través de la inhibición del crecimiento (42).

2.10 Péptidos con actividad fosfolipasa

Las fosfolipasas (PLA) son enzimas que hidrolizan uno de los enlaces éster de los glicerofosfolípidos y de esta manera liberan productos tales como lisofosfolípidos, ácidos grasos libres (FFAs), fosfatidatos, fosfatos de colina y diacilgliceroles (DGs). Las fosfolipasas se pueden encontrar en cinco grupos (A 1, A 2, B, C y D) dependiendo del sitio en el que se anclan los glicerofosfolípidos (tabla 1) (figura 5) (43,44). Las fosfolipasas A 2 (PLA 2) se encuentran distribuidos en mamíferos, artrópodos reptiles, toxinas producidas por animales venenosos y otras fuentes (45), entre sus actividades biológicas y farmacológicas se encuentran relacionadas con la inflamación, la regulación del recambio de fosfolípidos, la fluidez y el tráfico de las membranas, la maduración y el mantenimiento de las células, la apoptosis, actividad neurotóxica, actividad cardiotoxica, actividad hemolítica, bloqueadores de canales iónicos, la producción de eicosanoides, leucotrienos y prostaglandinas, mionecrosis y daño muscular (43–45).

Comprenden una gran superfamilia de enzimas compuesta de 16 grupos y 6 tipos principales de los cuales son las PLA 2 secretadas (sPLA 2), PLA 2 citosólicas (cPLA 2), PLA 2 independientes de calcio (iPLA 2), el factor activador de plaquetas (PAF) PLA 2 acetil hidrolasa/lípido oxidado asociadas a lipoproteínas (LpPLA 2s), PLA 2 adiposas (AdPLA 2s) y las PLA 2 lisosomales (LPLA 2s) (3,46).

Las primeras enzimas de PLA 2 en ser descubiertas fueron las sPLA 2, fueron encontradas en distintos venenos de diferentes víboras, alacranes, abejas, monstruos de gila, fluido sinovial

artrítico, componentes de jugos pancreáticos y distintos tejidos de mamíferos y se caracterizan por tener un bajo peso molecular de 13 – 18 kDa y la estructura primaria de la fosfolipasa tiene 120 a 130 aminoácidos que usualmente contienen de 6 a 8 enlaces disulfuro (43). La relevancia que tiene esta enzima en el veneno de los animales es para ayudar a digerir a la presas, o inducir una reacción neurotóxica, cardiotoxica, de hemólisis o efectos anticoagulantes. De igual manera, que se presente estos compuestos en el veneno puede significar que presente acciones farmacológicas (45). Del alacrán *Pandinus imperator* se ha aislado una toxina con actividad fosfolipasa A2 que actúa sobre musculo esquelético y cardiaco, el mecanismo inhibidor involucra los ácidos grasos liberados de la hidrólisis de fosfolípidos causada por la actividad de la toxina (47).

Tabla 1. Sitios de acción de las fosfolipasas (44)

Grupo	Sitio de acción
A ₁	Sitio sn - 1
A ₂	Sitio sn - 2
B	Sitios sn - 1 y sn - 2
C	Unió del glicerofosfato
D	Remueve la cabeza del grupo polar

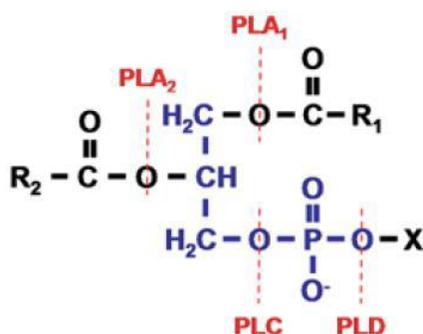


Figura 5. Sitios de acción de las fosfolipasas y estructura del glicerofosfolípido. La molécula fosfolipídica se marca en color azul siendo esta un glicerol – 3 – fosfato (44).

En el caso de los alacranes, sus sPLA 2 son dependientes de calcio y presentan distintas acciones como el metabolismo de fosfolípidos, inflamación, facilita la digestión de presas y acción

defensiva (43), como por ejemplo, se sabe que el alacrán *Pandinus imperator* tiene en su veneno la Imperatoxina (IpTxI), una fosfolipasa heterodimétrica que causa la inhibición de la unión de la rianodina a los canales de Ca^{2+} que se encuentran en el músculo esquelético (45)

III. DELIMITACIÓN DEL OBJETO DE ESTUDIO

3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA PREGUNTA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Actualmente se cuenta con información limitada sobre los alacranes que existen en el Estado de Chihuahua, es prácticamente nula la información sobre la composición de los venenos de los especímenes endémicos de la región, y aún cuando no se considera que la presencia de alacranes sea un problema de salud en el Estado, los componentes de los venenos de estos arácnidos pueden presentar una potencial fuente de compuestos novedosos. Por lo que la correcta clasificación de especies y el estudio de sus venenos presentan una oportunidad de encontrar compuestos de interés científico (47). La identificación de estos componentes del veneno del alacrán (en su mayoría péptidos y proteínas), sus funciones, caracterización y la clonación de los genes respectivos son algunos de los aspectos más estudiados de los alacranes mexicanos (48) gracias a esto, aun cuando se sabe que los componentes del veneno del alacrán son más conocidos por sus efectos nocivos sobre las células, tejidos y organismos; paradójicamente se ha demostrado que algunos de ellos pueden tener características que se puedan aplicar como nuevas opciones de antibióticos, péptidos que se usen para tratar el cáncer, componentes que se relacionen con la autoinmunidad o se puedan usar como inmunomoduladores (19). Por lo tanto, surge la relevancia de llevar a cabo el estudio de los alacranes endémicos de Chihuahua.

¿Al analizar y caracterizar el veneno de los alacranes endémicos del Estado de Chihuahua, cuál sería la posibilidad de encontrar nuevos compuestos de importancia biomédica y/o con aplicaciones biotecnológicas?

3.4 HIPÓTESIS

En el Estado de Chihuahua existen especies de alacranes no exploradas, mediante la caracterización bioquímica de sus venenos se aislarán y describirán nuevos compuestos con potenciales usos terapéuticos.

3.5 OBJETIVOS

3.5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad antimicrobiana y enzimática del veneno de alacranes colectados en el Sureste del Estado de Chihuahua

3.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Clasificar los especímenes colectados a través de técnicas moleculares.
2. Identificar de manera taxonómica los alacranes colectados.
3. Examinar si el veneno de los alacranes cuenta con actividad antimicrobiana.
4. Examinar si el veneno de los alacranes cuenta con actividad enzimática.

IV. JUSTIFICACIÓN

La habilidad de adaptación de los alacranes les ha conferido características extraordinarias a sus venenos, por lo tanto es de importancia identificar y caracterizar estos componentes, ya que pueden ser de relevancia en el ámbito biomédico, pueden tener características y ser aplicados como nuevas alternativas al uso de antibióticos, algunos péptidos pueden ser empleados para el tratamiento del cáncer, componentes que se relacionen con la autoinmunidad o se puedan usar como inmunomoduladores. Desde el descubrimiento de la penicilina en los años 40's, el uso y síntesis de antibióticos ha tenido un gran impacto positivo en la salud, sin embargo, el surgimiento de cepas bacterianas resistentes han hecho las infecciones más difíciles de tratar con los antibióticos disponibles a la fecha (24,25). Esto ha motivado a buscar nuevas alternativas para controlar estas infecciones bacterianas (26,27). El cáncer representa un serio problema de salud actual, es la segunda enfermedad más letal en humanos (49), los químicos sintéticos usados en quimioterapia y radio terapia, son extremadamente citotóxicos y pueden causar mucho daño colateral a tejidos normales (50,51). Por esta razón, se requieren de nuevos agentes con baja citotoxicidad y leves o mínimos efectos secundarios. Los péptidos procedentes del veneno de algunas especies de alacrán pudieran tener actividad anticancerígena y representan un recurso importante para el diseño de fármacos dirigidos a tumores, que podrían permitir abordar el proceso de desarrollo del cáncer desde diferentes ángulos (38). Por otra parte, la artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica y sistémica, de la cual aún no se conoce una cura, y los medicamentos que se encuentran en el mercado actualmente para tratarla solo retrasan el avance y ayudan a aliviar las molestias. México no tiene un registro oficial de casos nuevos dentro de las Enfermedades Reumáticas ni de Artritis Reumatoide, así que la información sobre incidencia, aún es muy limitada. Un estudio realizado en 5 regiones de México con una muestra de 19,213 individuos, encontró que alrededor del 14 % de la población de estudio padecía de alguna enfermedad reumática. La AR tuvo una prevalencia de 1.6 % dentro de la población de estudio (52). Por lo tanto, encontrar tratamientos alternativos que puedan ser más eficientes y con menores efectos secundarios es seriamente de vital importancia estratégica en el tratamiento de enfermedades autoinmunes en la población. En la actualidad se han estudiado compuestos de venenos como tratamientos alternativos, un ejemplo son, los bloqueadores de canales de potasio dirigidos a la autoinmunidad, del veneno del alacrán *Buthus tamulus*, de este

se aisló el péptido Iberotoxina (IbTX) (36,53) el cual se ha comprobado que es eficaz en el tratamiento del modelo de AR, mismo péptido se planea usar como plataforma para encontrar bloqueadores específicos para el tratamiento de AR. Pese a todo esto, es importante la búsqueda de nuevos y novedosos tratamientos para este tipo de enfermedades, por lo tanto la búsqueda de compuestos mediante estrategias experimentales bien dirigidas nos ayudaran a conocer las características bioquímicas del veneno de los alacranes endémicos de Chihuahua y quizá nos permita desarrollar nuevas curas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Experimental, ensayo de laboratorio.

5.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio es alacranes endémicos del Estado de Chihuahua

Se seleccionan especímenes machos (preferentemente), adultos, que se encuentren en la región Sureste del Estado de Chihuahua.

Por la naturaleza del estudio, y la variabilidad que se presenta en las recolectas, no existe un número específico de especímenes necesarios.

