



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS CAMPECHE**

**PROGRAMA DE POSTGRADO EN BIOPROSPECCIÓN Y  
SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO**

**Composición molecular del fluido paralizante del  
himenóptero parasitoide *Pepsis mexicana* (Hymenoptera:  
Pompilidae)**

**MARIANA ANGÉLICA HUICAB URIBE**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

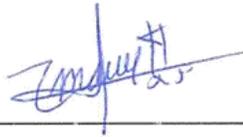
**CAMPECHE**

2019

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS  
REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el(la) que suscribe Mariana Angélica Huicab Uribe, Alumna de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Joel Lara Reyna, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Composición molecular del fluido paralizante del himenóptero parasitoide *Pepsis mexicana* (Hymenoptera: Pompilidae) y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos que se pueden derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y El que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta institución.

Sihochac, Champotón, Campeche a 12 de febrero de 2019.



---

**Biol. Mariana Angélica Huicab Uribe**

Firma



---

**Dr. Joel Lara Reyna  
Vo.Bo. del Consejero**

La presente tesis titulada: **Composición molecular del fluido paralizante del himenóptero parasitoide *Pepsis mexicana* (Hymenoptera: Pompilidae)** realizada por la alumna: **Mariana Angélica Huicab Uribe** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
BIOPROSPECCION Y SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO  
ORIENTACIÓN BIOPROSPECCIÓN

CONSEJO PARTICULAR

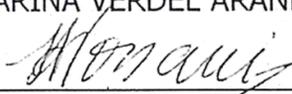
CONSEJERO

  
DR. JOEL LARA REYNA

ASESORA

  
DRA. KARINA VERDEL ARANDA

ASESOR

  
DR. LOURIVAL DOMINGOS POSSANI POSTAY

Sihochac, Champotón, Campeche, abril de 2019

**Composición molecular del fluido paralizante del himenóptero parasitoide  
*Pepsis mexicana* (Hymenoptera: Pompilidae)**

Mariana Angélica Huicab Uribe, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2019

**RESUMEN.**

Las avispas que pertenecen a la familia: Pompilidae paralizan a sus presas (arañas) para capturar y alimentar a sus larvas, representan un interesante reservorio de nuevos compuestos bioactivos. En este trabajo se recolectaron especímenes de tres miembros de Pompilidae, que se identificaron como *Pepsis mexicana*, *Pepsis terminata* y *Anoplius nigrinus* capturados en Campeche, México. El método de extracción del veneno se optimizó, se analizaron y compararon dichos venenos. Los patrones de electroforesis de una dimensión dan como resultado una mayor cantidad de proteínas para el género *Pepsis*, de igual manera el perfil cromatográfico de alta resolución, mostró un mayor contenido de compuestos en el veneno de las avispas *Pepsis*. Presentamos los resultados de las masas (m/z) obtenidas usando un sistema de trampa de iones para algunas de las fracciones de himenópteros previamente separadas por cromatografía, dichas masas, no se han reportado previamente, con la excepción de una probable bradiquinina en *A. nigrinus*. Se obtuvieron cinco secuencias por el método de degradación de Edman para las avispas *P. mexicana* y *P. terminata*. La caracterización enzimática reveló que el veneno de *P. mexicana* tiene actividad en los ensayos de metaloproteinasas, así como en la hidrólisis del ácido hialurónico; esta caracterización preliminar se suscribe al conocimiento de las biomoléculas presentes en los venenos parasitoides para aplicaciones biotecnológicas.

**Palabras clave: Pompilidae, metaloproteinasas, extracción de veneno.**

**Molecular composition of the paralyzing fluid of the parasitoid hymenopter  
*Pepsis mexicana*. (Hymenoptera: Pompilidae)**

Mariana Angélica Huicab Uribe, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2019

**ABSTRACT.**

The wasps belonging the Pompilidae family paralyze their prey (spiders) to capture and feeding of their larvae, represent an interesting reservoir of new bioactive compounds. In this work we collected specimens of three members of Pompilidae, which were identified as *Pepsis mexicana*, *Pepsis terminata* and *Anoplius nigritus* captured Campeche, Mexico. The method of extraction of the venom was optimized, after which such venoms were analyzed and compared. The patterns of one-dimension electrophoresis results in a greater amount of proteins for *Pepsis* genus, similarly the high resolution chromatographic profile, showed a higher content of compounds in the venom of *Pepsis* wasps. We present the results of the masses (m/z) for some of the fractions separated by chromatography, obtained in an ion trap system, from hymenopteros have not been reported previously, with the exception of one result of a putative bradykinin in *A. nigritus*. Five sequences were obtained by the Edman degradation method for the wasp's *P. mexicana* and *P. terminata*. Enzymatic characterization revealed that the venom of *P. mexicana* has activity in the metalloproteinase assays as well as the hydrolysis of hyaluronic acid, this preliminary characterization subscribe to knowledge of the biomolecules present in the parasitoid venoms for biotechnological applications.

**Key words: Pompilidae, metalloproteinases, venom extraction.**

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar la maestría en Bioprospección y Sustentabilidad Agrícola en el Trópico y a los millones de mexicanos que pagan impuestos, lo que permite que existan estos programas

Al Dr. Joel Lara Reyna por aceptarme como su estudiante y fauna asociada, por sus enseñanzas y la motivación siempre presente a lo largo de este periodo y hacerme fuerte ante las adversidades

A la Dra. Karina Verdel Aranda por guiarme durante este proceso, por su dedicación y su paciencia

Un especial agradecimiento al Dr. Lourival Domingos Possani Postay por haber aceptado ser parte de mi consejo particular y recibirme en su laboratorio (IBT UNAM)

A la Dra. Juana María Jiménez Vargas por su invaluable apoyo durante mis estancias en el laboratorio del doctor Possani

Al Dr. Fernando Zamudio por su apoyo el cual fue una muy importante aportación a mi trabajo

A la Dra. Aída Martínez por sus acertadas observaciones

A la Dra. Itzel López Rosas por darse el tiempo de revisar mi escrito y por sus sugerencias hacia mi trabajo y sus consejos antes del examen.

A mi mamá Clara Uribe y a mis hermanos por su paciencia y por tolerar mi ausencia

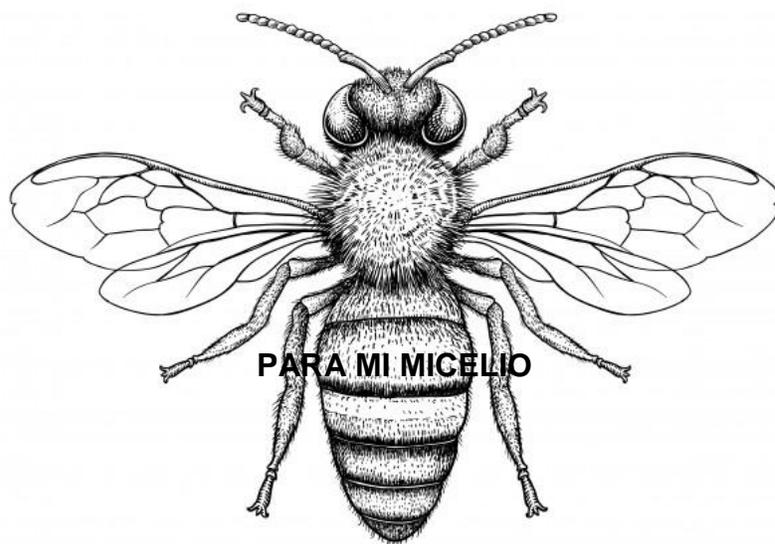
A Gisela Espinosa y Aderak Godínez por su presencia y apoyo incondicional

A mis amigos y compañeros de Maestría Lupita, Luis, Zuri, Eli, Karina, Paty, Juan, Adri, Jorge, Joaquín, por su apoyo y compañía

A mi micelio, amigo y compañero de vida **Pablo Godínez**, por su apoyo y paciencia en el transcurso de esta etapa de mi vida además de su contribución a mi trabajo apoyándome con sus conocimientos en taxonomía lo cual fue una aportación muy importante y vital para el trabajo

**DEDICATORIA**

**ME  
MYSELF  
&  
I**



## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>vi</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>xi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1. Control biológico y control natural.....	3
2.2. Parasitoides.....	4
2.2.1 Biología de parasitoides.....	4
2.2.2. Ciclo de vida .....	6
2.2.3. Modo de localización del huésped.....	6
2.2.4. Importancia de los parasitoides.....	8
2.3. El orden Hymenoptera.....	9
2.3.1. Familia Pompilidae.....	10
2.3.2. Género <i>Pepsis</i> Fabricius (1804).....	11
2.4. Composición molecular y modo de acción del veneno de Himenópteros....	11
<b>3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....	<b>19</b>
3.1. Objetivo general.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
3.3. Hipótesis.....	19
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
4.1. Origen de material biológico.....	20
4.2. Colecta, traslado y manejo de especímenes en el laboratorio.....	21
4.3. Identificación taxonómica de las avispas.....	22
4.4. Establecimiento de un método de extracción de veneno.....	26
4.5. Caracterización de componentes presentes en el veneno.....	28

4.5.1. Obtención de los perfiles proteicos presentes en el veneno de las avispa mediante electroforesis en gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).....	29
4.5.1.1. Cuantificación de proteínas totales contenidas en el veneno por el método de Bradford, 1976.....	30
4.5.2. Fraccionamiento del veneno por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC).....	30
4.5.3. Análisis molecular por espectrometría de masas.....	32
4.5.4. Preparación de muestras para secuenciación de aminoácidos por el método de degradación de Edman.....	32
4.5.4.1. Electroforesis.....	32
4.5.4.2. Transferencia electroforética semi-seca de las proteínas del gel a la membrana.....	33
4.5.6. Ensayos de actividades enzimáticas y antimicrobianas.....	34
4.5.6.1. Zimograma en gelatina para la detección de metaloproteinasas.....	34
4.5.6.2. Detección de actividad fosfolipasa A2.....	35
4.5.6.3. Detección de actividad hialuronidasa con el método turbidimétrico (Wortington. 1993).....	36
4.5.6.4. Actividad antimicrobiana.....	36
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
5.1. Captura de ejemplares de la familia Pompilidae .....	38
5.2. Mantenimiento de avispa en cautiverio .....	39
5.3. Identificación taxonómica.....	40
5.4. Extracción y recuperación del veneno .....	42
5.4.1. Inmovilización de avispa para la obtención de veneno.....	42
5.4.2. Métodos de extracción de veneno.....	42
5.5. Caracterización del veneno .....	43
5.5.1. SDS-PAGE del veneno de las avispa de la familia Pompilidae en las pruebas de extracción de veneno .....	43
5.5.2. Perfiles cromatográficos.....	46
5.5.3. Masas obtenidas.....	51

5.5.4. Secuenciación por degradación de Edman.....	51
5.5.5. Ensayos de actividades enzimáticas.....	53
5.5.5.1. Actividad Proteolítica.....	53
5.5.5.2. Actividad Fosfolipasa A2.....	54
5.5.5.3. Hidrólisis de ácido hialurónico.....	55
5.5.5.4. Actividad antimicrobiana.....	56
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>58</b>
6.1. <i>Pepsis mexicana</i> en el Sureste mexicano.....	58
6.2. Captura de avispas.....	59
6.3. Identificación de avispas.....	60
6.4. Métodos de extracción de veneno.....	60
6.5. Caracterización del veneno.....	61
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>65</b>
<b>8. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>66</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>77</b>

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Componentes identificados en el veneno de avispas sociales y parasitoides.....	12
Cuadro 2. Orden en el cual se cargaron las muestras en el gel de poliacrilamida para su posterior transferencia a una membrana de PVDF mediante una cámara semi-seca. Los números del 1 al 10 representan los pozos de gel, el 1, 5, 9 y 10 (-) quedaron vacíos.....	33
Cuadro 1. Preparación de curva de calibración de ácido hialurónico. Se realizó por triplicado.....	36
Cuadro 4. Ejemplares colectados de la familia Pompilidae.....	38
Cuadro 5. Masas obtenidas de los venenos de <i>A. nigrinus</i> , <i>P. terminata</i> y <i>P. mexicana</i> .....	52
Cuadro 6. Secuencias obtenidas por medio de la técnica de degradación de Edman de las tres especies de avispas.....	53
Cuadro 7. Absorbancias registradas (por triplicado) en la curva de ácido hialurónico para medición de actividad.....	56
Cuadro 8. Registro de lecturas a 605 nm de las muestra de veneno de <i>P. mexicana</i> puesta a prueba contra la cepa ATCC-2932 de <i>S. aureus</i> .....	57