5.3 DEFINICIÓN DE VARIABLES

Tabla 2. Variables y sus características

	Nombre de la Variable	Definición operacional	Escala de medición
Variables independientes	Clasificación taxonómica	La taxonomía es la ciencia que se encarga de clasificar los organismos, de nombrar y describir, de establecer los parámetros de diferencia, creando familias, ramas y conjuntos de razas, La taxonomía es estudiada bajo el sistema taxonómico de Linneo, en honor al biólogo Carlos Linneo (1707 – 1778). Básicamente de la división de los organismos en 7 clases, llamadas Taxones: 1. Dominio 2- Reino, 3- Phylum, 4- Clase, 5- Orden, 6- Familia, 7- Género y 8- Especies	Nominal
	Clasificación molecular	La correcta clasificación científica de los organismos, se realiza por medio de la información molecular, y gracias a esto se pueden establecer relaciones de parentesco entre especies, lo que ayuda a conocer los diferentes taxones mencionados anteriormente.	Nominal
Variable dependiente	Glándula venenosa (veneno) del alacrán	El veneno es un líquido lechoso blanquecino, con diversos componentes, es producido en el telson por un par de glándulas venenosas, cada glándula está rodeada	Nominal

		por una gruesa pared de células epiteliales secretoras, cada glándula tiene un canal, la contracción muscular expulsa violentamente el líquido, por el orificio del aguijón (1).	
VARIABLES	Especie	<i>Vaejovis Chihuahuanus</i> (11)	Nominal
Universales	Genero	Macho/Hembra	Nominal
	Edad (joven/adulto)	Dependiendo de la longitud de los alacranes se consideran como adultos o jóvenes, para este proyecto se considera el uso de alacranes adultos por la mayor facilidad de manejo, y extracción de veneno.	Nominal
	Lugar de procedencia	Sureste del Estado de Chihuahua, Cd. Jiménez, lugar donde se llevara a cabo la colecta (11)	Nominal

5.4 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

5.4.1 *Material biológico*

Se recolectaron especímenes de la región Sureste del Estado de Chihuahua, durante los meses Junio-Agosto del año 2020 y 2021, durante todo el tiempo que tomaron los experimentos se mantuvieron en cautiverio en condiciones estándar de temperatura, con escondites de cartón de huevos y se les suministró agua a voluntad. Cada espécimen se mantuvo en envase individual con orificios para que entrara aire hasta el inicio de los protocolos de extracción de veneno. Se utilizaron especímenes machos y hembras aproximadamente del mismo tamaño (54).

5.4.2 *Extracción de ADN, Amplificación y Secuenciación*

La extracción de ADN se llevó a cabo macerando el mesosoma de un alacrán y posteriormente colocarlo en un tubo eppendorf para agregar 400 µl buffer de lisis (1 % SDS, 115 mM NHCl, 10 mM NaHCO₃, 10 mM EDTA pH 7.4), se le agregan 10 µl de proteinasa K, luego se incubaba a 70 °C con agitación (o vórtex manual ocasional) durante 1 hr, se agrega 400 µl de fenol mercaptoetanol 0.2 %. Transcurrido este tiempo se centrifuga a 13,000 RPM durante 5 minutos, se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo eppendorf etiquetado, y se añade un volumen de alcohol isoamilico = cloroformo, se le da vórtex y se centrifuga a 10,000 RPM por 10 minutos, posteriormente se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo, adicionar 1/10 de acetato de sodio

y 2 volúmenes de Etanol 100 % frío, se mezcla invirtiendo el tubo. Se almacena a -80 °C por 1 hr. Se saca y se descongela a temperatura ambiente, se centrifuga a 10,000 RPM durante 15 minutos, se decanta el líquido y se agrega 1 ml de etanol al 75 % frío, se centrifuga de nuevo 7,500 RPM durante 5 minutos, se decanta y se deja invertido sobre papel sobre 15 minutos para que se seque el exceso de etanol, por último se resuspende en 30- 50 µl de agua estéril.

Se utilizaron los oligos reportados en los artículos por Borges y colaboradores (14) y Soltan-Alinejad y colaboradores (13). En la siguiente tabla (tabla 3) se detallan las características de dichos marcadores moleculares.

Tabla 3. Marcadores moleculares utilizados

Marcador	Fuente	Secuencias
12s ADNr	Soltan-Alinejad, et al (2019)	Fwd 5'-AGAGTGACGGGCAATATGTG-3' Rev 5'-CAGCGGCTGCGGTTATAC-3'
16s	Borges, et al (2010)	Fwd 5'-CGATTTGAACTCAGATCA-3' Rev 5'-GTGCAAAGGTAGCATAATCA-3'
COI	Borges, et al (2010)	Fwd 5'-CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3' Rev 5'-GATATTAATCCTAAAAAATGTTGAGG-3'

La amplificación se llevó a cabo con las características descritas en la tabla 4. El producto de PCR es corroborado por electroforesis, si es bueno se limpia, en este caso se utilizó el kit de purificación de ADN NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, y se siguió el protocolo provisto por el proveedor (Anexo 3). El producto limpio se envía a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN (USSDNA) del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Se analizaron los datos obtenidos de la secuenciación de los fragmentos de ADN extraídos con los tres pares de marcadores mitocondriales. Se hizo un Blast a las secuencias y se eligieron las que tuvieran mayor porcentaje de identidad para realizar un análisis filogenético, este se realizó con el software MEGA11, comenzando por un alineamiento múltiple de secuencias, seguido de la construcción del árbol filogenético (55).

Tabla 4. Configuración de temperatura y tiempo para cada paso de la reacción de PCR usada para amplificar las secuencias.

Configuración de PCR		
12s, 16s, COI	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C	5:00
Desnaturalización	94 °C	0:30
Alineamiento	48 °C	0:30
Extensión	72 °C	1:00
Desnaturalización	94 °C	0:30
Alineamiento	48 °C	30x 0:30
Extensión	72 °C	1:00
Extensión Final	72 °C	5:00

5.4.3 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica se llevó a cabo con el estereoscopio ZEISS mediante el software ZEN 3.4 blue edition. Consistió en la toma de imágenes de las diferentes partes morfológicas de los especímenes, como el carpacho, las quelas, los quelíceros, pectinas, esternón, vesícula y aguijón (13).

5.4.4 Obtención del veneno

El veneno se obtuvo por medio de electroestimulación, cada alacrán se sumergió en agua corriente para tener una mejor conductividad eléctrica y se colocó en una rejilla metálica conectada a un electrodo, luego sosteniendo al alacrán del quinto segmento metasomal, se aplicaron 12 V cc, en pequeños pulsos (no más de tres pulsos por alacrán) a la base del telson con otro electrodo de polaridad contraria. Estos parámetros se realizaron con la finalidad de no dañar al animal y maximizar la recuperación del veneno (54). Se recogió la totalidad del veneno con una punta de micropipeta, transfiriéndolo posteriormente a un tubo eppendorf y almacenándolo a -80 °C hasta su uso. Después de la extracción los alacranes e mantuvieron aislados con agua a su disponibilidad y siguiendo un calendario de alimentación hasta la próxima extracción.

5.4.5 Método para determinación de actividad antimicrobiana

Este método se utilizó para comprobar si el veneno cuenta con actividad antibacteriana y se siguió el protocolo reportado por el Clinical and laboratory Standards Institute (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Twenty-Second Informational Supplement). El procedimiento que se llevó a cabo consistió en probar las cepas ATCC *E. coli* (Gram negativo) y *E. faecalis* (Gram positivo) realizando un estriado de estas mismas en una caja Petri con Agar LB Miller y se dejó crecer toda la noche, al día siguiente se verificó el crecimiento y se seleccionaron 2 colonias aisladas que fueron raspadas con un palillo pequeño de madera; con antelación se prepararon dos tubos Falcón de fondo redondo con 3 mL de Medio LB Luria Bertani para en ellos dejar caer los palillos con las colonias, posterior a esto se pusieron en agitación a una temperatura de 37 °C durante 3 horas; pasado este tiempo se transfirieron 500 µl de los 3 ml a un matraz Erlenmeyer con 50 ml de medio LB Luria Bertani y se dejó crecer a 37 °C con agitación a 100 RPM hasta que alcanzó una OD600 DE 0.08-0.13. Mientras tanto se preparó Agar LB Miller al doble de concentración, para mezclar con el cultivo de bacterias, se mantuvo líquido mediante baño María, aproximadamente a 60 °C; cuando el cultivo alcanzó la OD deseada, se mezcló con el Agar (esperando a que llegara a una temperatura menor a la del baño María para no matar a las bacterias), de manera inmediata se vertió la mezcla en cajas Petri y se esperó a que polimerizaran, para poder agregar los tratamientos. Se utilizó Kanamicina como control positivo, como control negativo se utilizó PBS por último se pusieron en incubación a 37 °C durante toda la noche. Todos los pasos de este protocolo se realizaron en esterilidad.

5.4.6 Método para la determinación de actividad fosfolipasa

Se desarrolla este protocolo con la finalidad de comprobar la presencia de fosfolipasas en el veneno de esta especie, además de saber el tipo de fosfolipasa que tiene. Las fosfolipasas tipo A aclaran la suspensión de yema de huevo, por hidrólisis de los fosfolípidos presentes en ella. Esto es también cierto cuando el sustrato se incorpora a geles de agar o agarosa. Se desarrollan áreas claras alrededor de los pozos donde se aplica la enzima, su diámetro, en un amplio rango de dosis, es proporcional al logaritmo de la concentración de la enzima aplicada, se siguió el protocolo reportado por Habermann y Hardt en 1972. El protocolo consiste en una combinación de tres diferentes soluciones, la primera consiste en la mezcla de 12 ml de yema de huevo con 36

ml de una solución de a 0.86 % de NaCl; la segunda es CaCl₂ a 10 mM; la última es la combinación de 0.3 gr de Agar con 50 ml de Tris base 50 mM a un pH de 7.95 (se debe mantener en estado líquido en baño de agua hirviendo). El método consiste en mezclar la solución de 50 ml de yema de huevo con 500 µl de cada una de las otras dos soluciones, luego esta mezcla se pone en cajas Petri, y se deja polimerizar, para agregar los venenos y los controles y luego poner en incubación a 37 °C por una hora, si se forma un halo alrededor de los lugares en los que se aplicaron los tratamientos, esto quiere decir que cuentan con actividad fosfolipasa.

5.4.7 Consideraciones éticas

De acuerdo con los principios establecidos en las diferentes leyes Estatales, Nacionales y Universales que regulan las obligaciones y prohibiciones en materia de protección animal, en este estudio se consideran los siguientes puntos (56) (57):

- ***Instalaciones***

Las instalaciones destinadas para el alojamiento de los animales de experimentaciones deben estar diseñadas para cubrir las necesidades de los sujetos experimentales, de los usuarios y del personal que interviene en su cuidado diario. Deben existir espacios definidos de alojamiento animal, de experimentación y de apoyo a la operación (56) (57).

- ***Equipo para alojamiento de los animales***

Debe facilitar el bienestar del animal, satisfacer las necesidades de la investigación y reducir o eliminar las variables experimentales. En términos generales debe (56) (57).

- Proporcionar el espacio adecuado que permita movimientos y adopciones de las posturas normales de la especie y permitir las interacciones sociales entre los mismos.
- Ser cerrado, a prueba de escape y proteger al animal de amenazas externas.
- Ser adecuado en ventilación y conforme a las necesidades biológicas de la especie.
- Favorecer que los animales se mantengan limpios y secos.
- Ser resistente al lavado y desinfección frecuente.
- Permitir la observación de los animales.

- *Alimentación y provisión de agua*

En general el alimento y el agua deberán proporcionarse a libre acceso. Si el procedimiento experimental lo justifica, se podrán hacer modificaciones a la dieta y forma de suministrar los alimentos (56).

- *Técnicas experimentales*

El animal debe ser manejado siempre con cuidado pero con firmeza, procurando la seguridad del personal que lo manipula. Se debe evitar la lucha y el estrés en todo momento, ya que la excitación prolongada puede alterar la circulación y el estado metabólico del individuo e inducir un estado de choque. Las técnicas de sujeción, manipulación e inmovilización que se realicen en el bioterio deben estar acordes con los principios humanitarios internacionales (56).

VI. RESULTADOS

6.1 Extracción de ADN

Se pueden observar los amplicones para las tres especies con los diferentes pares de oligos (Figura 6), el número de pares de bases coincide con lo reportado en los artículos de referencia (13,14). En la figura se señalan las diferentes especies, el número 2 corresponde a *Paruroctonus*, el número tres a *Chihuahuanus crassimanus* y el número cuatro a *Chihuahuanus coahuilae*. El tamaño de los productos de PCR obtenidos coinciden con los reportados en los artículos de referencia.

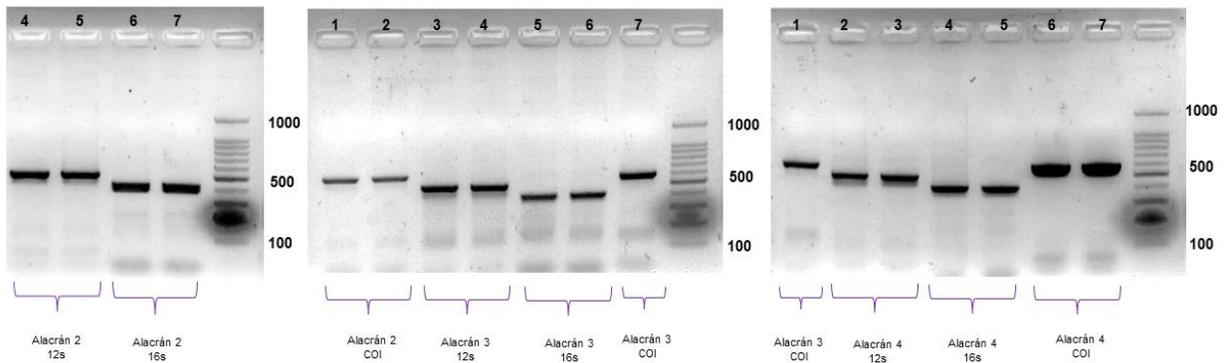


Figura 6. Productos de PCR amplificados. Amplificación de productos de PCR con los marcadores mitocondriales 16s, COI, 12s. Tamaños de amplicón esperados y observados son 16s: 400 bp, 12s: 450 bp, COI: 540 bp.

6.2 Análisis taxonómico

El análisis taxonómico se llevó a cabo con la ayuda de un estereoscopio ZEISS mediante el software ZEN 3.4 blue edition. A continuación se muestran figuras de diferentes partes morfológicas de las tres diferentes especies analizadas, el objetivo principal es denotar las características similares y las principales diferencias que permiten distinguir de una especie a otra. Las principales características que permiten la diferenciación de las especies son el número de pectinas y la forma de los quelíceros. El color base del cuerpo es significativamente diferente en las tres especies, y varía desde un amarillo pálido hasta un café oscuro. Además *Chihuahuanus crassimanus* (figura 7 A2) tiene dos pares de ojos laterales, a diferencia de *Paruroctonus* (figura 7 A1) y *Chihuahuanus coahuilae* (figura 7 A3) que tienen tres pares de ojos laterales. Sobre los agujones y las quelas la principal diferencia es la coloración, además *Paruroctonus* presenta quelas (figura 7 E1) más gruesas que las otras dos especies.

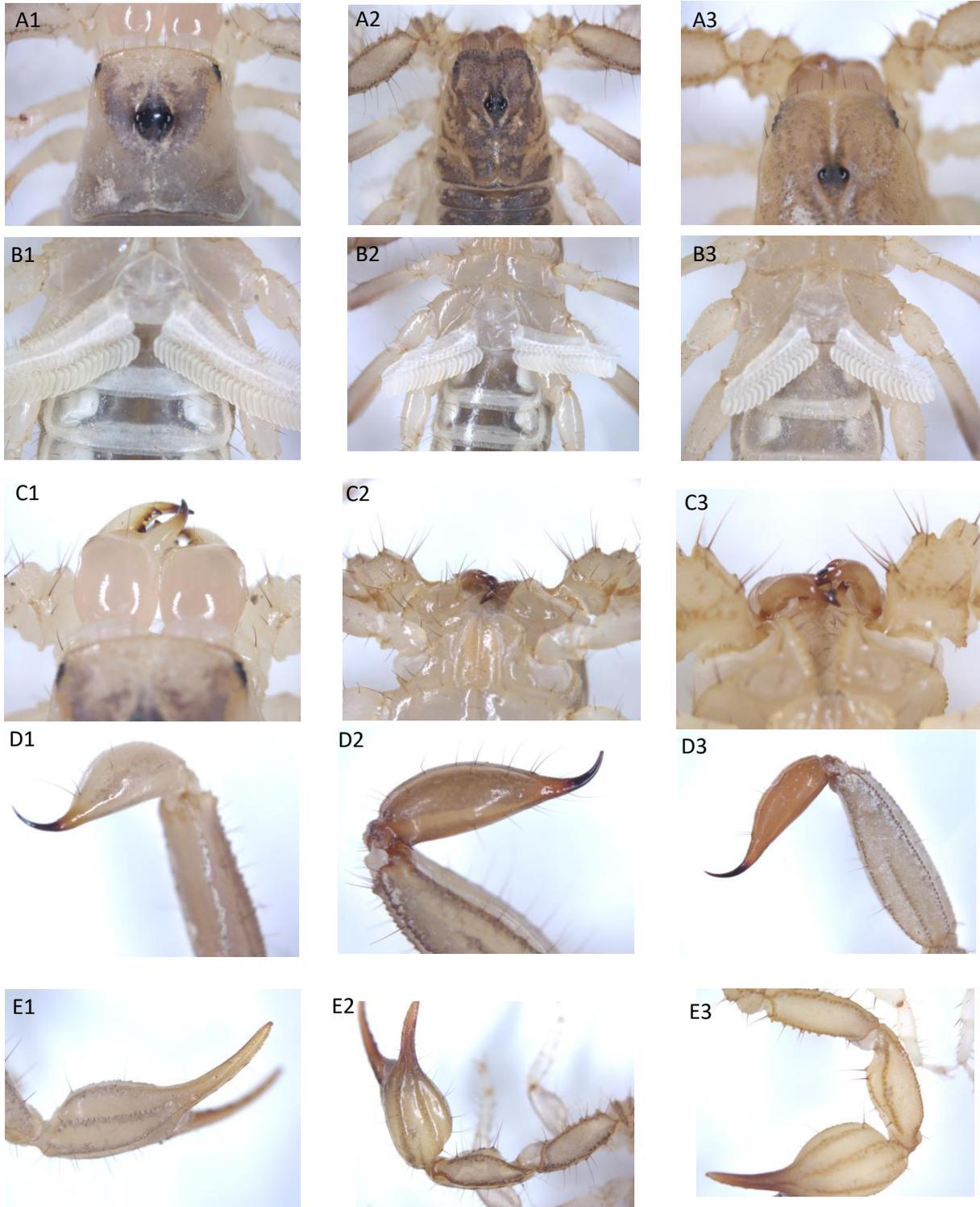


Figura 7. Identificación Morfológica. En la fila A se muestra el carpacho de las especies, en la fila B se ven las pectinas, en la fila C están los quelíceros, en la fila D se muestran los aguijones y por último la fila E es para las quelas. El número uno designa la especie *Paruroctonus*, el dos *Chihuahuanus crassimanus* y el tres *Chihuahuanus coahuilae*.

6.3 Análisis filogenético

Los resultados muestran una diferencia efectiva a nivel de especie utilizando los tres marcadores moleculares. Se ha demostrado que los marcadores COI, 12S ARNr y 16S ARNr son eficientes para la discriminación filogenética de los alacranes endémicos del Estado de Chihuahua y sientan las bases para la identificación correcta de estas especies. Según el puntaje del criterio de información Bayesiano (BIC) se evalúa cual es el mejor modelo para las secuencias, basándose en todas las verosimilitudes. Los tres árboles se construyeron con el modelo de sustitución de nucleótidos de Tamura 3-parameter con distribución Gamma (T92+G).

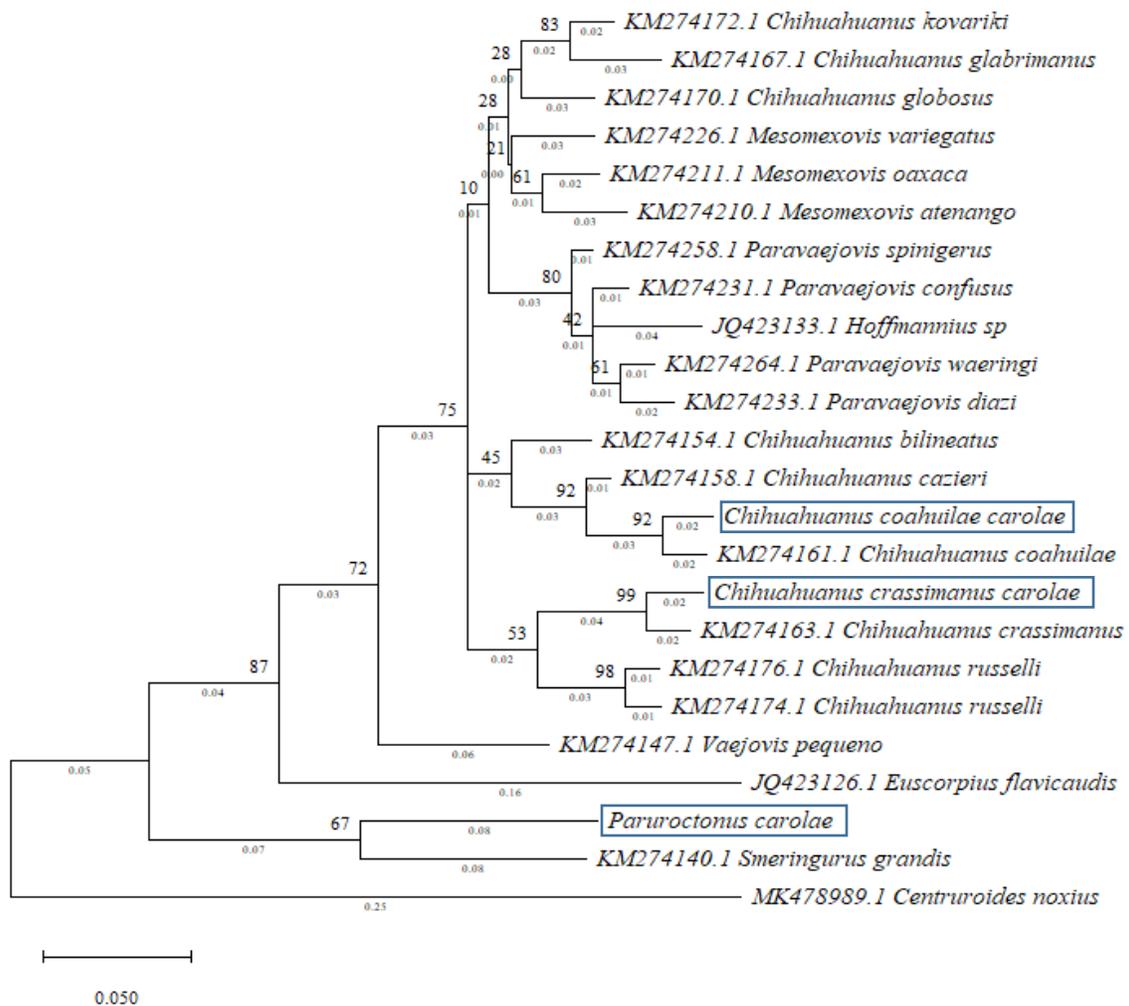


Figura 8. Análisis Filogenético del gen 12S. Análisis filogenético molecular del gen mitocondrial ARNr 12S utilizando el método de máxima verosimilitud (ML) generado con el Modelo Tamura 3- parameter con distribución Gamma (T92+G) con 100 réplicas bootstrap. Se muestra el árbol con la mayor probabilidad logarítmica. El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon se muestra junto a las ramas. El árbol está

dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. Cada secuencia se indica mediante su número de acceso a GenBank. Los recuadros indican las secuencias obtenidas en este proyecto.