## LISTA DE FIGURAS

<p>Figura 1. Comportamiento parasítico entre especies de parasitoides relacionadas con pulgones (las flechas indican la dirección del parasitoidismo): (A) áfido hospedero atacado por dos especies de parasitoides primarios (B) Braconidae, Aphidiinae y (C) Aphelinidae. Ambas especies puede ser parasitadas por hiperparasitoides (D) Cynipidae, Alloxystinae y estas a su vez por los parasitoides Megaspilidae (E) y Encyrtidae (F) Imagen tomada de (Hrček y Godfray, 2015).....</p>	5
<p>Figura 2. Ciclo de vida general de un parasitoide que ataca a su hospedero en estado de larva. (A) Adulto de vida libre que se alimenta de néctar, (B) hembra al momento de encontrar a su hospedero y poner huevos, (C) larvas eclosionadas, (D) pupas (cocones) sobre el hospedero, (E) adulto emergiendo de la pupa.....</p>	7
<p>Figura 3. Zonas de búsqueda y colecta de avispas parasitoides del genero <i>Pepsis</i>. Las flechas indican los lugares donde se recuperaron los ejemplares (de arriba hacia abajo): Ciudad de Campeche (19°50'25.35"N, 90°29'8.64"O); Comunidad de Sihochac, Municipio de Champotón (19°29'51.93"N, 90°33'1.07"O); Zona arqueológica de Balamkú (18°33'16.51"N, 89°56'35.72"O), Zona amortiguamiento Reserva Biosfera Calakmul (18°27'49.36"N, 89°53'28.04"O).....</p>	21
<p>Figura 4. Mantenimiento de avispas en laboratorio. Hembras adultas permanecieron vivas en confinación hasta 90 días, lo que permitió la recuperación de veneno de las mismas avispas repetidas veces.....</p>	22
<p>Figura 5. Características que permiten distinguir el sexo de las avispas de la familia Pompilidae. (A) Conteo de los segmentos antenales, (B) número de segmentos en el metasoma.....</p>	24
<p>Figura 6. Características determinantes para subfamilias de acuerdo a Goulet y Huber, 1993. (A) Vena radial del ala, (B) espinas sobre tibias, (C) espinas al final de la tibia, (D) espinas tarsales.....</p>	25

Figura 7. Sujeción y prótesis utilizada para inmovilizar a la avispa para colectar el veneno con seguridad. El veneno se colectó por absorción utilizando papel filtro estéril (obsérvese como el veneno es absorbido por el papel filtro).....	27
Figura 8. Colecta del veneno succionando con una micropipeta. La gota de veneno sale del aguijón cuando la avispa aún se encuentra dormida por el efecto de enfriamiento, sin embargo, el uso de la prótesis en el abdomen es necesaria para dirigirlo y para limitar el movimiento si la avispa reaccionara antes de terminar con la extracción.....	29
Figura 9. (A) Árbol de caoba en el que se refugiaban los machos de <i>Pepsis</i> . (B) Flores de marañón y (C), huaxin de las que libaban las avispas de la familia Pompilidae .....	38
Figura 10. Separación individual de avispas de la familia Pompilidae después del sexado. Solo las hembras fueron utilizadas y los machos se liberaron.....	39
Figura 11. Especies de avispas parasitoides de arañas identificadas en este trabajo. El tamaño promedio de <i>P. mexicana</i> fue de 4.6 cm (largo del cuerpo).....	41
Figura 12. Separación electroforética de los venenos de la familia Pompilidae por SDS PAGE al 12 %. Los carriles 1 al 6, ejemplares de la tribu Pompilini, carril 7 ejemplar del género <i>Pepsis</i> .....	43
Figura 13. Separación electroforética de los venenos de la familia Pompilidae por SDS PAGE al 12 %. Los carriles 1, 2, 3, 6 y 7 contienen; el veneno de dos avispas de la tribu Pompilini utilizando el método de extracción con micropipeta. Los carriles 4 y 5, veneno de ejemplar del género <i>Pepsis</i> utilizando el método de recolección con papel filtro.....	44
Figura 14. Separación electroforética de un veneno de un ejemplar de la tribu Pompilinae por SDS PAGE al 12 %. Los carriles 1-4 son extracciones el mismo día a diferentes horas, solo en el carril 2 se puede ver presencia de bandas de proteínas. En los carriles 5 y 6 se observa el mismo patrón de bandas.....	45

Figura 15. Separación electroforética de los venenos de la familia Pompilidae por SDS PAGE al 12 %. Los carriles 1 y 2, <i>P. mexicana</i> ; 3, 4 y 5, <i>P. terminata</i> ; 6, <i>A. nigritus</i> .....	45
Figura 16. Separación electroforética de los venenos de la familia Pompilidae por SDS PAGE al 16%. Presencia de nuevas bandas en las muestras de veneno de <i>P. mexicana</i> (carril 2) y <i>P. terminata</i> (carril 1) con peso molecular de aproximadamente 250 KDa. Carriles 3 y 4 ejemplares de la tribu Pepsini.....	46
Figura 17. Cromatograma de la purificación del veneno de la avispa <i>A. nigritus</i> por HPLC. *TR correspondiente a la masa relacionada con Bradiquinina G1.....	47
Figura 18. Cromatograma de la purificación del veneno de <i>P. terminata</i> por HPLC. *TR secuenciada por degradación de Edman.....	48
Figura 19. Cromatograma de la primera purificación del veneno de <i>P. mexicana</i> por HPLC. *TR de fracción secuenciada con método de degradación de Edman.....	49
Figura 20. Cromatograma de la purificación del veneno de <i>P. mexicana</i> por HPLC previamente filtrado, muestra pérdida de fracciones y disminución de concentración de picos que se conservaron en comparación con la Figura 19.....	50
Figura 21. Zimograma de gelatina en gel al 12%. Carril 1: veneno de <i>P. mexicana</i> ; carril 2: veneno de <i>B. asper</i> .....	54
Figura 22. Ensayo para la detección de actividad de fosfolipasa en veneno de <i>P. mexicana</i> utilizando cuanto diferentes cantidades de veneno expresadas en µg de proteína (5, 10, 20 y 40). No se muestra actividad de fosfolipasas A2 en pozos con veneno de <i>P. mexicana</i> en ninguna de las concentraciones probadas, mientras que el control positivo si muestra actividad (veneno de <i>B. asper</i> ).....	55
Figura 23. Gráfica de la curva de calibración de ácido hialurónico. Se muestra la ecuación de la recta usada para calcular el porcentaje ácido hialurónico hidrolizado por el veneno de <i>P. mexicana</i> .....	56

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde hace varios años la industria biotecnológica ha puesto su interés hacia las toxinas para estudiar y aprovechar su actividad en la aplicación de nuevos tratamientos y medicamentos, así como la búsqueda de nuevas moléculas en sistemas no antes explorados como microorganismos, plantas o animales vertebrados e invertebrados. Sin embargo, las moléculas complejas obtenidas de estas fuentes generalmente deben ser separadas y purificadas del resto de componentes que acompañan al principio o principios activos. Más aún, la industria farmacéutica ha optado por el camino de la ingeniería genética o metodología del ADN recombinante para la producción comercial. No obstante, la búsqueda de moléculas con potencial de aplicación biotecnológica sigue teniendo fuentes casi infinitas en la naturaleza.

Los venenos producidos por algunos organismos son capaces de paralizar al instante e incluso causar la muerte. Se trata de sustancias que regularmente son utilizadas como mecanismo de defensa o ataque de algunas especies. Los venenos de diversos organismos han sido estudiados en distintos miembros de la escala zoológica, por citar solo algunos ejemplos clásicos están los estudios de la apitóxina en abejas, y otras toxinas en venenos de serpientes, arañas, alacranes, esponjas, medusas, entre otros, lo cual ha servido para descubrir tanto antagonistas, como tratamientos contra diversas enfermedades y para control biológico (Guerrero-Vargas *et al.*, 2008).

El veneno de avispas (Hymenoptera) es una fuente de diversos compuestos bioactivos, de los cuales tan sólo el uno por ciento de sus moléculas se ha caracterizado e identificado. Los venenos pueden causar en las diversas presas u hospederos alteraciones fisiológicas que van desde parálisis hasta la muerte del individuo dependiendo de las estrategias de vida del organismo que lo produce (Asgari y Rivers, 2011). Los venenos de los himenópteros caracterizados son mezclas complejas de diferentes compuestos, como aminas, péptidos, carbohidratos, proteínas y ésteres de colina (Ayerbe *et al.*, 2003), también se reporta que las secreciones de las avispas parasitoides pueden incluir, además de diferentes moléculas, partículas

virales como virus del grupo de polidnavirus, partículas, fluidos ováricos y teratocitos (células liberadoras de hormonas en los huevos de las avispas), entre otros (Asgari, 2006; Asgari y Rivers, 2011).

Las avispas de la familia Pompilidae, son ectoparasitoides especializadas en capturar arañas paralizándolas, dicha parálisis suele ser a corto o largo plazo para inmovilizar a los hospederos, bloquear su desarrollo después del parasitismo y también regular su inmunidad y metabolismo (Heraty, 2009; Martinson *et al.*, 2014; Mrinalini *et al.*, 2015).

Las avispas del género *Pepsis* (Tribu Pepsini) son las avispas parasitoides de mayor talla en la naturaleza, oscilando su tamaño entre 11 y 65 mm. Sus hospederos son arañas de la familia de las tarántulas (Theraphosidae) a quienes parasita depositando su huevecillo, después de inmovilizarla por la inyección del veneno, provocándole una parálisis a corto o largo plazo la cual beneficiara el desarrollo de la descendencia de la avispa (Copperi *et al.*, 2011). La picadura de la avispa *Pepsis* es la segunda picadura de insecto más dolorosa después de la hormiga bala (*Paraponera clavata*) (Schmidt, 2004), dicho efecto es provocado por componentes desconocidos presentes en el veneno.

En este trabajo se propuso realizar un primer acercamiento a la composición molecular del veneno de la avispa *Pepsis mexicana*, de la cual no existen trabajos previos. Nuestro objetivo se centra en conocer los componentes contenidos en el veneno paralizante de esta avispa y sus posibles aplicaciones biotecnológicas.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Control biológico y control natural

El control biológico se define como el manejo de enemigos naturales para regular las poblaciones de especies y mantenerlas por debajo de la densidad que pueda causar un daño económico (Fischbein, 2012). El control natural ocurre de manera espontánea y sin intervención alguna del ser humano (Johnson, 2000). Prácticamente todos los grupos de organismos cuentan con algún tipo de controlador poblacional (Rodríguez *et al.*, 2010). Los tipos de controladores ya sea presentes en el control natural, o multiplicados con fines de control biológico, se dividen en depredadores, parasitoides y patógenos.

Las especies depredadoras representan apenas un tercio de los agentes de control biológico. Los patógenos tienen una gran especificidad, sin embargo, también existen organismos que son muy generalistas los cuales pueden afectar a otras especies que no necesariamente representan un problema económico. Los parasitoides son muy exitosos como agentes de control natural, ya que existe una gran diversidad y son altamente específicos en cuanto al grupo taxonómico al que atacan. La mayoría de ellos se encuentran en los órdenes Díptera e Hymenoptera, siendo este último quien cuenta con más especies controladoras (Badii y Abreu, 2006; Nicholls-Estrada, 2008).

Los himenópteros más importantes en el rol de control biológico, son los que se encuentran en las familias Braconidae e Ichneumonidae, pertenecientes a la Superfamilia Ichneumonoidea y Eulophidae, Pteromalidae, Encyrtidae y Aphelinidae de la Superfamilia Chalcidoidea, además son de gran importancia en el control natural de insectos (Nicholls-Estrada, 2008).

## 2.2. Parasitoides

El término “Parasitoide” fue acuñado por el zoólogo Sueco Odo Reuter en 1913 refiriéndose a un grupo de insectos que crecen en los tejidos de otros a quienes finalmente les provocan la muerte, pues el hospedero es utilizado como fuente de alimentación (Figura 1).

Los insectos parasitoides, se desarrollan a costa de un organismo denominado “hospedero”, el cual es por lo regular perteneciente al mismo grupo taxonómico, con algunas excepciones (otros artrópodos) (Kalyanasundaram y Kamala, 2016). Esto quiere decir, que solo el estadio larvario es propiamente quien aprovecha los recursos de su hospedero, ya que en su forma adulta son de vida libre y pueden alimentarse de néctar, polen, miel, agua o ser predadores (Badii y Abreu, 2006; Kalyanasundaram y Kamala, 2016).

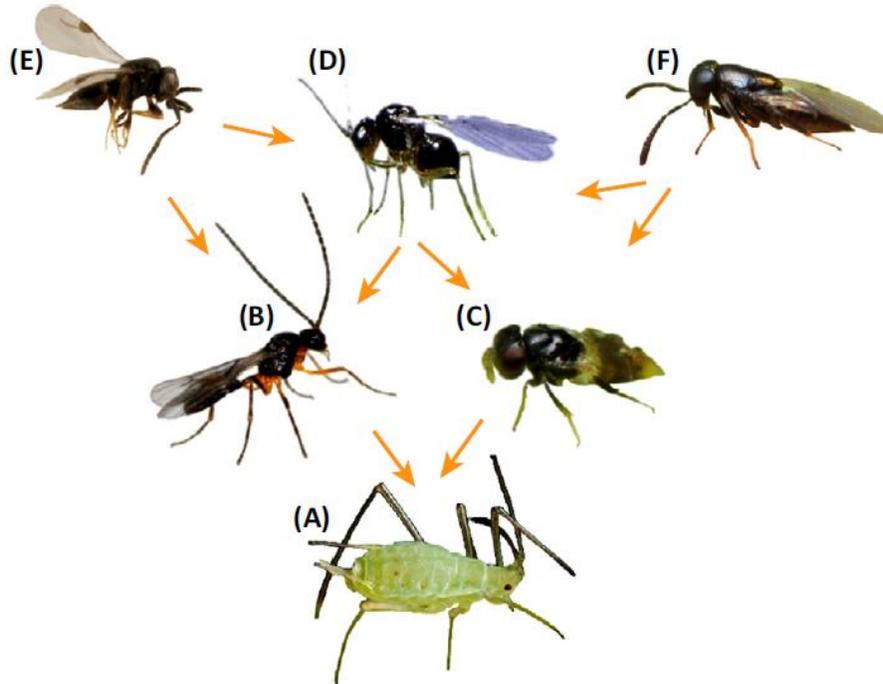
La diferencia entre los parasitoides y los parásitos es que los parásitos viven dentro o sobre su hospedero causando daño constante sin matarlo. Los depredadores se diferencian de los parasitoides en que éstos necesitan presas constantemente para sobrevivir, mientras que los parasitoides solamente requieren una sola presa en su vida (Waage y Hassell, 1982).