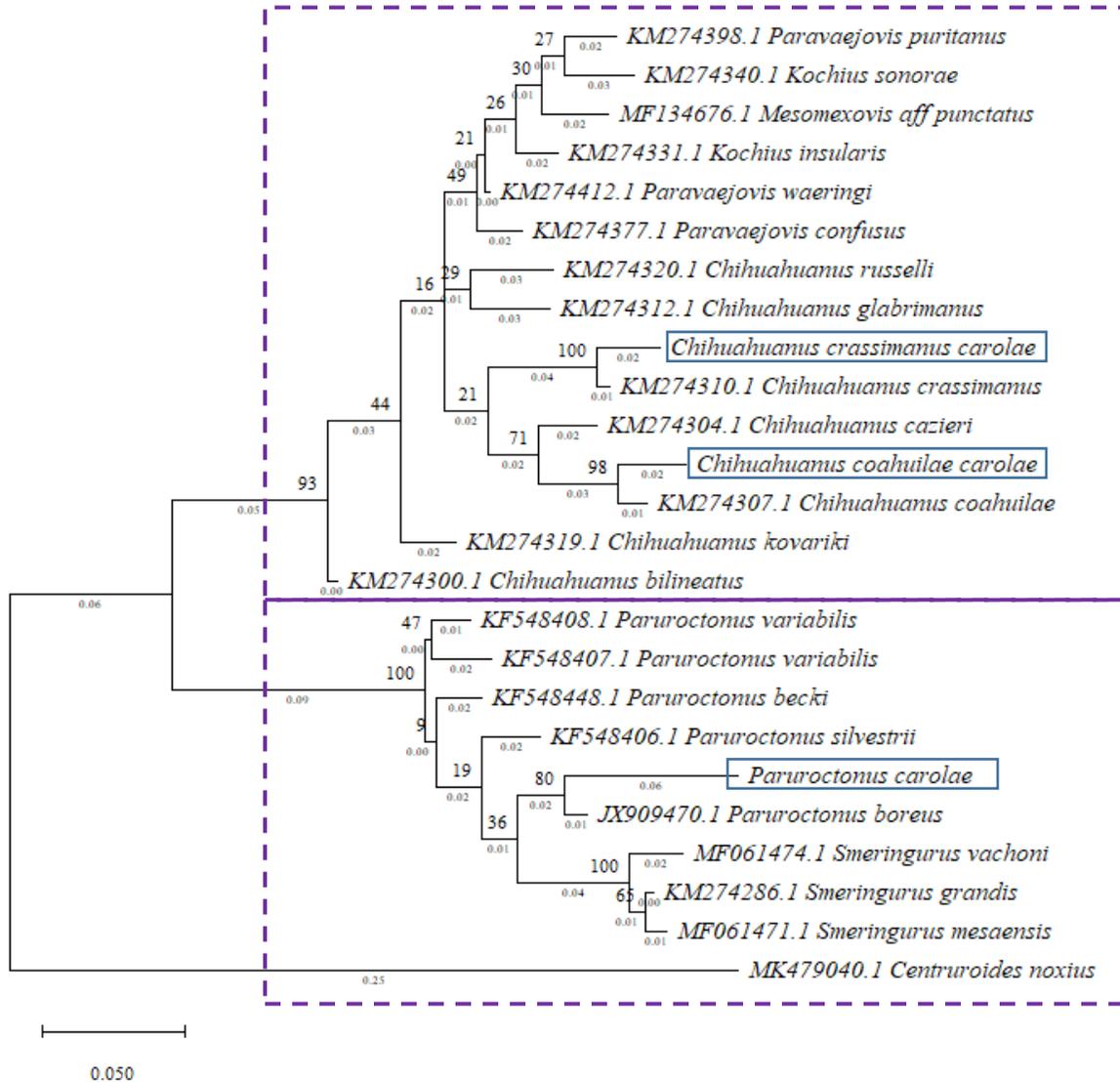


Figura 9. Análisis Filogenético del gen 16S. Análisis filogenético molecular del gen mitocondrial ARNr 16S utilizando el método de máxima verosimilitud (ML) generado con el Modelo Tamura 3- parameter con distribución Gamma (T92+G) con 100 réplicas bootstrap. Se muestra el árbol con la mayor probabilidad logarítmica. El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon se muestra junto a las ramas. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. Cada secuencia se indica mediante su número de acceso a GenBank. Los recuadros indican las secuencias obtenidas en este proyecto.

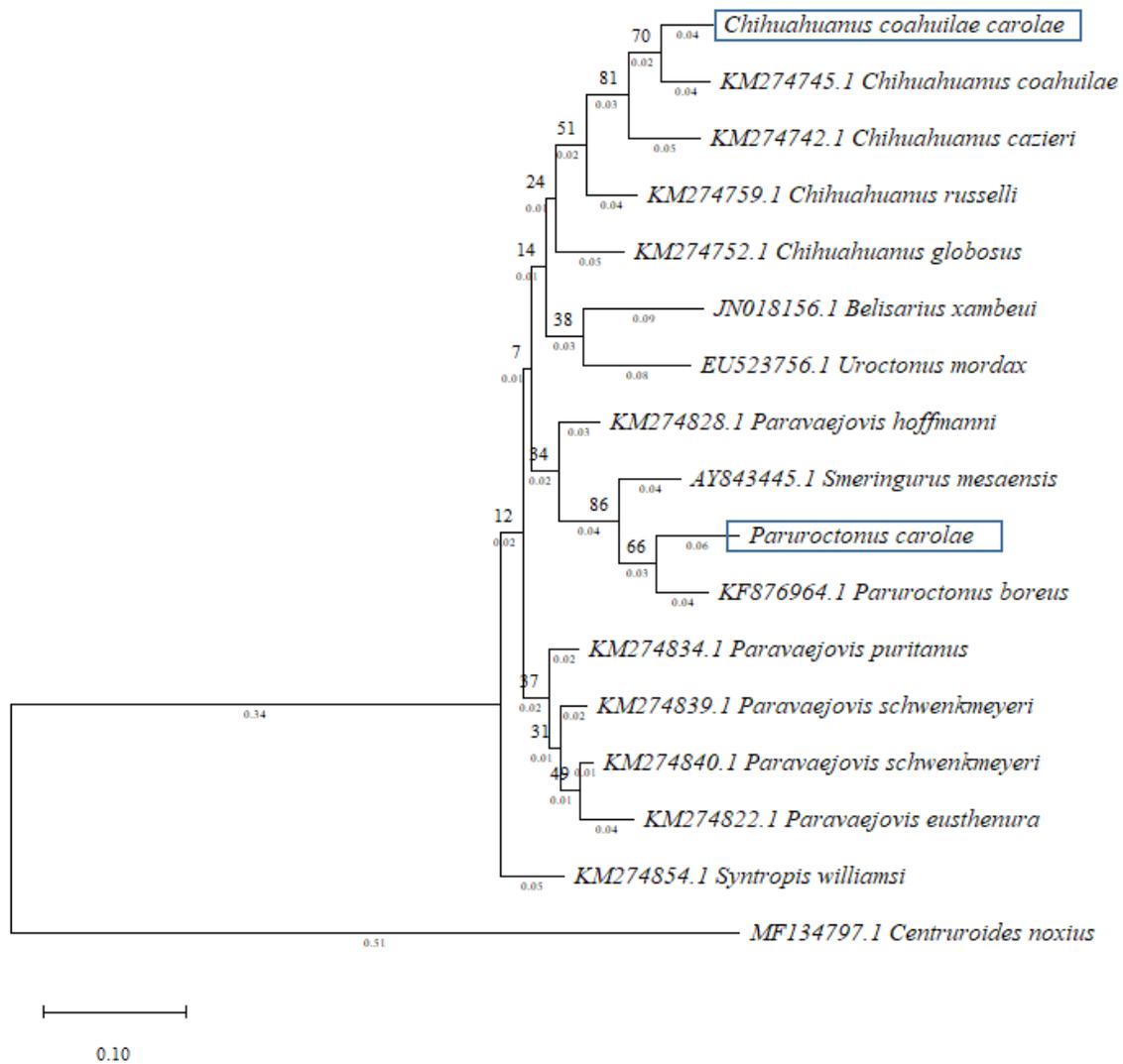


Figura 10. Análisis Filogenético del gen COI. Análisis filogenético molecular del gen mitocondrial ARNr COI utilizando el método de máxima verosimilitud (ML) generado con el Modelo Tamura 3- parameter con distribución Gamma (T92+G) con 100 réplicas bootstrap. Se muestra el árbol con la mayor probabilidad logarítmica. El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon se muestra junto a las ramas. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. Cada secuencia se indica mediante su número de acceso a GenBank. Los recuadros indican las secuencias obtenidas en este proyecto.

6.4 Ensayo de búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana

Las pruebas antimicrobianas se realizaron utilizando el ensayo previamente descrito, la actividad antimicrobiana se probó contra las cepas ATCC Gram negativa *E. coli*, y la cepa Gram positiva *E. faecalis*, los cultivos bacterianos se cultivaron hasta la fase de crecimiento exponencial que el protocolo señala, la concentración bacteriana se estimó fotométricamente a 600 nm. Después de tener la concentración deseada en el medio con bacterias se combinó con agar y se dejó reposar la mezcla hasta polimerizar para posteriormente agregar el veneno crudo de las diferentes especies de alacranes. Las bacterias se dejaron en incubación con los venenos durante 18 horas a una temperatura de 37 °C. En las figuras se muestran diferentes halos de inhibición de los diferentes venenos, para las tres especies se utilizó una concentración de 2 µg/ml, además de un control positivo que fue Kanamicina a una concentración de 10 mg/ml y como control negativo se utilizó PBS (figura 11).

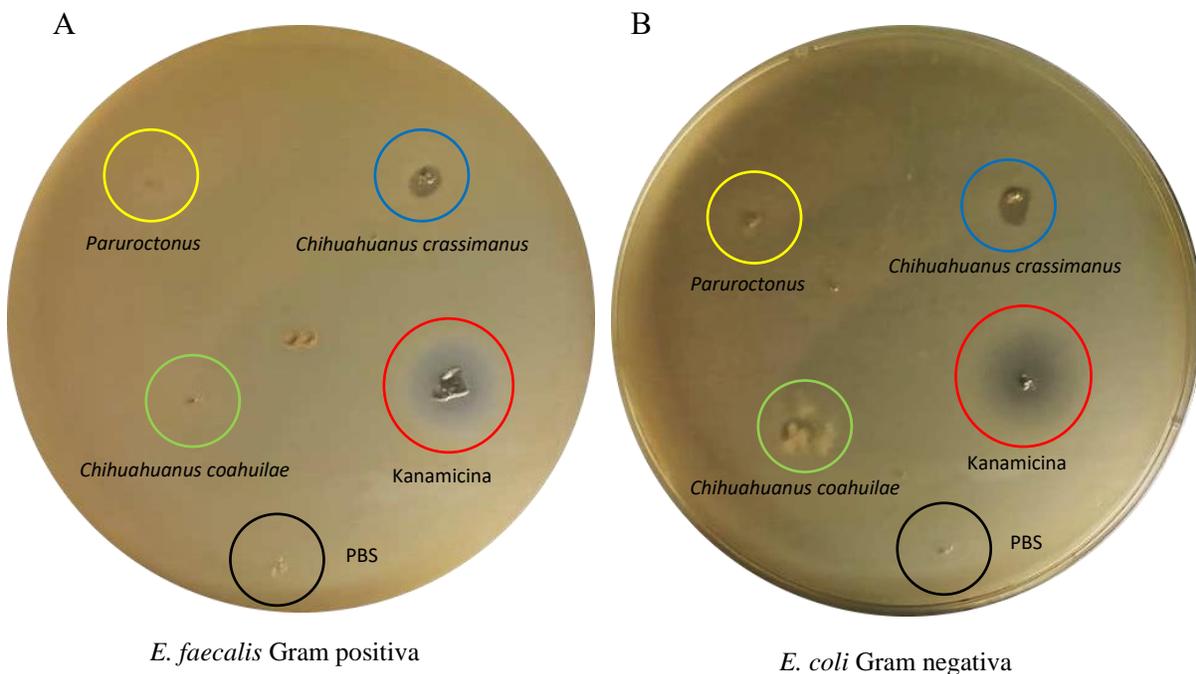


Figura 11. Prueba de péptidos antimicrobianos. Se probaron tres venenos diferentes de las especies *Paruroctonus* (círculo amarillo), *Chihuahuanus crassimanus* (círculo azul) y *Chihuahuanus coahuilae* (círculo verde) a una concentración de 2 µg/ml en una cepa Gram positiva *E. faecalis* (figura A) y Gram negativa *E. coli* (figura B). Se utilizó como control positivo kanamicina (círculo rojo), y control negativo PBS (círculo negro).

6.5 Prueba de actividad fosfolipasa

Se desarrolla este protocolo con la finalidad de comprobar la presencia de fosfolipasas en el veneno de esta especie, además de saber el tipo de fosfolipasa que tiene (Figura 12). Las fosfolipasas tipo A aclaran la suspensión de yema de huevo, por hidrólisis de los fosfolípidos presentes en ella. Esto es también cierto cuando el sustrato se incorpora a geles de agar o agarosa. Se desarrollan áreas claras alrededor de los pozos donde se aplica la enzima, su diámetro, en un amplio rango de dosis, es proporcional al logaritmo de la concentración de la enzima aplicada. Las bajas actividades de la fosfolipasa B, junto con la fosfolipasa A altamente activa, pueden seguirse en la placa de yema de huevo, ya que la fosfolipasa B hace que las zonas una vez despejadas se vuelvan centralmente turbias (58). Se probaron los venenos crudos de las especies *Paruroctonus* (círculo amarillo), *Chihuahuanus crassimanus* (círculo azul) y *Chihuahuanus coahuilae* (círculo verde) a una concentración de 2 µg/ml y control negativo PBS (círculo negro). Como se muestra en la figura, se puede observar que los diferentes venenos presentan fosfolipasas tipo A así como también tipo B. Se siguió el protocolo reportado por Habermann y Hardt en 1972.

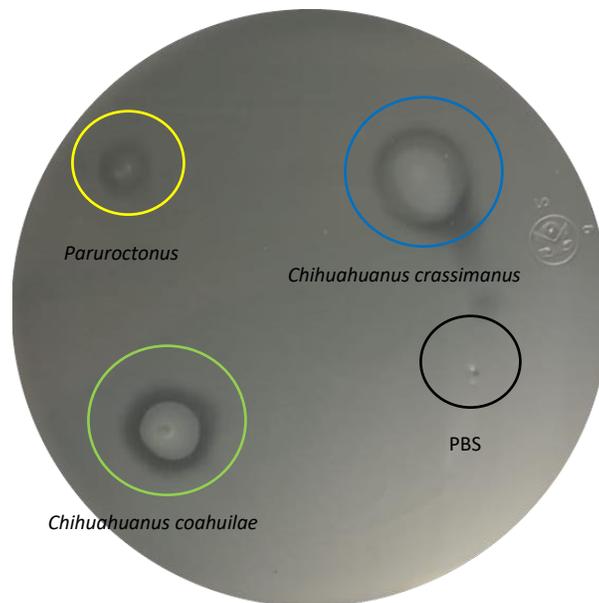


Figura 12. Prueba de actividad fosfolipasa. Se probaron tres venenos diferentes de las especies *Paruroctonus* (círculo amarillo), *Chihuahuanus crassimanus* (círculo azul) y *Chihuahuanus coahuilae* (círculo verde) a una concentración de 2 µg/ml y control negativo PBS (círculo negro).

6.6 TESIS

Al caracterizar molecular y taxonómicamente las especies encontradas al Sureste del Estado de Chihuahua, se pudo clasificar especies que no estaban descritas como endémicas del Estado, además, al realizar su caracterización bioquímica, se constató la presencia de compuestos con actividades antimicrobiana y fosfolipasa, que tienen un potencial uso como tratamientos en diversas enfermedades.



Figura 13. Diagrama ilustrativo del proceso metodológico de esta investigación

VII. DISCUSIÓN

En este proyecto se estudiaron tres especies de alacranes endémicas del Estado de Chihuahua, se recolectaron al Sureste del Estado y se procedió a la clasificación de los especímenes de manera molecular y taxonómica. También se hizo una caracterización parcial de la composición bioquímica su veneno, con un enfoque en evaluar si cuentan con actividad antimicrobiana y fosfolipasa.

La diversidad del Estado de Chihuahua proporciona las condiciones para que exista una fauna diversa, por lo que se puede observar gran diversidad de alacranes en el Estado. Aun cuando las especies encontradas en Chihuahua no representan un problema epidemiológico de salud, el estudio de sus venenos nos puede dar acceso a una gran cantidad de compuestos novedosos que tienen una potencial aplicación en el área de la biomedicina. Las dificultades para identificar especies basadas en técnicas morfológicas, así como el escaso número de estudios, son unas de las razones por las que el uso de marcadores moleculares puede brindar una herramienta útil para una evaluación más precisa de la diversidad de especies que se encuentran en el Estado de Chihuahua (13). Williams en 1968 (11) reporta la clasificación de cinco nuevas especies pertenecientes a la familia *Vaejovidae*, una de ellas *vaejovis coahuilae*, que tiempo después se redefiniría como *Chihuahuanus coahuilae* (59), Williams realiza una clasificación taxonómica donde reporta medidas morfológicas y características principales de la especie, además el número de pectinas que se presentan en machos (17-21) y hembras (13-16). Basándonos en esto, y al comparar con los especímenes encontrados al Sureste de Chihuahua (ya una vez clasificados molecularmente como esta especie), se puede constatar que el número de pectinas es consistente con lo que reporta Williams en 1968. La bibliografía encontrada sobre la especie *Paruroctonus boreus* data al año 1974 (60) donde se describe la manera de recolección de especímenes y se realiza una tabla de mediciones taxonómicas de especímenes machos y hembras y al igual que Williams, se menciona el número de pectinas esperado para machos (27-32) y hembras (20-22), comparando estos rangos de número de pectinas con los especímenes encontrados, se puede inferir que esta característica sigue siendo igual, en lo referente al número de especímenes encontrados en el área de recolección en el Sureste del Estado, hay una diferencia significativa en la predominancia de otras especies sobre *Paruroctonus*. González-Santillán y Prendini en su artículo Filogenia de la subfamilia del escorpión *vaejovid* norteamericano *Syntropinae*

Kraepelin, 1905, basada en la morfología, el ADN mitocondrial y nuclear (61) clasifican diversas especies, entre ellas se encuentran las especies encontradas en el Sureste del Estado, pertenecientes a la familia *Syntropinae* encontramos el género *Chihuahuanus* y las dos especies, *crassimanus* y *coahuilae*. La tribu "*Paruroctonini*" de Stockwell (1989) se eliminó de *Syntropinae* y se renombró como subfamilia *Smeringurinae* (62). Las tres especies encontradas al Sureste del Estado pertenecen a la familia *Vaejovidae* que es una de las familias con mayor cantidad de especies en México (2,63), los alacranes pertenecientes a esta familia son conocidos por no presentar neurotoxinas en sus venenos, sin embargo la diversidad de componentes en ellos han demostrado ser una mina de compuestos con posibles aplicaciones terapéuticas (2). En los árboles filogenéticos se observó que, como era de esperarse, los tres marcadores genéticos son capaces de diferenciar con gran confiabilidad las tres especies. Con base en lo que reporta González-Santillán y Prendini en su artículo Redefinición y Revisión Genérica del escorpión Norteamericano *Vaejovid* Subfamilia *Syntropinae* *Kraepelin*, 1905, con descripciones de seis nuevos Géneros (59) se realiza el análisis filogenético de las especies de la subfamilia *Syntropinae* *Kraepelin*, dentro de este análisis se incluyen las especies *Chihuahuanus coahuilae* y *Chihuahuanus crassimanus* y cuando se compara este análisis con el realizado con las secuencias obtenidas de los alacranes del Sureste del Estado (Anexo 2) se corrobora la clasificación realizada en este proyecto.