### 2.2.1. Biología de parasitoides

Existen diversas formas de clasificar a los insectos parasitoides de acuerdo al tipo de parasitismo, desarrollo en el hospedero, su modo de vida y otros como a continuación se menciona.

Los parasitoides *primarios* son aquellos que parasitan a su hospedero quien cumple con un nicho diferente, los parasitoides *secundarios* son aquellos que parasitan a otro parasitoide (hiperparasitoides) y los parasitoides *terciarios* son aquellos que parasitan a los secundarios (Figura 1). De acuerdo a la etapa de vida del hospedero, pueden ser

parasitoides de huevos, larvas, pupas, ninfas o adultos. En algunos casos puede ocurrir que un parasitoide termine su desarrollo en la siguiente etapa de desarrollo de su hospedero, y este parasitoide puede ser llamado *ovo-larvario* o *larvo-pupal* según sea el caso (Bernal, 2007).



**Figura 1.** Comportamiento parasítico entre especies de parasitoides relacionadas con pulgones (las flechas indican la dirección del parasitoidismo): (A) áfido hospedero atacado por dos especies de parasitoides primarios (B) Braconidae, Aphidiinae y (C) Aphelinidae. Ambas especies puede ser parasitadas por hiperparasitoides (D) Cynipidae, Alloxystinae y estas a su vez por los parasitoides Megaspilidae (E) y Encyrtidae (F). Imagen tomada de Hrček y Godfray, 2015.

Por el sitio donde el parasitoide se aloja en el hospedero se pueden clasificar en *endoparasitoide*, si la larva se alimenta del interior, o *ectoparasitoide* si lo hace desde afuera. Por el número de la progenie se clasifica como *solitarios*, si el adulto pone un solo huevo en su hospedero, o como *gregario* si este pone dos o más huevos (Kalyanasundaram y Kamala, 2016). Por la estrategia de desarrollo pueden ser *idiobiontes*, si el hospedero detiene su desarrollo al ser parasitado; o *koinobiontes* si el hospedero continúa con su desarrollo (Bernal, 2007; Ríos-Casanova, 2011).

Otra clasificación utiliza la denominación *sinovigénicos* cuando el adulto emerge con pocos o nada de huevos ya producidos y pueden producirlos durante su vida. Por el contrario, los *proovigénicos*, emergen como adultos teniendo un complejo completo de huevos maduros y no vuelven a producir más el resto de su vida (Bernal, 2007). Esta clasificación, es menos mencionada por los autores a diferencia de las anteriores. Algunos parasitoides pueden ser poliembrionarios, lo que se refiere a que un huevo puede dar origen a muchos embriones (Kalyanasundaram y Kamala, 2016), o bien, un adulto puede tener una sola generación de progenie (univoltinos) o puede tener dos o más de ellas (multivoltinos) (Kalyanasundaram y Kamala, 2016; Ríos-Casanova, 2011).

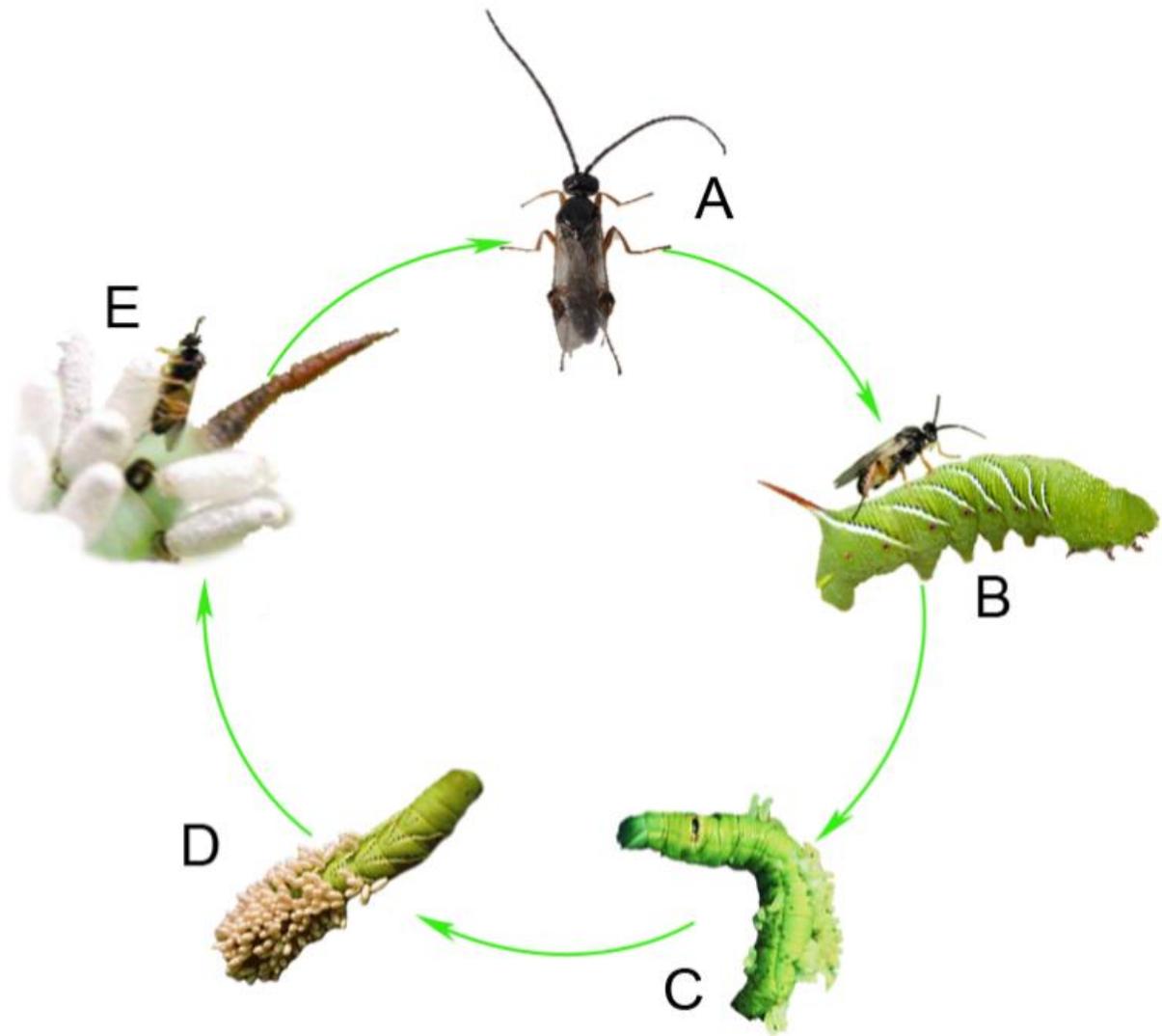
### **2.2.2. Ciclo de vida**

El ciclo de vida de un parasitoide inicia cuando una hembra fecundada o no fecundada, comienza la búsqueda activa de su hospedero (Figura 2). Esta acción se ve beneficiada por sustancias volátiles despedidas por la planta de la que se alimenta el hospedero o propiamente del mismo hospedero. Una vez localizado el hospedero, la hembra parasitoide procede a ovopositar, en algunos casos la hembra puede inyectar un veneno paralizante a su hospedero. Al eclosionar, la larva se alimenta y desarrolla dentro del hospedero hasta pasar al estadio de pupa, finalmente el insecto emerge como adulto desde el hospedero que inevitablemente muere al terminar el ciclo (Bernal, 2007; Carballo, 2002; Ríos-Casanova, 2011).

### **2.2.3. Modo de localización del hospedero**

Los parasitoides utilizan una serie de estrategias para poder localizar y reconocer al hospedero adecuado para realizar con éxito el proceso de reproducción. De acuerdo con la literatura durante el proceso de búsqueda y localización lo pueden lograr a través de la detección de sustancias volátiles emitidas por la planta hospedera (Bernal, 2007). Después de encontrar el hábitat, durante la localización del hospedero intervienen las señales físicas y químicas por el movimiento al alimentarse, o los

volátiles del mismo. Iacovone *et al.*, 2016, menciona que en el caso de *Trissolcus brochymenae* (Hymenoptera: Platygasteridae) se guía por los compuesto hidrosolubles y metanólicos del hospedero.



**Figura 2.** Ciclo de vida general de un parasitoide que ataca a su hospedero en estado de larva. (A) Adulto de vida libre que se alimenta de néctar, (B) hembra al momento de encontrar a su hospedero y poner huevos, (C) larvas eclosionadas, (D) pupas (cocones) sobre el hospedero, (E) adulto emergiendo de la pupa.

El siguiente paso es la aceptación, en el cual la hembra evalúa al hospedero en cuanto a tamaño, si está enfermo o ya parasitado, o si es muy joven o muy viejo y decide si es adecuado o no para la ovoposición.

Finalmente viene la interacción, este es el momento en el cual la hembra utiliza diversas formas de contrarrestar la resistencia del hospedero a ser parasitado, lo que podría causar la melanización o encapsulación de los huevos parasitoides. El sistema inmune del hospedero es alterado mediante toxinas, hormonas u otros metabolitos. Algunas hembras parasitoides pueden causar parálisis para que la larva aproveche al máximo a su presa (Bernal, 2007; Ríos-Casanova, 2011).

#### **2.2.4. Importancia de los parasitoides**

Existen un gran número de especies que han sido utilizados exitosamente en el control de plagas. El grupo de los insectos parasitoides es muy abundante en la naturaleza y se han identificado hasta el momento alrededor de 68, 000 especies (Hajek, 2004). Aproximadamente el 84% de estos pertenecen al orden Hymenoptera, el 14% se encuentran en el Orden Díptera y el otro 2% se encuentra dividido entre los Ordenes Neuroptera, Coleoptera, Lepidóptera y Strepsiptera (Bernal, 2007; Kalyanasundaram y Kamala, 2016; Nicholls-Estrada, 2008). Estimando que entre el 20 y 25% de todos los insectos del planeta son parasitoides y si consideramos que en el planeta habitan alrededor de 8 millones de insectos, entre 1.6 y 2 millones de estos serían parasitoides (Fischbein, 2012).

Debido a la abundancia mencionada y por la mortalidad que pueden llegar a ocasionar sobre las poblaciones en campo, los parasitoides, poseen una gran importancia tanto en los ecosistemas naturales como en los de algunos cultivos. Por ello se han realizado diversos estudios y se han seleccionado una importante cantidad de especies para su utilización en programas de control biológico de plagas alrededor del mundo. De acuerdo a LaSalle y Gauld (1993), ha habido 150 casos de liberaciones de himenópteros parasitoides en el mundo para control biológico. Se estima que para los Estados Unidos el valor de la contribución del ahorro económico en depredadores y parasitoides es de \$ 4, 500 millones de dólares (Ruiz Cancino *et al.*, 2010). En México se utilizan por primera vez a los himenópteros parasitoides en 1949, debido al daño

económico provocado por la mosca prieta de los cítricos *Aleurocanthus woglumi* (Gutierrez-Ramírez *et al.*, 2013).

### **2.3. El orden Hymenoptera.**

El orden Hymenoptera (*hymen*: membrana y *ptera*: alas) se caracteriza por la presencia de dos pares de alas membranosas y tégulas en su base, mandíbulas bien desarrolladas con un aparato bucal modificado para morder, succionar o lamer. El suborden Symphita comprende a los himenópteros conocidos como “basales” llamados moscas sierra, quienes son organismos fitófagos con un origen ancestral que data en el periodo triásico hace unos de 200 millones de años (Mason y Huber, 1993). Se caracterizan por el abdomen unido al tórax con poca o nada de constricción, y la presencia de numerosas venas en las alas (Fernández, 2006). En el suborden Apócrita, también conocido como himenópteros superiores, se encuentran las avispas, abejas y hormigas. Se caracteriza por la unión del último segmento del tórax con el primer segmento abdominal a lo que se le conoce como propodeo y el ovopositor se diferencia entre las infraórdenes como una modificación como agujijón para picar en los Aculeata y el ovopositor que conserva la función primitiva de puesta de huevos en los Parasítica (Mitroiu *et al.*, 2015).

Los himenópteros están considerados entre los órdenes más diversos en el mundo, ocupando el tercer lugar después de coleóptera y lepidóptera. Se componen por 89 familias, 7, 300 géneros y más de 115, 000 especies (Nieves-Aldrey y Sharkey, 2012). En México contamos con 1, 440 géneros y 5, 974 especies (Ruiz Cancino *et al.*, 2010).

La importancia de este grupo de organismos va desde la polinización y el control biológico contra diversos artrópodos plagas de diferentes cultivos, hasta el aprovechamiento de sus productos como miel, el propóleo y la cera. La mayor parte de los himenópteros son parasitoides, por lo que junto con los dípteros, son los grupos más utilizados en el control biológico de plagas agrícolas (Gaona García *et al.*, 2006).