En el año 2000 se reportó el primer péptido antimicrobiano aislado de veneno de alacrán, Hadrurin, del alacrán mexicano *Hadrurus aztecus* un péptido de 41 aminoácidos que fue capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias *Salmonella thyphi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Serratia marscesces* (28). Otros péptidos antimicrobianos aislados del alacrán mexicano *Vaejovis mexicanus* son el VmCT1 y VmCT2, las secuencias de estos péptidos se obtuvieron a partir de la secuencia precursora de cada uno, obtenidas por las secuencias de las librerías de cDNA generadas del RNA mensajero obtenido de su glándula venenosa, estos péptidos son de 13 aminoácidos y fueron generados por síntesis química y con amidación en la región N-terminal (28). También se probó la acción de ciertas fracciones de venenos de alacrán y araña, además de la acción que presentan combinándolas con antibióticos comerciales, específicamente los péptidos (AMP) La47 y Css54, aislados del veneno de la araña *Lachesana sp.*, y del alacrán *Centruroides suffusus*, respectivamente. La acción biológica de ambos, fue comparada con el AMP Pin2 aislado del

veneno del alacrán *Pandinus imperator* (64). Se descubrió también que La47 tiene actividad hemolítica y antimicrobiana más baja comparada con Css54 y Pin2. Al evaluar La47 y Pin2 en presencia de antibióticos comerciales se probó que la mejor combinación se obtuvo al mezclar La47 y Pin2 con los antibióticos cloranfenicol, estreptomicina, y kanamicina (65). Los venenos de los alacranes del Estado de Chihuahua demostraron tener actividad antimicrobiana, específicamente las especies *Chihuahuanus crassimanus* y *coahuilae* se probaron en cepas Gram positiva y negativa en primera estancia con veneno crudo, obteniendo resultados positivos, posteriormente se probaron fracciones aisladas del veneno de *Chihuahuanus crassimanus* en la bacteria nosocomial pan-resistente aislada de un paciente masculino en su sexta década de vida, con diagnóstico de COVID, y se encontró una fracción que inhibió el crecimiento de esta bacteria en el ensayo de placa para determinación de actividad antimicrobiana.

La fosfolipasa A2 (PLA2) escinde el enlace éster en la posición 2 del resto glicerol de fosfolípidos, y se distribuye ampliamente en mamíferos, reptiles y artrópodos. Recientemente, la antigua clasificación de PLA2 en tres grupos se amplió de acuerdo con algunas características estructurales y funcionales, como el número de puentes disulfuro y el tipo de aminoácidos responsables de la actividad catalítica, que se encuentra en el PLA2 recién descubierto. Además de la función hidrolítica general de estas enzimas, varias funciones biológicas específicas se han asociado con miembros de la superfamilia PLA2. Entre estas funciones se encuentran la acción antiinflamatoria, los efectos mionecróticos y dañinos musculares y la actividad de bloqueo de canales iónicos. La β -bungarotoxina y la crotoxina son otros dos componentes tóxicos del veneno bien conocidos con actividad PLA2. Las PLA2 son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces acilo sn-2 de sn-3 fosfolípidos, y son mediadores celulares normales implicados en diferentes respuestas, como inflamación, hemostasia sanguínea y otras. Muchos venenos de animales poseen PLA2 que median varias respuestas tóxicas, como citotoxicidad, neurotoxicidad, miotoxicidad, edema y alteraciones de la coagulación sanguínea. Según su estructura primaria, estas toxinas pueden clasificarse en distintas clases de árboles: la clase I se encuentra en el veneno de serpientes Elapidae; la clase II se encuentra en la familia de serpientes Viperidae; y clase III que se identificó por primera vez en el veneno de abeja. Posteriormente se encontraron en otros invertebrados como medusas, caracoles marinos y venenos de alacrán, pero también están presentes en vertebrados, como el lagarto venenoso Heloderma (66). Se realizó la prueba de actividad fosfolipasa para el veneno de *Chihuahuanus coahuilae* con un halo de

inhibición de diámetro 0.5 cm, *Chihuahuanus crassimanus* con un halo de inhibición de diámetro 0.6 cm y *Paruroctonus* con un halo con diámetro de 0.2 cm, de cada especie se utilizó una concentración de 2 µg/µl de veneno crudo (figura 12). En todos los casos se puede observar la presencia de fosfolipasas tipo A y B. Las fosfolipasas tipo A aclaran la suspensión de yema de huevo, mientras que baja actividad de fosfolipasa tipo B en conjunto con una alta cantidad de la tipo A, se puede observar en placa que las zonas aclaradas por la tipo A se vuelven turbias centralmente debido a la fosfolipasa tipo B (58).

VIII. CONCLUSIONES

El estudio y clasificación taxonómica de los alacranes, por medios tradicionales (de acuerdo a sus características físicas, morfológicas, medidas, etc.) o moleculares (marcadores mitocondriales) requieren de atención, ya que esto permitirá realizar estudios relacionados a la localización de alacranes con potencial interés médico, al saber si en su veneno están presentes los compuestos responsables del envenenamiento, o si cuentan con ciertos péptidos que puedan aplicarse al área de la salud en el Estado de Chihuahua.

Por otra parte, la caracterización bioquímica de los venenos, así como la búsqueda de aplicaciones biotecnológicas a los componentes aislados, requieren de infraestructura y modelos biológicos donde puedan ser ensayadas las toxinas o péptidos de interés, ya que en algunos casos es necesario determinar la potencia con la que actúan sobre los modelos biológicos en donde son retados. Para ello, se han establecido alianzas estratégicas con otros grupos de investigación en el País, en estos centros de investigación donde se cuenta con la experiencia, la tecnología y la masa crítica que permite el desarrollo de nuevas y novedosas aplicaciones a los compuestos activos aislados del veneno de los alacranes.

La investigación en torno a la caracterización de venenos en el Estado de Chihuahua, tiene mucho camino por delante, existe un campo fértil en el área de clasificación molecular de nuevas especies en el Estado, y el potencial descubrimiento de nuevos compuestos aislados de sus venenos representa un fuente biológica invaluable, con el potencial de presentar nuevos productos antimicrobianos, inmunomoduladores y quizá agentes antineoplásicos presentes en la glándula de estos organismos.

El estudio de especies de alacranes que no se consideran peligrosas para los humanos, como los del Estado de Chihuahua, representan un reto tecnológico y la oportunidad de generar nuevo conocimiento y personal altamente calificado a través del estudio de estos venenos que podrían ser fuente de compuestos novedosos y con diversas aplicaciones para el área biomédica.

IX. REFERENCIAS

1. Possani Postay LD. El estudio de los componentes del veneno de alacranes en el contexto de la biología molecular, la farmacología y la medicina. *Biotecnologia*. 2007;
2. Santibáñez-López CE, Francke OF, Ureta C, Possani LD. Scorpions from Mexico: From species diversity to venom complexity. *Toxins*. 2015.
3. Castrillón D, Acosta J, Hernández E, Alonso L, Nogué S, Martín MC, et al. Animales venenosos. *Toxicon*. 2017;
4. Rodríguez De La Vega RC, Possani LD. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: Biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*. 2005.
5. Tytgat J, Chandy KG, Garcia ML, Gutman GA, Martin-Eauclaire MF, Van Der Walt JJ, et al. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1999.
6. Schwartz EF, Michelle Capes E, Diego-García E, Zamudio FZ, Fuentes O, Possani LD, et al. Characterization of hadrucalcin, a peptide from *Hadrurus gertschi* scorpion venom with pharmacological activity on ryanodine receptors. *Br J Pharmacol*. 2009;
7. Valdez-Cruz NA, Batista CVF, Possani LD. Phaiodactylipin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A2 from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *Eur J Biochem*. 2004;
8. Chakravarthy AK, Sridhara S. Arthropod diversity and conservation in the tropics and sub-tropics. *Arthropod Diversity and Conservation in the Tropics and Sub-Tropics*. 2016.
9. En GO, Se QUE, La P. alacranes de la familia Buthidae Centruroides del Estado de Guanajuato . 2016;
10. Possani LD. El alacrán y su piquete. *Dir Gen Divulg la Ciencia UNAM, México* [Internet]. 2005;24. Available from: http://www.dgdc.unam.mx/assets/cienciaboletto/cb_01.pdf
11. Scorpions from northern Mexico; five new species of *Vejovis* from Coahuila, Mexico. *Occas Pap Calif Acad Sci* [Internet]. 1968 [cited 2019 Oct 8];68:1–24. Available from: <https://www.biodiversitylibrary.org/part/75037>
12. Gaffin DD, Bumm LA, Taylor MS, Popokina N V., Mann S. Scorpion fluorescence and

- reaction to light. *Anim Behav.* 2012;83(2):429–36.
13. Soltan-Alinejad P, Rafinejad J, Dabiri F, Onorati P, Terenius O, Chavshin AR. Molecular analysis of the mitochondrial markers COI, 12S rDNA and 16S rDNA for six species of Iranian scorpions. *BMC Res Notes* [Internet]. 2021;14(1):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05449-3>
 14. Borges A, Bermingham E, Herrera N, Alfonzo MJ, Sanjur OI. Molecular systematics of the neotropical scorpion genus *Tityus* (Buthidae): The historical biogeography and venom antigenic diversity of toxic Venezuelan species. *Toxicon* [Internet]. 2010;55(2–3):436–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.09.011>
 15. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2003;270(1512):313–21.
 16. Lv, Jizhou, Wu, Shaoqiang, Zhang Yongning, Chen Yan, Feng Chunyan, Yuan Xiangfen, Jia Guangle, Deng Junhua, Wang Caixia, Wang Qin, Mei Lin LX. Assessment of four DNA fragment for species identification of the Isodida.pdf. *Parasit Vectors.* 2014;7(1):1–11.
 17. Cavalli-Sforza LL, Edwards AW. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am J Hum Genet.* 1967 May;19(3 Pt 1):233–57.
 18. Nei M, Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics.* Oxford university press; 2000.
 19. Ortiz E, Gurrola GB, Schwartz EF, Possani LD. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon.* 2015;
 20. Quintero-Hernández V, Jiménez-Vargas JM, Gurrola GB, Valdivia HHF, Possani LD. Scorpion venom components that affect ion-channels function. Available from: www.uniprot.org/program/
 21. Zeng X, Corzo G, Hahin R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB Life.* 2005;57(1):13–21.
 22. de la Vega RCR, Schwartz EF, Possani LD. Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon.* 2010;56(7):1155–61.
 23. Rincón-Cortés CA, Reyes-Montaña EA, Vega-Castro NA. Purificación parcial de péptidos y actividad citotóxica del veneno *T. macrochirus*. *Biomédica.* 2017;37(2).
 24. Jovetic S, Zhu Y, Marcone GL, Marinelli F, Tramper J. β -Lactam and glycopeptide antibiotics: First and last line of defense? *Trends in Biotechnology.* 2010.

25. Pallecchi L, Bartoloni A, Paradisi F, Rossolini GM. Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: Mechanisms and implications. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2008.
26. Lambert RJW, Lambert R. A model for the efficacy of combined inhibitors. *J Appl Microbiol*. 2003;
27. Linden PK. Treatment options for vancomycin-resistant enterococcal infections. *Drugs*. 2002.
28. Quintero-Hernández V, Cesa-Luna C, Muñoz-Rojas J. Péptidos antimicrobianos de alacrán. *Alianzas y Tendencias BUAP*. 2017;2(6):10–6.
29. Hernández-Aponte CA, Silva-Sanchez J, Quintero-Hernández V, Rodríguez-Romero A, Balderas C, Possani LD, et al. Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus*. *Toxicon*. 2011;
30. Cao L, Dai C, Li Z, Fan Z, Song Y, Wu Y, et al. Antibacterial activity and mechanism of a Scorpion venom peptide derivative in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2012;
31. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: An Overview. Vol. 10, *International Journal of Environmental Research and Public Health* . 2013.
32. A. CM, J. LR, Roland S, M. KK, Marta W, Brett FB. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli* . *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2013 Oct 1;26(4):822–80. Available from: <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
33. McBride SM, Fischetti VA, LeBlanc DJ, Moellering Jr. RC, Gilmore MS. Genetic Diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS One* [Internet]. 2007 Jul 4;2(7):e582. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000582>
34. Tanner MR, Pennington MW, Chamberlain BH, Huq R, Gehrmann EJ, Laragione T, et al. Targeting KCa1.1 channels with a scorpion venom peptide for the therapy of rat models of rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2018;365(2):227–36.
35. Hu X, Laragione T, Sun L, Koshy S, Jones KR, Ismailov II, et al. KCa1.1 potassium channels regulate key proinflammatory and invasive properties of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *J Biol Chem*. 2012;287(6):4014–22.
36. Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, et al. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the

- scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem*. 1990;
37. Morgan GW, Ward R, Barton M. The contribution of cytotoxic chemotherapy to 5-year survival in adult malignancies. *Clin Oncol*. 2004;
 38. Gaspar D, Salomé Veiga A, Castanho MARB. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Frontiers in Microbiology*. 2013.
 39. Heinen TE, Gorini da Veiga AB. Arthropod venoms and cancer. *Toxicon*. 2011.
 40. DeBin JA, Maggio JE, Strichartz GR. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 1993;
 41. Deshane J, Garner CC, Sontheimer H. Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. *J Biol Chem*. 2003;
 42. Li B, Lyu P, Xi X, Ge L, Mahadevappa R, Shaw C, et al. Triggering of cancer cell cycle arrest by a novel scorpion venom-derived peptide—Gonearrestide. *J Cell Mol Med*. 2018;22(9):4460–73.
 43. Incamnoi P, Patramanon R, Thammastirak S, Chaveerach A, Uawonggul N, Sukprasert S, et al. Heteromtoxin (HmTx), a novel heterodimeric phospholipase A2 from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. *Toxicon*. 2013;
 44. Harris JB, Scott-Davey T. Secreted phospholipases A 2 of snake venoms: Effects on the peripheral neuromuscular system with comments on the role of phospholipases A 2 in disorders of the CNS and their uses in industry. *Toxins*. 2013.
 45. Conde R, Zamudio FZ, Becerril B, Possani LD. Phospholipin, a novel heterodimeric phospholipase A2 from *Pandinus imperator* scorpion venom. *FEBS Lett*. 1999;
 46. Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A 2 structure/function, mechanism, and signaling. *Journal of Lipid Research*. 2009.
 47. Quintero-Hernández V, Jiménez-Vargas JM, Gurrola GB, Valdivia HH, Possani LD. Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon*. 2013.
 48. Santibáñez-López CE, Francke OF, Ureta C, Possani LD. Scorpions from Mexico: From species diversity to venom complexity. *Toxins*. 2015.
 49. Boyle P, Levin B. World CanCer report 2008. Vol. 199, *Cancer Control*. 2008. 512 p.
 50. Partridge AH, Burstein HJ, Winer EP. Side effects of chemotherapy and combined chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer. *Journal of the National*

- Cancer Institute. Monographs. 2001.
51. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;
 52. Peláez-Ballestas I, Sanin LH, Moreno-Montoya J, Alvarez-Nemegyei J, Burgos-Vargas R, Garza-Elizondo M, et al. Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *J Rheumatol*. 2011;
 53. Yu M, Liu SL, Sun PB, Pan H, Tian CL, Zhang LH. Peptide toxins and small-molecule blockers of BK channels. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2016.
 54. Carcamo-Noriega EN, Possani LD, Ortiz E. Venom content and toxicity regeneration after venom gland depletion by electrostimulation in the scorpion *Centruroides limpidus*. *Toxicon*. 2019;
 55. McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, et al. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. Available from: <http://www.uniprot.org/align/>
 56. SEMARNAT. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. NORMA Of Mex NOM-062-ZOO-1999. 2011;42(2):2.
 57. Unidas N. Declaración universal de los derechos de los animales. *Derecho*. 1978;1:4–6.
 58. Habermann E, Hardt KL. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Anal Biochem*. 1972;
 59. González-Santillán E, Prendini L. Redefinition and Generic Revision of the North American Vaejovid Scorpion Subfamily Syntropinae Kraepelin, 1905, with Descriptions of Six New Genera. *Bull Am Museum Nat Hist*. 2013;
 60. Tourtlotte GI. STUDIES ON THE BIOLOGY AND ECOLOGY OF THE NORTHERN SCORPION, *PARUROCTONUS BOREUS* (GIRARD). *Gt Basin Nat* [Internet]. 1974 Oct 28;34(3):167–79. Available from: <http://www.jstor.org/stable/41711422>
 61. González-Santillán E, Prendini L. Phylogeny of the North American vaejovid scorpion subfamily Syntropinae Kraepelin, 1905, based on morphology, mitochondrial and nuclear DNA. *Cladistics* [Internet]. 2015 Aug 1;31(4):341–405. Available from: <https://doi.org/10.1111/cla.12091>
 62. Soleglad ME, Fet V. Contributions to Scorpion Systematics: Subfamilies Smeringurinae and Syntropinae (Scorpiones: Vaejovidae). III. Marshall University; 2008.

63. González-Santillán E, Prendini L. Redefinition and generic revision of the north american vaejovid scorpion subfamily syntropinae kraepelin, 1905, with descriptions of six new genera. *Bull Am Museum Nat Hist.* 2013;1992(382):1–71.
64. CORZO G, ESCOUBAS P, VILLEGAS E, BARNHAM KJ, HE W, NORTON RS, et al. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem J.* 2001;
65. Garcia F, Villegas E, Espino-Solis GP, Rodriguez A, Paniagua-Solis JF, Sandoval-Lopez G, et al. Antimicrobial peptides from arachnid venoms and their microbicidal activity in the presence of commercial antibiotics. *J Antibiot (Tokyo).* 2013;
66. Lazo F, Rodríguez E, Yarlequé A. Evaluación comparativa de dos métodos para determinar la actividad de fosfolipasa a en venenos de serpientes. *Rev Peru Biol.* 1998;5(2):98–102.

X. ANEXOS

Anexo 1

Cromatograma del veneno del alacrán Chihuahuanus crassimanus

Se separaron 2 mg de cada uno de los venenos en una columna de fase reversa (Discovery C18, 25 cm x 4.6 mm, 5 µm) en un gradiente de 0 a 60 % de acetonitrilo.

Solución A: H2O destilada + 0.1 % de ácido trifluoroacético.

Solución B: acetonitrilo + 0.1 % de ácido trifluoroacético.

Las fracciones se tomaron de manera manual y el tiempo de retención se documentó en un archivo de Excel, este es cuando comienza el pico o es parte del pico, ya que los picos salen muy próximos unos de otros. Se realizó el análisis del veneno de los alacranes *Chihuahuanus crassimanus*, siguiendo el método descrito anteriormente se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por medio del cual se separó el veneno, lo que permitió conocer sus componentes dando como resultado fracciones que pueden tener una potencial aplicación en el área biomédica (Figura 14).

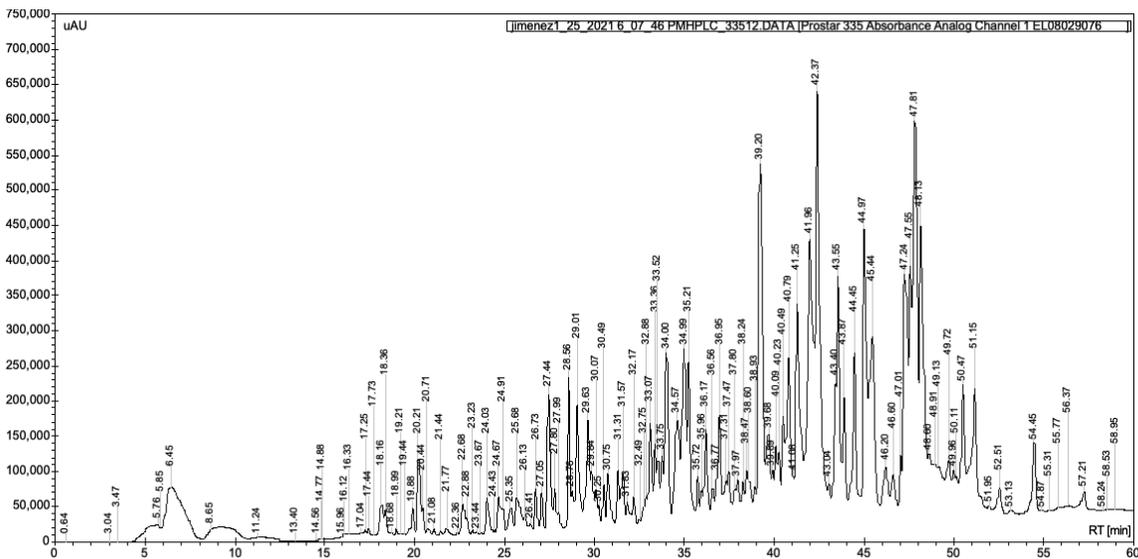


Figura 14. Análisis de veneno por medio de HPLC. Gradiente 0-60% B (Acetonitrilo) en 60 min del veneno de alacranes *Chihuahuanus crassimanus* recolectados en el Sureste del Estado de Chihuahua.

Prueba de actividad antimicrobiana con fracciones de veneno del alacrán Chihuahuanus crassimanus

Las pruebas antimicrobianas se realizaron utilizando el ensayo previamente descrito, la actividad antimicrobiana se probó contra la bacteria *Acinetobacter baumannii* los cultivos bacterianos se cultivaron hasta la fase de crecimiento exponencial que el protocolo señala, la concentración bacteriana se estimó fotométricamente a 600 nm. Después de tener la concentración deseada en el medio con bacterias se combinó con agar y se dejó reposar la mezcla hasta polimerizar para posteriormente agregar las diferentes fracciones separadas del veneno del alacrán *Chihuahuanus crassimanus*. La bacteria se dejó en incubación con las fracciones durante 18 horas a una temperatura de 37 °C. En las figuras se muestran diferentes halos de inhibición de las diferentes fracciones, se utilizó una concentración de 2 µg/ml, además como control positivo los péptidos C554 y FA1 a una concentración de 2 µg/ml y como control negativo se utilizó PBS (figura 15).