### 2.3.1. Familia Pompilidae

La familia Pompilidae es un grupo de himenópteros Apócrita pertenecientes al grupo Aculeata, está comprendida por un aproximado de 5, 000 especies y 230 géneros en el mundo, de los cuales, en México, se tiene un registro de 174 especies de 35 géneros y pueden ser encontradas principalmente en regiones tropicales (Copperi *et al.*, 2011).

La familia Pompilidae se caracteriza por avispas solitarias con un tamaño moderadamente grande (11 a 65 mm) de aspecto robusto, con patas alargadas con espinas tibiales, lo cual es un rasgo distintivo de este grupo de insectos (Corro y Cambra, 2011). Poseen un aguijón corto y lacerante empleado para paralizar a sus presas (De la Fuente, 2000), acostumbran a realizar vuelos cortos y a ras del suelo buscando a sus presas, así como caminatas sobre el suelo, con movimientos nerviosos de antenas y alas (Copperi *et al.*, 2011).

Las hembras de Pompilidae, tienen un comportamiento especializado en capturar arañas y arrastrarlas a su nido para después depositar un único huevo cuya larva al eclosionar, se alimentará y desarrollará en su hospedero hasta emerger de él en su estado adulto (De la Fuente, 2000). Esto resulta ser un mecanismo de gran éxito para asegurar su progenie (Asgari y Rivers, 2011), lo que logran gracias a que inyectan en su presa un veneno con la capacidad de paralizarla permitiendo que pueda continuar con vida y así, servir de alimento para la larva que crecerá en su interior (De la Fuente, 2000).

Se reconocen cinco subfamilias pertenecientes a esta familia (Pepsinae, Pompilinae, Ctenocerinae, Notocyphinae y Ceropalinae) (Waichert *et al.*, 2015). Se ha sugerido que el veneno de estas avispas, como el de otras avispas parasitoides tiene un contenido de sustancias neurotóxicas y bioactivas diferentes a las de las avispas sociales, quienes pueden llegar a matar a sus presas con su veneno (Piek, 1986).

### **2.3.2. Género *Pepsis* Fabricius (1804)**

Existen 133 especies conocidas, las avispas pertenecientes a este género, se encuentran en todo el mundo exceptuando los polos, lo que las convierte en importantes indicadores de biodiversidad. Estas avispas buscan exclusivamente arañas de la familia Theraphosidae para depositar sus huevos (Vardy, 2000).

La coloración del cuerpo es generalmente negra, presentando pubescencias en forma de escamas que les pueden dar destellos de diversos colores como azul, violeta, plateado, dorado o verde. Las antenas de los machos son más gruesas que las de las hembras y estos también son de cuerpo más pequeño que el de las hembras de sus respectivas especies (Evans, 1966; Vardy, 2000).

Estas avispas poseen un veneno con compuestos algogénicos, que a diferencia con los venenos de avispas sociales y abejas, contienen niveles bajos de histaminas y niveles relativamente altos de dopamina, norepinefrina, epinefrina y acetilcolina, (Nakajima, 1986). El veneno de *Pepsis* también contiene compuestos homólogos a Mastoparan y Ponericina G2 (Nolasco *et al.*, 2018).

Schmidt, 2004, reportó que la picadura de la avispa *Pepsis*, obtuvo un nivel 4 en el índice de dolor de picaduras de insectos y solo fue superada por la hormiga bala *P. clavata*, sin embargo el dolor desaparece a los pocos minutos.

### **2.4. Composición molecular y modo de acción del veneno de Himenópteros**

El veneno es definido como una sustancia capaz de causar alteraciones metabólicas, funcionales o químicas en un individuo (Vargas y Rojas, 2014). Son mezclas complejas de proteínas y otros compuestos no proteicos que sirven para la defensa hacia depredadores, la competencia o la inmovilización de la presa según sea el estilo de vida del organismo que lo produce (Fry *et al.*, 2009; Morgenstern y King 2013). En general, los venenos pueden contener sustancias como serotoninas, histamina,

fitotoxinas, bradiquininas entre otros compuestos y pueden provenir de origen animal, vegetal, mineral o artificial, además se pueden encontrar en distintos estados de la materia (Vargas y Rojas, 2014).

A pesar de las miles de especies de parasitoides conocidas, solo hay un número muy limitado de componentes de veneno identificados a partir de un pequeño número de ellas. La función principal del veneno en la mayoría de los ectoparasitoides es la inducción de parálisis de corto a largo plazo, en particular cuando el hospedero se encuentra en la etapa activa (larva o ninfa). Sin embargo, el veneno puede desempeñar otras funciones como suprimir la inmunidad del hospedero o interrumpir el desarrollo (Moreau y Asgari, 2015).

El parasitoide *Ampulex compressa* inyecta un cóctel de neurotoxinas en el sistema nervioso central de su presa *Periplaneta americana*. Esto involucra una primera picadura en el tórax, la cual conduce a una parálisis transitoria de las patas delanteras debido al bloqueo postsináptico de la transmisión sináptica colinérgica central, y una segunda para la inyección de veneno dentro del ganglio subesofágico, que induce una preparación intensa de 30 minutos en la presa seguida de un efecto letárgico de larga duración. El veneno de *A. compressa* contiene ácido gamma amino-butírico (GABA) (neurotransmisor inhibitorio),  $\beta$ -alanina (agonista del receptor de GABA) y taurina (afecta la actualización de GABA de la hendidura sináptica) (Libersat, 2003; Moreau y Asgari, 2015) (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Componentes identificados en el veneno de avispas sociales y parasitoides.

<b>Avispa</b>	<b>Estilo de vida</b>	<b>Molécula caracterizada</b>	<b>Función</b>	<b>Referencia</b>
<i>Chelonus near curvimaculatus</i>	Solitaria	Quitinasa	Hidrólisis de quitina	(Asgari y Rivers, 2011)
<i>Eulophus pennicornis</i>	Solitaria	Reprolisina-like (EpMP1–3, EpMP3)	Degrada componentes de la matriz extracelular	(Price <i>et al.</i> , 2009)

Continuación cuadro 1

<b><i>Agelaia pallipes</i></b>	Social	Mastoparan	Inflamación alérgica (degranulación de mastocitos)	(Baptista-Saidemberg <i>et al.</i> , 2012)
		Péptido quimiotáctico	Actividad inflamatoria, actividad antimicrobiana	(Baptista-Saidemberg <i>et al.</i> , 2012)
<b><i>Agelaia vicina</i></b>	Social	Av Tx-7	Parálisis, bloqueo canales de potasio	(Pizzo <i>et al.</i> , 2004)
		Av Tx- 8	Parálisis, Bloqueo canal de potasio	(De Oliveira <i>et al.</i> , 2005)
<b><i>Anterhynchium flavomarginatum</i></b>	Solitaria	Mastoparan-like	Antimicrobiana, degranulación de mastocitos	(Konno <i>et al.</i> , 2000)
<b><i>Colpa interrupta</i></b>	Solitaria	Bradiquinina-like	*Nd	(Piek <i>et al.</i> , 1990)
<b><i>Icaria sp.</i></b>	Social	HR-II	*Nd	(Nakajima, 1986)
<b><i>Megascolia flavifrons</i></b>	Solitaria	Megascoliaquinina	*Nd	(Konno <i>et al.</i> , 1998)
<b><i>Polistes rothneyi</i></b>	Social	Quininas	Producción de dolor	(Piek, 2000)
<b><i>Protonectarina sylveirae</i></b>	Social	Mastoparan	Inflamación alérgica (degranulación de mastocitos)	(Dohtsu <i>et al.</i> , 1993)
<b><i>Rhynchium brunneum</i></b>	Solitaria	Péptido quimiotáctico	Actividad inflamatoria, actividad antimicrobiana	(Baek <i>et al.</i> , 2013)
		Arginina quinasa	Parálisis	(Baek <i>et al.</i> , 2013)
		Hialuronidasa	Hidrólisis de ácido hialurónico, diseminación del veneno	(Baek <i>et al.</i> , 2013)
		Fosfolipasa A2	Hidrólisis de lecitinas	(Baek <i>et al.</i> , 2013)
		Metaloendopeptidasa	Inhibición de la agregación plaquetaria	(Baek <i>et al.</i> , 2013)
		Troponina	Contracción muscular	(Baek <i>et al.</i> , 2013)
		Proteínas de choque térmico	Prevención de plegamiento incorrecto de proteínas	(Baek <i>et al.</i> , 2013)

Continuación cuadro 1

<b><i>Vespa analis</i></b>	Social	Quininas de avispa	Producción de dolor	(Yoon <i>et al.</i> , 2015)
		Arginina Quinasa	Parálisis	Yoon <i>et al.</i> , 2015)
		Quitinasa	Hidrólisis de quitina	Yoon <i>et al.</i> , 2015)
		y-glutamil transpeptidasa	Apoptosis de células ovariola	Yoon <i>et al.</i> , 2015)
<b><i>Vespa crabro</i></b>	Social	Arginina Quinasa	Parálisis	Yoon <i>et al.</i> , 2015)
		Fosfolipasa A2	Hidrólisis de lecitinas	Yoon <i>et al.</i> , 2015)
<b><i>Vespa velutina</i></b>	Social	Mastoparan	Inflamación alérgica (degranulación de mastocitos)	(Lin <i>et al.</i> , 2011)
<b><i>Anoplius samariensis</i></b>	Solitaria	Anoplina	Antimicrobiano, degranulación de mastocitos	(Piek <i>et al.</i> , 1990)
		A-pompilidotoxina	Neurotransmisor, parálisis, bloqueo canales de sodio	(Konno <i>et al.</i> , 1998)
		Actividad similar a histamina	*Nd	(Piek <i>et al.</i> , 1990)
		As-rf-19	Neurotransmisor, vasoactivo	(Hisada <i>et al.</i> , 2005)
<b><i>Batozonellus lacerticia</i></b>	Solitaria	Actividad similar a histamina	*Nd	(Piek <i>et al.</i> , 1990)
<b><i>Batozonellus maculifrons</i></b>	Solitaria	B-pompilidotoxina	Neurotransmisor, parálisis, bloqueo canales de sodio	(Konno <i>et al.</i> , 1998)
		Histamina-like	*Nd	(Piek <i>et al.</i> , 1990)
<b><i>Cyphononyx dorsalis</i></b>	Solitaria	Proteína truncada tipo arginina quinasa	Parálisis	(Yamamoto <i>et al.</i> , 2007)
		Cd-125	Vasoactivo	(Konno <i>et al.</i> , 2001a)
		Cd-146	Vasoactivo	(Konno <i>et al.</i> , 2001a)
		Thr6- bradiquinina	Vasoactivo	(Konno <i>et al.</i> , 2001a)
		Elastasa-like	*Nd	(Yamamoto <i>et al.</i> , 2007)
		Fulvonina	Inhibidor de enzima convertidora de la angiotensina	(Picolo <i>et al.</i> , 2010)

Continuación cuadro 1

		Cifoquinina	Inhibidor de enzima convertidora de la angiotensina	(Picolo <i>et al.</i> , 2010)
<b><i>Cyphononyx fulvognathus</i></b>	Solitaria	Fulvolina, cifoquinina	Inhibidor de enzima convertidora de la angiotensina	(Picolo <i>et al.</i> , 2010)
<b><i>Episyron rufipes</i></b>	Solitaria	Acetilcolina	Neurotransmisor	(Piek <i>et al.</i> , 1990)
<b><i>Bracon hebetor</i></b>	Gregario	Calreticulina, arginina quinasa	Inhibidor de la propagación de los hemocitos	(Manzoor <i>et al.</i> , 2016)
		Brh-I y -II	Parálisis	(Moreau y Asgari, 2015)
<b><i>Microbracon hebetor</i></b>	Gregario	A-MTX	Parálisis	(Piek <i>et al.</i> , 1990)
		B-MTX	Parálisis	(Piek <i>et al.</i> , 1990)
<b><i>Philanthus triangulum</i></b>	Solitaria	Acetilcolina	Neurotransmisor	(Piek <i>et al.</i> , 1990)
		B-PTX	Parálisis	(Piek <i>et al.</i> , 1990)
		A-PTX	Parálisis	(Piek <i>et al.</i> , 1990)
<b><i>Campsomeriella annulata annulata</i></b>	Solitaria	Treonina-6 bradiquinina	Bloqueo de transmisión sináptica del receptor nicotínico de acetilcolina en el sistema nervioso central	(Konno <i>et al.</i> , 2001b)
<b><i>Cotesia rubecula</i></b>	Gregaria	Vn-50 (glicoproteína, homóloga serina proteasa)	Inhibe la melanización de la hemolinfa del hospedero	(Asgari <i>et al.</i> , 2003)
		Calreticulina	*Nd	(Asgari y Rivers, 2011)
<b><i>Ampulex compressa</i></b>	Solitaria	GABA, B-alanina, taurina	Parálisis	(Moreau y Asgari, 2015)
<b><i>Aphidius ervi</i></b>	Solitaria	$\gamma$ -glutamil transpeptidasa	Inducción de apoptosis	(Asgari y Rivers, 2011)
<b><i>Asobara tabida</i></b>	Solitaria	Aspartilglucosaminidasa-like	Lisosomal	(Asgari y Rivers, 2011)
<b><i>Eumenes pomiformis</i></b>	Solitaria	EpIBP	Proteína de unión a péptido similar a la insulina	(Baek <i>et al.</i> , 2016)

Continuación cuadro 1

		Mastoparan-like	Antimicrobiano degranulación de mastocitos	(Baek y Lee, 2010a)
		Hialuronidasa	Hidrólisis de ácido hialurónico, diseminación del veneno	(Baek y Lee, 2010a)
		Fosfolipasa A2	Hidrólisis de lecitinas	(Baek y Lee, 2010a)
		Serina proteasa, quimiotripsina, trombina- like	Actividad fibrinolítica, actividad liberadora de quinina, melanización	(Baek <i>et al.</i> , 2013)
		Troponina	Contracción muscular	(Baek y Lee, 2010b)
		Dendrotoxina-like	Parálisis, bloqueo canales de potasio	(Baek y Lee, 2010a)
		Tubulina	Regulación de la expresión de los genes esqueléticos de hemocitos	(Baek y Lee, 2010a)
		Arginina quinasa	Catalizar la amortiguación del ATP	(Baek y Lee, 2010b)
<b><i>Eumenes rubronotatus</i></b>	Solitaria	Eumenitina	Antimicrobiana, degranulación de mastocitos	(Konno <i>et al.</i> , 2006)
<b><i>Oreumenes decorates</i></b>	Solitaria	Mastoparan-like	Antimicrobiana, degranulación de mastocitos	(Konno <i>et al.</i> , 2007)
<b><i>Orancistrocerus drewseni</i></b>	Solitaria	Arginina quinasa	Parálisis	(Baek y Lee, 2010b)
		Serina proteasa, quimiotripsina, trombina- like	Actividad fibrinolítica, actividad liberadora de quinina, melanización	(Baek y Lee, 2010b)
		Tropomiosina	Contracción muscular	(Baek <i>et al.</i> , 2009)
		Troponina	Contracción muscular	(Baek <i>et al.</i> , 2009)
		Proteínas de choque térmico	Prevención de plegamiento incorrecto de proteínas	(Baek y Lee, 2010b)
		Eumenina mastoparan- OD, Orancis-Protonectin	Hemólisis	(Murata <i>et al.</i> , 2009)

Continuación cuadro 1

<b><i>Megacampsomeris prismatica</i></b>	Solitaria	bradiquinina, treonina -6 bradiquinina	Bloqueo de transmisión sináptica del receptor nicotínico de acetilcolina en el sistema nervioso central	(Konno <i>et al.</i> , 2001b)
<b><i>Nasonia vitripennis</i></b>	Gregaria	Serina proteasas	Inhibe la melanización de la hemolinfa del hospedero	(De Graaf <i>et al.</i> , 2010)
<b><i>Pimpla hypochondriaca</i></b>	Gregaria	Fenoloxidasa I, II, III	Melanización	(Parkinson <i>et al.</i> , 2001)
		Reprolisina	Degrada componentes de la matriz extracelular	(Asgari y Rivers, 2011)
		Serina proteasa hipotética	Proteasa	(Asgari y Rivers, 2011)
		Pimplina	Parálisis	(Asgari y Rivers, 2011)
<b><i>Polybia paulista</i></b>	Social	Quininas	Producción de dolor	(Dias Batista <i>et al.</i> , 2015)
		Hialuronidasa	Hidrólisis de ácido hialurónico	(Justo Jacomini <i>et al.</i> , 2013)
		Polybia-CP	Péptido quimiotáctico para células PMNL, Acción antimicrobiana contra bacterias gram-positivas.	(Souza <i>et al.</i> , 2005)
		Polybia-MPI	Péptido lítico de mastocitos, Quimotaxis para leucocitos polimorfonucleados (PMNL), Acción antimicrobiana contra bacterias gram positivas y gram negativas.	(Souza <i>et al.</i> , 2005)
<b><i>Protopolybia exigua</i></b>	Social	Mastoparan	Inflamación alérgica (degranulación de mastocitos)	(Mendes <i>et al.</i> , 2005)
		Protopolybiaquinina-I, Protopolybiaquinina-II	Contracción de músculos del íleon, degranuladores de mastocitos	(Mendes y Palma, 2006)
<b><i>Pteromalus puparum</i></b>	Solitaria	Fosfatasa ácida	Liberar grupos fosfatos	(Asgari y Rivers, 2011)
		Vn.11	Inmunosupresor	(Wu <i>et al.</i> , 2008)

\*Nd: no descrito

El veneno de himenópteros muestra un contenido muy marcado de moléculas diferenciadas dependiendo del modo de vida de las especies, siendo los venenos de las avispas sociales dotados de instrumentos defensivos para protegerse y proteger a sus colonias de depredadores y saqueadores. Contienen una serie de péptidos quimiotácticos, anfipáticos policatiónicos y quininas, responsables de causar procesos inflamatorios. En las avispas solitarias, el objetivo principal es causar parálisis en la presa para poder depositar sus huevos en ella y así asegurar su progenie, por lo que su contenido se basa en neurotoxinas que actúan sobre el sistema nervioso además de activos con función antimicrobiana para evitar la colonización por organismos patógenos (Palma, 2006). Cabe mencionar que no todas las avispas solitarias poseen veneno con función de parálisis (Piek, 1986).

En los himenópteros parasitoides, existen diferencias en el contenido del veneno dependiendo si la avispa es endoparasitoide o ectoparasitoide. El veneno de los ectoparasitoides contiene moléculas para ocasionar parálisis de corta o larga duración, mientras que el veneno de los endoparasitoides rara vez puede contener esta función, en cambio, cuenta con un contenido que interfiere con el sistema inmune (Moreau y Asgari, 2015).

La avispa endoparasitoide *Cotesia congregata*, inyecta su veneno y con este, un virus simbiote llamado polidnavirus. Este virus cumple la función de evitar la destrucción de los huevos depositados en el hospedero, ayuda a la obtención de recursos para las larvas de avispa y en conjunto con los teratocitos, detienen el desarrollo del hospedero (Crockett *et al.*, 2017).

### 3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### 3.1. Objetivo general

Describir la composición molecular del fluido paralizante de *Pepsis mexicana* para determinar su potencial uso en aplicaciones biotecnológicas.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Establecer un método de obtención de veneno que no requiera la disección de las glándulas del veneno.
- Obtener los perfiles proteicos presentes en el veneno de la avispa *Pepsis* mediante SDS-PAGE.
- Obtener los perfiles moleculares presentes en el veneno de la avispa *Pepsis* mediante RP-HPLC y Espectrometría de masas
- Identificación taxonómica de las avispas del género *Pepsis*.

#### 3.3. Hipótesis

La composición del fluido paralizante de *Pepsis mexicana* contiene péptidos y proteínas además de otros compuestos moleculares similares a los descritos en otras especies de himenópteros parasitoides, sin embargo, existen moléculas que resultan ser específicas de familias y géneros, por lo que *Pepsis mexicana* contendrá moléculas diferentes a las ya descritas en estudios de otras especies de avispas.

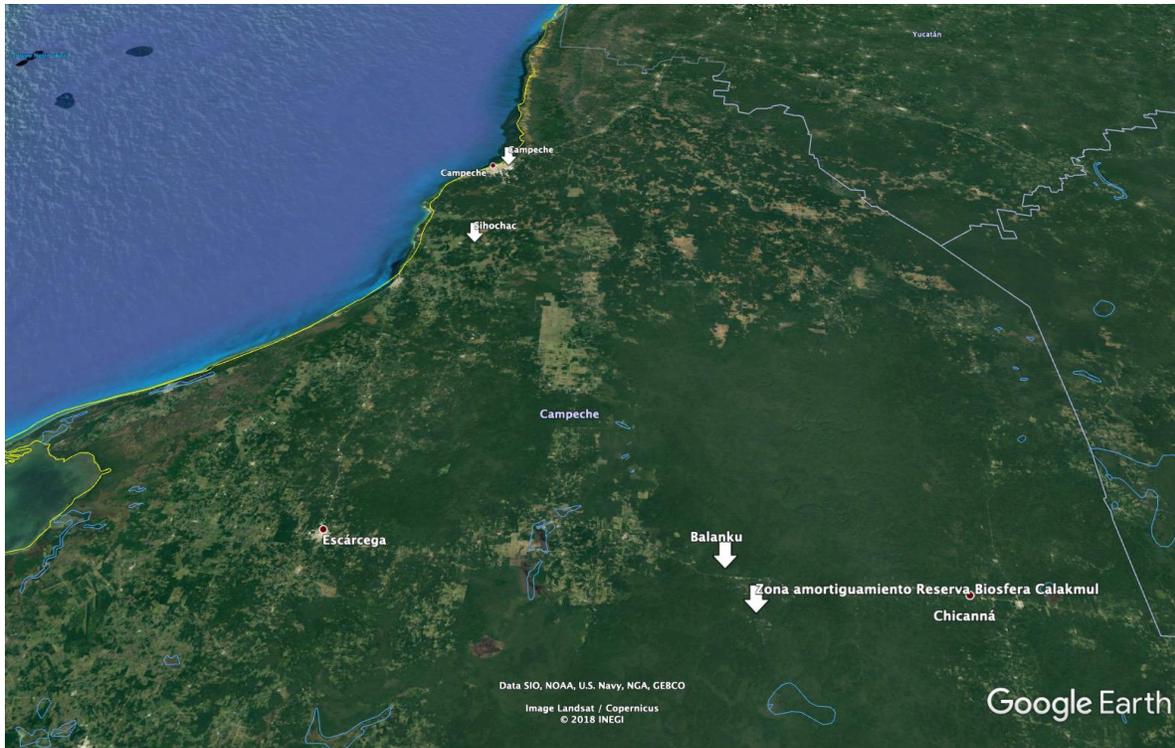
## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Origen del material biológico

Se efectuaron salidas de campo para coleccionar avispas hembras de *Pepsis sp.* a partir del mes de septiembre del 2017 hasta el mes de agosto del 2018.

Los lugares muestreados se eligieron basándose en recomendaciones por parte de habitantes en áreas rurales, quienes reportaron el avistamiento de las avispas de la familia Pompilidae en zonas con invernaderos y áreas de siembra mecanizadas en el poblado de Sihochac en el municipio de Champotón, Campeche, y por recomendación de estudiantes quienes realizaron colectas en zonas urbanas de la ciudad de Campeche.

La búsqueda se realizó en suelos agrietados, plantas en periodo de floración y zonas con acumulación de hojarasca en la que se pudieran encontrar tarántulas, además de senderos y zonas de siembras (ver mapa de la Figura 3). De igual manera se muestreó y coleccionó en la Reserva estatal de Balamkú y en la zona de amortiguamiento de la Reserva de la Biosfera de Calakmul ubicados en el municipio de Calakmul, por ser áreas naturales conservadas.



**Figura 3.** Zonas de búsqueda y colecta de avispas parasitoides del género *Pepsis*. Las flechas indican los lugares donde se recuperaron los ejemplares (de arriba hacia abajo): Ciudad de Campeche ( $19^{\circ}50'25.35''N$ ,  $90^{\circ}29'8.64''O$ ); Comunidad de Sihochac, Municipio de Champotón ( $19^{\circ}29'51.93''N$ ,  $90^{\circ}33'1.07''O$ ); Zona arqueológica de Balamkú ( $18^{\circ}33'16.51''N$ ,  $89^{\circ}56'35.72''O$ ), Zona amortiguamiento Reserva Biosfera Calakmul ( $18^{\circ}27'49.36''N$ ,  $89^{\circ}53'28.04''O$ ).

#### 4.2. Colecta, traslado y manejo de especímenes en el laboratorio

Las avispas se colectaron usando redes entomológicas aéreas. Cada espécimen colectado se depositó de manera individual en tubos cónicos tipo falcón de 50 ml, para evitar daño entre los organismos. Los tubos con los individuos se colocaron en una nevera con hielo para inmovilizarlos y una vez en el laboratorio, cada avispa se pasó a una botella de PET de 1 y 2.8 litros de capacidad (Figura 4) para facilitar el manejo y la alimentación.



**Figura 4.** Mantenimiento de avispas en laboratorio. Hembras adultas permanecieron vivas en confinación hasta 90 días, lo que permitió la recuperación de veneno de las mismas avispas repetidas veces.