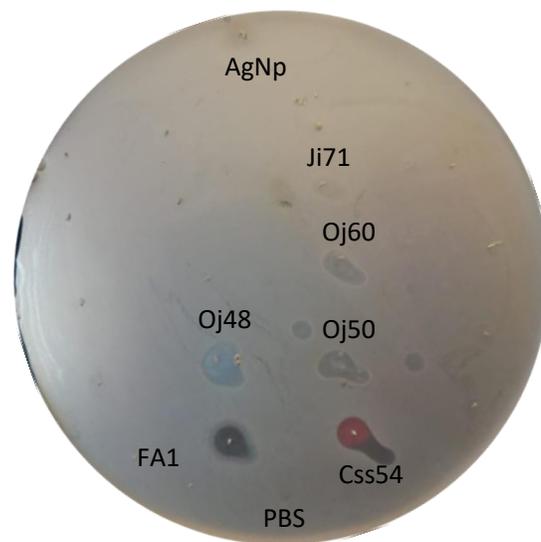


Figura 15. Prueba de actividad antimicrobiana en bacteria *Acinetobacter baumannii*. Se probaron las fracciones del alacrán *Chihuahuanus crassimanus* de Ojinaga y Jiménez, un total de 18 fracciones (8 Oj, 10 Ji) se utilizaron controles positivo y negativo, siendo el primero las fracciones C554 del alacrán *Centruroides suffusus* y la fracción FA1 del alacrán *Hadrurus gertschi*, como control negativo se utilizó PBS.

Prueba de actividad fosfolipasa con fracciones de veneno del alacrán Chihuahuanus crassimanus

Se desarrolla este protocolo con la finalidad de comprobar la presencia de fosfolipasas en el veneno de esta especie, se evalúan fracciones específicas. Además poder conocer el tipo de fosfolipasa que tiene (Figura 16). Las fosfolipasas tipo A aclaran la suspensión de yema de huevo, por hidrólisis de los fosfolípidos presentes en ella. Esto es también cierto cuando el sustrato se incorpora a geles de agar o agarosa. Se desarrollan áreas claras alrededor de los pozos donde se aplica la enzima, su diámetro, en un amplio rango de dosis, es proporcional al logaritmo de la concentración de la enzima aplicada, se siguió el protocolo reportado por Habermann y Hardt en 1972.

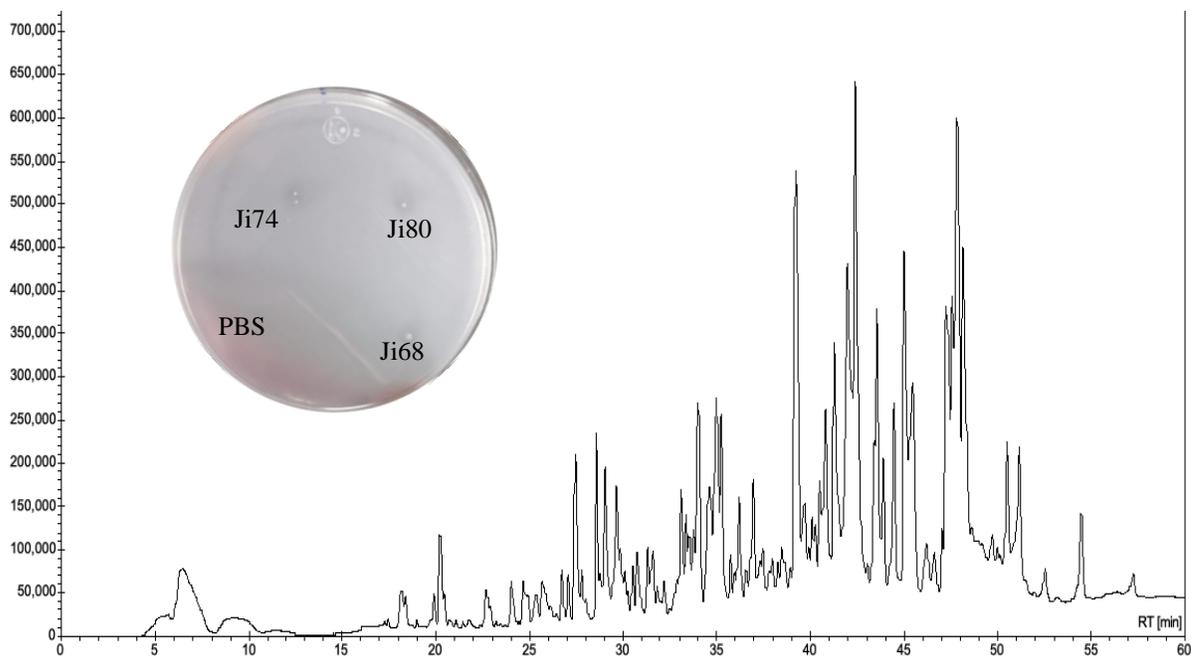


Figura 16. Prueba de actividad enzimática. Se probaron tres fracciones diferentes 68, 74 y 80 de la especie *Chihuahuanus crassimanus* a una concentración de 2 µg/ml y control negativo PBS.

Anexo 3



Chihuahua, Chih. a 17 de Enero de 2020
Oficio: SIP/21/2020
Asunto: Dictamen de protocolo

**DR. GERARDO PAVEL ESPINO.
PRESENTE.-**

Por medio de la presente me permito comunicarle que el protocolo **CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL VENENO DE ALACRANES DEL ESTADO DE CHIHUAHUA** con número de registro interno **CI-058-19**, ha sido revisado y es **APROBADO** por el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas.

Sin más por el momento, quedo de Usted.

**ATENTAMENTE
"MENTI DA LUCEM, MANIBUS ARTEM"**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Bertha Olivia Larrinua Pacheco".

**DRA. BERTHA OLIVIA LARRINUA PACHECO
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**



**Secretaría de Investigación
y Posgrado**

FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS
Circuito Universitario, Campus II, C.P. 31125,
Tel. (614) 238.6039
Chihuahua, Chih., México
www.fm.uach.mx



Chihuahua, Chih., 29 de junio de 2020
Asunto: Dictámen de protocolo

DR. GERARDO PÁVEL ESPINO SOLIS
RESPONSABLE
PRESENTE.-

Por este medio notificamos a usted que, el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas, revisó el protocolo titulado **"CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL VENENO DE ALACRANES DEL ESTADO DE CHIHUAHUA"**, con número de registro CI-068-19 y se dictaminó como **Aprobado**.

Sin más por el momento, quedo de Usted.

ATENTAMENTE
"MENTI DA LUCEM, MANIBUS ARTEM"

A large, stylized handwritten signature in black ink, likely belonging to Dr. Carlos Roberto Cervantes Sánchez.



Facultad de
Medicina
y Ciencias Biomédicas



DR. CARLOS ROBERTO CERVANTES SÁNCHEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA
EN INVESTIGACIÓN FMyCB

FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS
Circuito Universitario, Campus II, C.P. 31125,
Tel. 52(614) 238.6030
Chihuahua, Chih., México
www.fm.uach.mx

Anexo 5

Protocolo para limpieza de ADN de producto de PCR y gel de agarosa

5 Protocols

5.1 PCR clean-up

The following protocol is suitable for PCR clean-up as well as DNA concentration and removal of salts, enzymes, etc. from enzymatic reactions (SDS < 0.1 %).

Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer NT3 was prepared according to section 3.

1 Adjust DNA binding condition

For very small sample volumes < 30 µL adjust the volume of the reaction mixture to 50–100 µL with water.

It is not necessary to remove mineral oil.

Mix **1 volume of sample** with **2 volumes of Buffer NT1** (e.g., mix 100 µL PCR reaction and 200 µL Buffer NT1).

Note: For removal of small fragments like primer dimers dilutions of Buffer NT1 can be used instead of 100 % Buffer NT1. Please refer to section 2.3.



+ 2 vol NT1 per
1 vol sample

2 Bind DNA

Place a **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column** into a Collection Tube (2 mL) and load up to 700 µL sample.

Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.

Load remaining sample if necessary and repeat the centrifugation step.



Load sample



11,000 x g
30 s

3 Wash silica membrane

Add **700 µL Buffer NT3** to the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column. Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.

Recommended: Repeat previous washing step to minimize chaotropic salt carry-over and improve A_{260}/A_{230} values (see section 2.7 for detailed information).



+ 700 µL NT3



11,000 x g
30 s



+ 700 µL NT3



11,000 x g
30 s

4 Dry silica membrane

Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g** to remove Buffer NT3 completely. Make sure the spin column does not come in contact with the flow-through while removing it from the centrifuge and the collection tube.



Note: Residual ethanol from Buffer NT3 might inhibit enzymatic reactions. Total removal of ethanol can be achieved by incubating the columns for 2–5 min at 70 °C prior to elution.



11,000 x g
1 min

5 Elute DNA

Place the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column into a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided). Add **15–30 µL Buffer NE** and incubate at **room temperature** (18–25 °C) for **1 min**. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.



+ 15–30 µL NE
RT
1 min
11,000 x g
1 min

Note: DNA recovery of larger fragments (> 1000 bp) can be increased by multiple elution steps with fresh buffer, heating to 70 °C and incubation for 5 min. See section 2.6 for detailed information.

5.2 DNA extraction from agarose gels

Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer NT3 was prepared according to section 3.

1 Excise DNA fragment/solubilize gel slice

Note: Minimize UV exposure time to avoid damaging the DNA. Refer to section 2.5 for more tips on agarose gel extraction.



Take a clean scalpel to excise the DNA fragment from an agarose gel. Remove all excess agarose.

- ! Determine the weight of the gel slice and transfer it to a clean tube.

For each **100 mg of agarose gel < 2%** add **200 µL Buffer NT1**.



**+ 200 µL NT1
per
100 mg gel**

For gels containing **> 2%** agarose, double the volume of Buffer NT1.

Incubate sample for **5–10 min** at **50 °C**. Vortex the sample briefly every 2–3 min until the gel slice is **completely** dissolved!

**50 °C
5–10 min**

2 Bind DNA

Place a **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column** into a Collection Tube (2 mL) and load up to 700 µL sample.



Load sample

Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.



**11,000 x g
30 s**

Load remaining sample if necessary and repeat the centrifugation step.

3 Wash silica membrane

Add **700 µL Buffer NT3** to the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column. Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.



+ 700 µL NT3



11,000 x g
30 s

Recommended: Repeat previous washing step to minimize chaotropic salt carry-over and low A_{260}/A_{230} (see section 2.7 for detailed information).



+ 700 µL NT3



11,000 x g
30 s

4 Dry silica membrane

Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g** to remove Buffer NT3 completely. Make sure the spin column does not come in contact with the flow-through while removing it from the centrifuge and the collection tube.



Note: Residual ethanol from Buffer NT3 might inhibit enzymatic reactions. Total removal of ethanol can be achieved by incubating the columns for 2–5 min at 70 °C prior to elution.



11,000 x g
1 min

5 Elute DNA

Place the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column into a **new** 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided). Add **15–30 µL Buffer NE** and incubate at **room temperature** (18–25 °C) for **1 min**. Centrifuge for **1 min** at 11,000 x g.



+ 15–30 µL NE

RT
1 min

Note: DNA recovery of larger fragments (> 1000 bp) can be increased by multiple elution steps with fresh buffer, heating to 70 °C and incubation for 5 min. See section 2.6 for detailed information.



11,000 x g
1 min