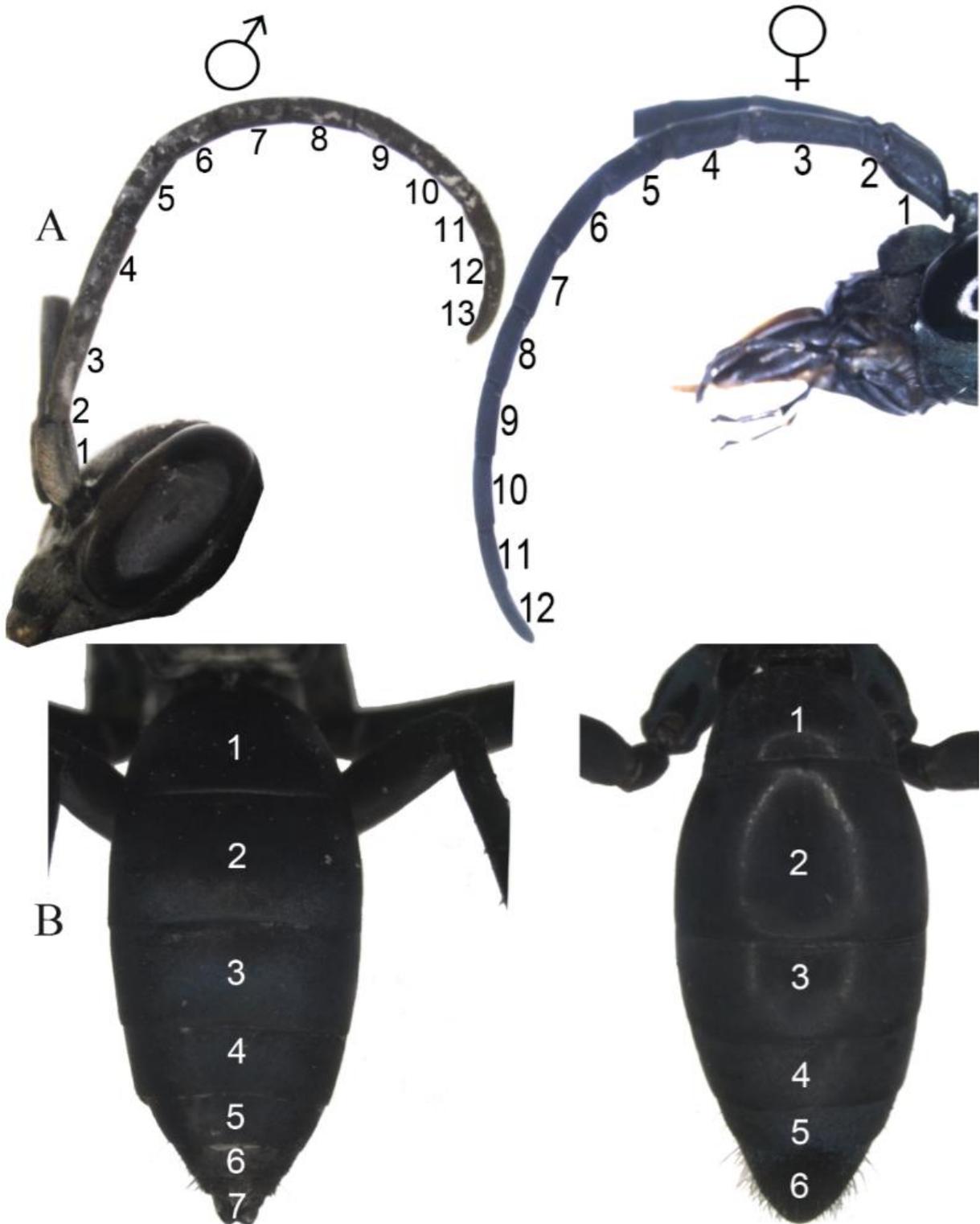
Se realizaron perforaciones en las botellas de PET para permitir el ingreso de aire y facilitar la alimentación, la cual consistió en colocar una gota de miel en la tapa de la botella una vez al día y aproximadamente 0.5 ml de agua con una jeringa en el otro extremo de la botella. Las avispas reaccionaban a la presencia de la miel volando hacia la tapa cada vez que se les proporcionaba alimento. Las botellas de PET se cambiaron cada dos días ya que al quedar residuos de miel, estos se fermentaban provocando la proliferación de levaduras.

### **4.3. Identificación taxonómica de las avispas**

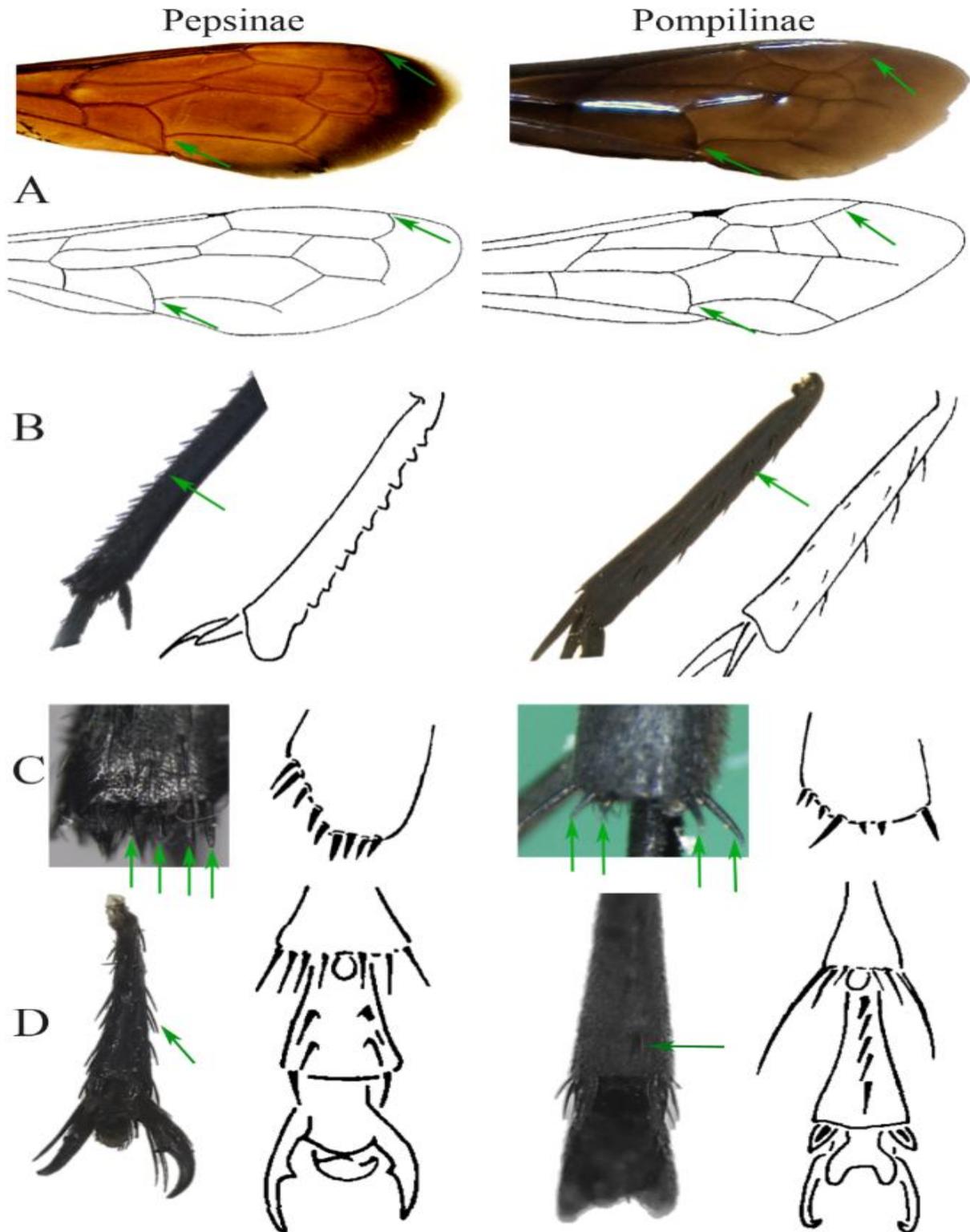
Se determinó el sexo de los individuos capturados previo a la identificación taxonómica. Para el sexado se observó bajo un estereoscopio el número de segmentos antenales los cuales, en el caso de los machos deben ser 13 segmentos, y 12 para el caso de hembras. Así mismo, hay diferencias en el número de segmentos en el metasoma: siete segmentos para los machos y seis segmentos en las hembras

(Figura 5) (Townes, 1957). Todo este procedimiento se realizó *in vivo* puesto que los individuos se utilizarían en la extracción de veneno. Para no provocar ningún daño durante este procedimiento, las avispas se colocaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente dos minutos, para reducir sus movimientos al mínimo y poder manipularlas y realizar el conteo de segmentos mencionados. Los individuos machos se liberaron ya que estos no producen veneno.

La identificación taxonómica se realizó con individuos hembras. La revisión de características para la identificación de la familia y subfamilia se realizó utilizando las claves reportadas en Goulet y Huber, 1993 (Figura 6) (Anexo I). Para la determinación de la especie, se utilizaron las claves publicadas por Townes, 1957; Vardy, 2000; Vardy, 2002; Wasbauer y Kimsey, 1985 y Evans, 1966 (Anexo I).



**Figura 5.** Características que permiten distinguir el sexo de las avispas de la familia Pompilidae. (A) Conteo de los segmentos antenales, (B) número de segmentos en el metasoma.



**Figura 6.** Características determinantes para subfamilias de acuerdo a Goulet y Huber, 1993. (A) Vena radial del ala, (B) espinas sobre tibias, (C) espinas al final de la tibia, (D) espinas tarsales.

#### **4.4. Establecimiento de un método de extracción de veneno**

La literatura reporta la extracción y procesamiento de las glándulas del veneno para la obtención de los componentes presentes en el mismo, con la desventaja de venir acompañadas de tejidos de la avispa y que posteriormente hay que diferenciar los componentes de tejidos de los del fluido. De este modo, para la extracción de veneno se probaron tres métodos que nos permitieran obtener de manera eficiente y suficiente el veneno de las avispas, sin necesidad de realizar disección de glándulas del veneno.

En un hecho fortuito, observamos que al ingresar a la avispa a  $-20^{\circ}\text{C}$  para aletargarlas, en algunos casos cuando la avispa “despertaba” del efecto de la refrigeración, de manera espontánea liberaba pequeña gota de veneno directo del aguijón. De este modo, se realizaron pruebas cronometradas para determinar el tiempo en el que las avispas tardaban en quedar completamente inmóviles a esta temperatura, y lograban recuperarse sin daño aparente; esto con el fin que la avispa estuviera inmóvil el tiempo suficiente para poder manipularla con facilidad y seguridad, y recuperar el veneno.

Debido al dolor intenso reportado por la picadura de estas avispas, se tomaron medidas extremas durante la extracción de veneno tales como: mantener puertas y ventanas cerradas para evitar un escape y evitar una picadura accidental a personas fuera del laboratorio; durante la extracción se mantuvo una red entomológica a la mano para poder capturar a la avispa en caso de escape; se evitó que personas ajenas a la investigación se encontraran dentro del laboratorio en el momento de la manipulación de las avispas; la extracción fue realizada por tres personas (una que sujetaba el ejemplar y evitaba su escape, quién recuperaba el veneno una vez expulsado por la avispa y un adicional a cargo de la red entomológica).

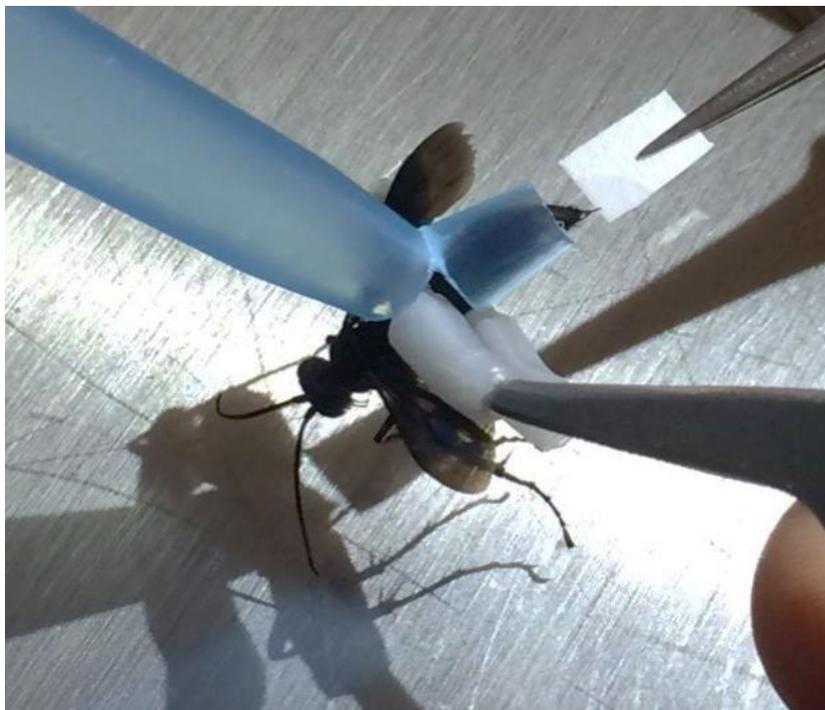
Para evitar que durante la manipulación de la avispa se ocasionará una picadura accidental, se realizó una modificación a puntas de micropipeta de 1 ml y de 5 ml para utilizarlos como prótesis para sostener el abdomen de las avispas y así limitar sus movimientos (Figuras 7 y 8): se cortó la punta a una altura en la cual el diámetro fuera

suficiente para permitir que saliera solo una pequeña parte del abdomen de modo que la avispa pudiera exponer su aguijón.

La avispa se sostuvo con pinzas finas curvas de acero con ambas puntas cubiertas con Parafilm® para evitar daño físico excesivo a la avispa. Previo a que la avispa se recuperara de la refrigeración, el abdomen se limpió con papel húmedo con agua destilada para eliminar cualquier exceso de miel que pudiera tener (con el que se alimentaba a la avispa dentro de su contenedor) y contaminar la muestra.

Para recuperar el veneno se evaluaron tres métodos:

- 1) Se recubrió con Parafilm® la parte superior de un tubo de 1.5 ml, y se intentó que la avispa lo atravesara y depositara el veneno dentro del tubo.
- 2) Se intentó recuperar el veneno, absorbiendo con papel filtro previamente esterilizado (0.5 mm x 0.8 mm) directamente del ovopositor de la avispa al momento en el cual la gota de veneno salía (Figura 7).



**Figura 7.** Sujeción y prótesis utilizada para inmovilizar a la avispa para coleccionar el veneno con seguridad. El veneno se coleccionó por absorción utilizando papel filtro estéril (obsérvese como el veneno es absorbido por el papel filtro).

3) El tercer método consistió en recuperar la gota de veneno directamente del aguijón utilizando una micropipeta de 10  $\mu$ l (Figura 8). En este método las puntas utilizadas para recuperar el veneno se almacenaron en el mismo tubo donde se colectó el veneno para poder recuperar posteriormente cualquier traza de veneno que pudiera quedar adherida a la punta.

#### **4.5. Caracterización componentes presentes en el veneno.**

Debido a que el número de avispas del género *Pepsis* con las que contábamos era limitado para todos los ensayos posteriores, durante las búsquedas de individuos en las diferentes zonas, se capturaron otras especies de avispas de la familia. Estas dos especies se utilizaron para estandarizar el proceso de extracción del veneno, y para tener organismos identificados y ver la posibilidad de comparar los contenidos de los venenos. De este modo, las tres especies: *Pepsis mexicana*, *Pepsis terminata* y *Anoplius nigritus*, se utilizaron en algunas de las determinaciones para comparación de los resultados.



**Figura 8.** Colecta del veneno succionando con una micropipeta. La gota de veneno sale del aguijón cuando la avispa aún se encuentra dormida por el efecto de enfriamiento, sin embargo, el uso de la prótesis en el abdomen es necesaria para dirigirlo y para limitar el movimiento si la avispa reaccionara antes de terminar con la extracción.

#### **4.5.1. Obtención de los perfiles proteicos presentes en el veneno de las avispas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)**

La presencia de proteínas en el veneno de las avispas se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones desnaturizantes y reductoras utilizando una cámara de electroforesis vertical de la marca Bio-Rad Mini Protean II, los geles se realizaron a una concentración de poliacrilamida de 12 y 16%.

Se cargaron 5  $\mu$ l de marcador molecular y 10  $\mu$ l de la muestra de veneno el cual fue previamente resuspendida en 30  $\mu$ l de agua destilada estéril (punta o papel filtro lavado), y se dejó correr a 80 volts por aproximadamente tres horas. Se utilizó el

marcador de peso molecular comercial Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (Bio-Rad).

Al término de la corrida, los geles se retiraron de la cámara y se lavaron con agua destilada estéril para eliminar restos de buffer de corrida. Los geles se tiñeron con azul de Comassie (0.1%) por 20 minutos. Al término del tiempo de teñido, los geles se lavaron nuevamente con agua destilada estéril para quitar el exceso de colorante y se colocaron en una solución desteñidora por 30 minutos en agitación constante, y un lavado final con agua destilada estéril. Se registraron los resultados en un fotodocumentador para la obtención de la imagen digital.

#### **4.5.1.1. Cuantificación de proteínas totales contenidas en el veneno por el método de Bradford (1976)**

Las concentraciones de proteínas totales presentes en las muestras de veneno, se obtuvieron de acuerdo al método de Bradford y bajo el siguiente procedimiento. En una placa de 96 pozos se realizó una curva de calibración por triplicado utilizando diluciones de BSA (albúmina de suero bovino), a las concentraciones de 0.25, 0.5, 1.0 y 1.4 µg/ml. En diferentes pozos se agregó 10 µl de BSA en las diferentes concentraciones, 200 µl de reactivo Bradford (SIGMA-ALDRICH) diluido cinco veces. Se agregaron 10 µl del veneno de cada muestra recuperada de las avispas, más 200 µl de solución diluida de Bradford. La placa fue leída a 590 nm en un lector de placas Victor X5 Multi Label Plate Reader, ® Perkin Elmer.

#### **4.5.2. Fraccionamiento del veneno por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)**

Este proceso fue llevado a cabo en las instalaciones del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en el laboratorio número siete a cargo del Dr. Lourival Domingos Posanni Postay.

Las muestras procesadas en el mes de enero del 2018 se extrajeron de *P. mexicana*, *P. terminata* y *A. nigritus*. Las puntas de micropipeta utilizadas en una misma avispa se lavaron tres veces con 30  $\mu$ l de agua tretradestilada estéril y se recolectó en un nuevo tubo de 1.5 ml, el cual fue centrifugado por 10 minutos a 12,000 rpm a 4°C para que cualquier partícula externa al veneno se fuera al fondo. Después el veneno fue colocado con ayuda de una micropipeta en un tubo de 1.5 ml limpio, dejando así los residuos que pudieran interferir con el análisis.

El veneno se purificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando un equipo Waters® 600 controller con un detector Waters® 2487 dual  $\lambda$  absorbance detector, con una columna C18 analítica fase reversa (Vydac®). Las condiciones de corrida fueron: flujo de 0.8 ml/min, con un gradiente de 10 a 60 % de buffer B, ACN (acetonitrilo) + 0.1% de TFA (ácido trifluoroacético) contra el buffer A, agua en 0.12% de TFA durante 75 minutos. Se cargaron 217  $\mu$ g de *P. mexicana*, 416  $\mu$ g de *P. terminata* y 221  $\mu$ g de *A. nigritus*.

Las proteínas se detectaron a una longitud de onda de 230 nm y las fracciones correspondientes a los picos se colectaron manualmente en tubos de 1.5 ml, los cuales se rotularon con su respectivo tiempo de retención.

Las muestras procesadas en el mes de junio del 2018 se extrajeron de cuatro avispas *P. mexicana* de las cuales se obtuvieron 39 muestras. Las 39 puntas de micropipeta se lavaron con 50  $\mu$ l de agua destilada estéril cada una y el volumen obtenido de la unión de todas las muestras fue de 1950  $\mu$ l, el cual fue filtrado con una Unidad de filtración Millex-GP; 0.22  $\mu$ m, poliétersulfona, 33 mm, esterilizada por radiación, Merk Millipore para asegurarnos de eliminar cualquier microorganismo que pudiera estar contaminando. La muestra se almaceno en dos tubos de 2 ml. Este procedimiento fue llevado a cabo en el laboratorio de Control Microbiano de Plagas (CMP) del Colegio de Postgraduados (ColPos) campus Campeche y la muestra fue liofilizada para poder ser transportada al laboratorio número siete en el IBT de la UNAM.

Ambos tubos de la muestra liofilizada se rehidrataron realizando dos lavado de 100  $\mu$ l y un lavado de 50  $\mu$ l en cada tubo, obteniendo un volumen final de 500  $\mu$ l de muestra. La cuantificación se llevó a cabo con el kit 2D Quant-Kit GE Healthcare 80-6483-56. Se cargaron 400  $\mu$ g de la muestra en el HPLC utilizando los mismos parámetros que en las muestra analizadas en el mes de enero.

#### **4.5.3. Análisis molecular por espectrometría de masas**

Para la determinación de las masas moleculares se tomaron las fracciones de los picos de interés los cuales correspondían a los picos más altos en el cromatograma, sin embargo, los espectros mostraron más de un componente por lo que al no encontrarse puras las fracciones del veneno, se optó por elegir los picos en el rango de los tiempos de retención 14 a 45 minutos aproximadamente. Los picos se reconstituyeron a una concentración final de 500 pmol / 5  $\mu$ l de acetonitrilo al 50% con 1% de ácido acético y se aplicaron directamente en un espectrómetro de masas Thermo Scientific LCQ Fleet con trampa de iones (San Jose, CA), utilizando un sistema de suministro de bomba de jeringa Surveyor MS. El eluato a 10  $\mu$ l / min se dividió para permitir que solo el 5% de la muestra ingrese a la nanoespray (0.5  $\mu$ L/min).

#### **4.5.4. Preparación de muestras para secuenciación de aminoácidos por el método de degradación de Edman.**

##### **4.5.4.1. Electroforesis.**

Se preparó un gel de poliacrilamida al 12%. El marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder ® Thermo Scientific, la muestra de veneno de *Pepsis mexicana* y un control positivo el cual fue el veneno de la serpiente *Bothrops asper* se cargaron por duplicado como se ilustra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Orden en el cual se cargaron las muestras en el gel de poliacrilamida para su posterior transferencia a una membrana de PVDF mediante una cámara semi-seca. Los números del 1 al 10 representan los pozos de gel, el 1, 5, 9 y 10 (-) quedaron vacíos.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
-	MW 5 µl	40 µg muestra	8.7 µg <i>Bothrops asper</i>	-	MW 5 µl	40 µg muestra	8.7 µg <i>Bothrops asper</i>	-	-

El gel se corrió a 50 volts hasta que las muestras llegaron a la región separadora del gel y a partir de ahí se corrió a 80 volts por aproximadamente tres horas.

#### 4.5.4.2. Transferencia electroforética semi-seca de las proteínas del gel a la membrana

Mientras el gel estaba en la cámara de electroforesis, se cortaron ocho pedazos de papel filtro y uno de PVDF (Fluoruro de Polivinilideno) de 7 X 3.1 cm. El papel filtro se colocó en una caja de Petri con buffer de transferencia (Tris base 48 mM, Glicina 39 mM, SDS 0.037%, Metanol 20%, dH<sub>2</sub>O) para humedecerlo y la membrana de PVDF se activó en metanol por 2 minutos y posteriormente se colocó en agua tetradesilada estéril. El gel se sacó de la cámara de electroforesis y se lavó con agua tetradesilada y se recortaron ambas partes del gel con las mismas medidas del papel filtro y la membrana PVDF (7 x 3.1 cm). Una de las mitades del gel fue teñido con azul de Commasie y el otro se dejó en agua tetradesilada para posteriormente ser transferido a una membrana de PVDF.

Las placas de la cámara de transferencia debieron estar muy limpias para que no tener alguna interferencia. Los pedazos de papel se emplearon para formar un sándwich, primero se colocaron 4, seguidos por la membrana de PVDF, el gel y por último los cuatro pedazos restantes de papel filtro. Se verificó que no quedaran burbujas utilizando un tubo de vidrio como rodillo para eliminarlas y el exceso de buffer de transferencia fue retirado con papel absorbente.

El tiempo de transferencia fue de una hora y 15 minutos con una corriente de 0.8 mA/cm<sup>2</sup>, por lo que se corrió a 18 mA en una cámara SEMI-DRY BLOTTER EBU-4000

C. B. S. SCIENTIFIC CO. La transferencia de proteínas de la membrana se verificó usando la tinción con Rojo de Ponceau S, las bandas visualizadas se cortaron usando como referencia la otra mitad del gel la cual fue teñida con azul de Comassie. Cada banda cortada se rotulo de acuerdo con su peso molecular y se usó para determinar su secuencia de aminoácidos (N-terminal) por degradación de Edman.

#### **4.5.6. Ensayos de actividades enzimáticas y antimicrobianas**

Enzimas como las fosfolipasas A2 (rompe las membranas celulares y destruye las células), hialuronidasas (corta los carbohidratos unidos a proteínas y permite la penetración del veneno hacia los tejidos), metaloproteinasas (interviene en la degradación de componentes de la matriz extracelular) y péptidos antimicrobianos, han sido reportados con anterioridad en veneno de avispas (Baek *et al.*, 2016; Justo Jacomini *et al.*, 2013; Konno *et al.*, 2001b; Price *et al.*, 2009) por lo que se decidió medir la actividad de estas enzimas y péptido en el veneno de las avispas Pompilidae.

##### **4.5.6.1. Zimograma en gelatina para la detección de metaloproteinasas**

Se preparó un gel SDS-PAGE al 12% con 0.1% de gelatina. La gelatina fue previamente disuelta en agua. Durante la preparación de las soluciones para el gel, la gelatina se incubó a 37°C para una mejor disolución. Se cargaron 5 µl de marcador de peso molecular, 40 µg de la muestra de veneno de *P. mexicana* y 3 µl de veneno de *B. asper* como control positivo. El gel se corrió a 50 volts hasta llegar al gel separador y después se dejó a 80 volts hasta su finalización.

Al término de la electroforesis, el gel se lavó con buffer de renaturalización (50mM Tris-HCl pH 8.0, 2.5% Tritón X-100) tres veces por 15 minutos en agitación por cada lavado para remover el SDS presente. Después se realizaron tres lavados por 15 minutos de igual manera en agitación, con el buffer de lavado (50 Mm Tris HCl pH 8.0) para remover el Tritón presente en buffer de renaturalización. El gel se incubó en buffer de activación (50 mM Tris HCl pH 8.0, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 µM ZnCl<sub>2</sub>) durante 20 horas a 37°C

y al cabo de este tiempo el gel fue teñido con azul de Comassie y posteriormente desteñido con la solución 40% Metanol, 10% Ácido acético por 30 minutos.

#### **4.5.6.2. Detección de actividad fosfolipasa A2**

El ensayo de actividad fosfolipasa se realizó en base al aclarado de una suspensión de yema de huevo por hidrolisis de fosfolípidos, lo cual deja ver halos claros alrededor del pozo en el cual se pone la enzima (Habermann y Hardt, 1972).

La solución A fue preparada mezclando 12 ml de yema de huevo con 36 ml de una solución 0.86% de NaCl, para la solución B, se disolvió 0.3 g de agarosa en 50 ml de tris 50mM con un pH de 7.8 poniéndolo a baño María para que la agarosa se disolviera bien y la solución C constó de una solución 10mM de CaCl<sub>2</sub>. Finalmente, se mezclaron 0.5 ml de la solución A, 50 ml de la solución B y 0.5ml de la solución C, a lo que también se le agregó 0.080 ml de Rodamina G. Para la realización de esta mezcla de soluciones, se tuvo que procurar que la solución B no estuviera a más de 40°C para que la yema de huevo no se precipitara, pero que estuviera lo suficientemente caliente para estar en estado líquido. La mezcla fue vertida en cajas de Petri procurando que el gel a obtener tuviera aproximadamente 2 mm de espesor y una vez que el agar estuvo sólido, se le hicieron cuatro pozos con aproximadamente 2 mm de diámetro cada uno.

En el primer gel se probaron concentraciones de 5 µg y 10 µg y el en segundo las concentraciones de 20 µg y 40 µg, ambas cajas de Petri con un control negativo con 10 µl de dH<sub>2</sub>O y un control positivo con 6.9 µg de veneno de *B. asper*. Las cajas de Petri fueron selladas con parafilm y fueron puestas en el horno a 37°C.

#### 4.5.6.3. Detección de actividad hialuronidasa con el método turbidimétrico (Wortington. 1993)

Para este ensayo se realizó una curva de calibración de ácido hialurónico por triplicado (Cuadro 3). Los tubos de la curva fueron incubados por 20 minutos a temperatura ambiente y se le añadió 250 µl de cetilpiridinio al 10 % y fueron incubados por 10 minutos más para después leer la absorbancia a 595 nm.

Cuadro 2. Preparación de curva de calibración de ácido hialurónico. Se realizó por triplicado

Tubo	Solución de Ha (µl)	Buffer pH 5.8	Concentración de Ha
A	50 µl	50 µl	0.2 mg/ml
B	40 µl	60 µl	0.16 mg/ml
C	30 µl	70 µl	0.12 mg/ml
D	20 µl	80 µl	0.08 mg/ml
E	10 µl	90 µl	0.04 mg/ml
F	0 µl	100 µl	0.0 mg/ml

Se prepararon dos tubos con 19 µl la muestra de veneno (40 µg) para el ensayo enzimático, colocando 31 µl de buffer de fosfato de sodio a pH 5.8 y se les agregó 50 µl de solución de ácido hialurónico, se dejaron incubar por 20 minutos a temperatura ambiente. Después del tiempo transcurrido, la actividad hialuronidasa fue detenida hirviendo los tubos por 5 minutos, los tubos se dejaron enfriar y se les agregó 250 µl de cetilpiridinio al 10 %, se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente para leer absorbancia a 595 nm para poder determinar cuál es la cantidad de ácido hialurónico que quedo sin hidrolizar en las muestras.

#### 4.5.6.4. Actividad antimicrobiana

Se utilizó la sepa ATCC-2932 de *Staphylococcus aureus* como bacteria Gram positiva a la cual se le induciría la inhibición. Después de haber crecido la bacteria en medio líquido MH (Mueller Hinton), se cuantificó dando como resultado una concentración de 0.465 µg/ml, a esto se le realizó una dilución para tener un stock a 1 µg/ml y de esa concentración, se realizaron diluciones seriadas de 1/10, 1/100 y 1/1000 y de la última

dilución se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  con 50  $\mu\text{l}$  de medio líquido MH para usar en el ensayo.

En una placa de 96 pozos se colocó por duplicado la muestra de veneno (M), el control positivo (C +), el control negativo (C -) y el blanco (B) de la siguiente manera:

- **M** : 50  $\mu\text{l}$  suspensión de *S. aureus* + 31  $\mu\text{l}$  medio MH con 19  $\mu\text{l}$  (40  $\mu\text{g}$ ) de veneno
- **C +** : 50  $\mu\text{l}$  suspensión *S. aureus* + 50  $\mu\text{l}$  de ampicilina (25  $\mu\text{l/ml}$ )
- **C -** : 50  $\mu\text{l}$  suspensión *S. aureus* + 50  $\mu\text{l}$  medio MH
- **B** : 100  $\mu\text{l}$  medio MH

La placa se leyó a 605 nm en el tiempo 0, después de 4 horas y después de 19 horas.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Captura de ejemplares de la familia Pompilidae

Se colectaron un total de 69 avispas, 34 pertenecientes al género *Pepsis*, siendo 17 de ellas hembras. En el Cuadro 4 se reporta los sitios donde se colectaron los especímenes que se utilizaron durante el desarrollo experimental.

Cuadro 4. Ejemplares colectados de la familia Pompilidae

Sitio de colecta	Pepsinae		Pompilinae	
	♂	♀	♂	♀
Balankú	-	3	22	10
Calakmul	2	6	-	-
Campeche	-	2	-	1
Sihochac	6	13	4	-



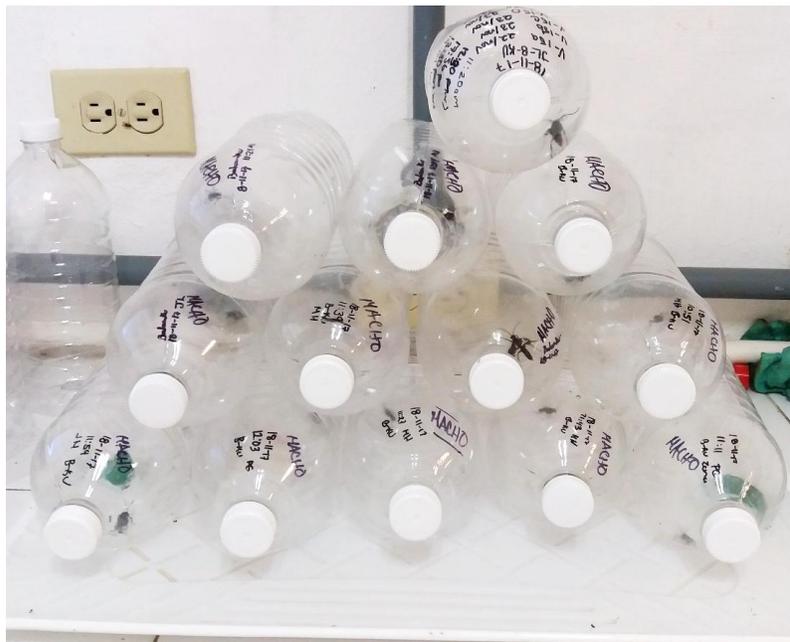
**Figura 9.** (A) Árbol de caoba en el que se refugiaban los machos de *Pepsis*. (B) Flores de marañón y (C), huaxin de las que libaban las avispas de la familia Pompilidae.

Las avispas del género *Pepsis*, se capturaron en Sihochac (Municipio de Champotón), en el campo experimental de frutales del ColPos, libando en flores de marañón (*Anacardium occidentale*) y en la ciudad de Campeche, en flores de *Walteria indica*,

mientras que en árboles de caoba (*Swietenia macrophylla*) (Figura 9) se capturaron exclusivamente machos.

## 5.2. Mantenimiento de avispas en cautiverio

Durante las actividades de captura de ejemplares, se observó que las avispas del género *Pepsis*, no obstante, su gran tamaño y su picadura como defensa, no presentaron un comportamiento agresivo, aun cuando se les persigue, su reacción es huir y no atacar. De cualquier modo, los individuos capturados se colocaron en recipientes individuales para evitar que se lastimaran entre ellos, principalmente por su tamaño (Figura 4 y 10). El tiempo de vida fue variado en cada ejemplar ya que la edad fue desconocida al momento de la captura, algunos de los ejemplares permanecieron vivos solo unos días, y otros se lograron mantener hasta tres meses. Hay que subrayar que aparentemente no se provocó demasiado estrés sobre el comportamiento de las avispas dentro de las botellas, ya que no se presentó automaltrato por un esfuerzo excesivo de salir de los contenedores. Las avispas aceptaron sin rechazo la dieta de miel que se les proporcionó.



**Figura 10.** Separación individual de avispas de la familia Pompilidae después del sexado. Solo las hembras se utilizaron y los machos se liberaron.

### 5.3. Identificación taxonómica

Las claves utilizadas para la identificación de familia, subfamilia y especie, consideran las características taxonómicas mostradas en la Figura 6. Se identificaron tres especies de avispas de la familia Pompilidae correspondientes a las subfamilias Pepsinae y Pompilinae: (Figura 11).

**Phylum** Arthropoda)

**Subphylum** Hexapoda

**Clase** Insecta

**Orden** Hymenoptera

**Superfamilia** Pompiloidea

**Familia** Pompilidae

**Subfamilia** Pompilinae

**Tribu** Pompilini

**Genero** *Anoplius*

**Subgenero** *Arachnoprocnotus*

**Especie** *Anoplius nigritus*, Dahlbom 1843

**Subfamilia** Pepsinae

**Tribu** Pepsini

**Genero** *Pepsis*

**Especie** *Pepsis mexicana*, Lucas 1895

*Pepsis terminata*, Dahlbom 1843



*A. nigrinus*



*P. terminata*



*P. mexicana*

**Figura 11.** Especies de avispas parasitoides de arañas identificadas en este trabajo. El tamaño promedio de *P. mexicana* fue de 4.6 cm (largo del cuerpo).

## **5.4. Extracción y recuperación del veneno**

### **5.4.1. Inmovilización de avispas para la obtención de veneno**

Consideramos que el método utilizado de adormecimiento por enfriamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , es un procedimiento adecuado para este tipo de organismos porque no registramos ningún daño (muerte de los organismos) posterior al tratamiento usado en las avispas. Los siguientes tiempos se evaluaron sin observar daño en la recuperación y manipulación (recomendamos el tiempo mínimo y usar el máximo en caso de recuperación demasiado rápida):

- *A. nigritus*, 1 - 1:30 minutos
- *P. terminata*, 2 - 3 minutos
- *P. mexicana*, 5 - 5:30 minutos

Todas las avispas mostraron resistencia al frío a partir de la segunda vez que fueron introducidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , aumentando hasta dos minutos el tiempo en el que quedaban inmóviles.

Debido a su tamaño, *P. mexicana* llegó a requerir hasta 4 minutos más posterior a la primera exposición al frío.

### **5.4.2. Métodos de extracción de veneno**

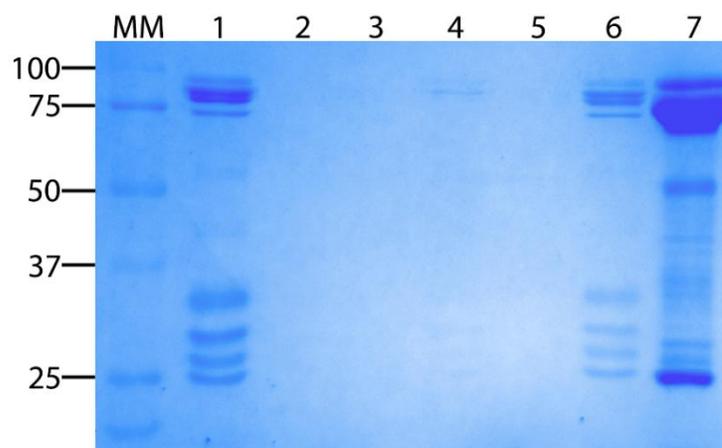
El método de recuperación del veneno mediante una micropipeta fue el más eficiente, ya que, la gota de veneno expulsada por el aguijón era aspirada y quedaba depositada dentro de la punta. Debido a que parte del veneno no se expulsaba de la punta por ser una cantidad pequeña, las puntas eran también guardadas en el mismo tubo para recuperar la mayor cantidad de veneno posible. Todas las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Es de comentar que el método de recuperar el veneno con papel filtro, aunque efectivo, fue descartado debido a que los componentes hidrofóbicos del veneno podían quedar atrapados entre las fibras del papel al momento de los lavados para recuperar el veneno. En algunas ocasiones, la avispa despertaba antes de poder colectar el veneno, pero gracias a la prótesis puesta en el abdomen, el movimiento era limitado y el veneno era fácilmente colectado con la micropipeta.

## 5.5. Caracterización del veneno

### 5.5.1. SDS-PAGE del veneno de las avispas de la familia Pompilidae en las pruebas de extracción de veneno

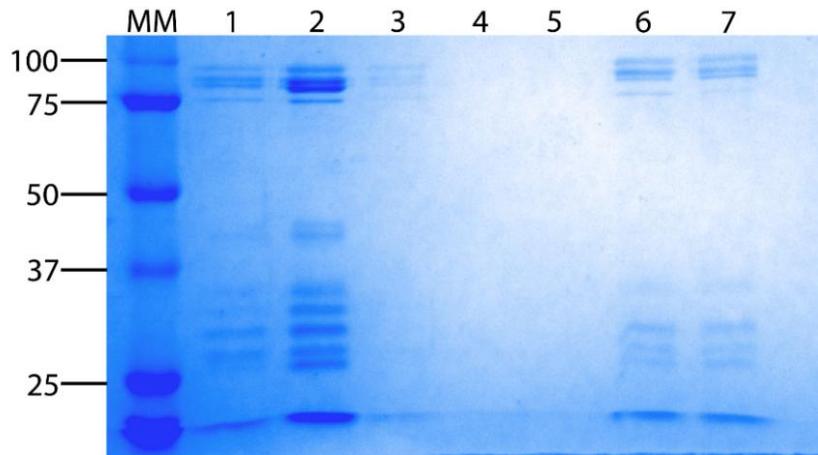
El primer gel se realizó con el veneno de seis avispas de la tribu Pompilini y una avispa del género *Pepsis*. El veneno se extrajo probando el segundo método de extracción utilizando papel filtro para su recuperación, podemos observar que la dificultad que se presentó al realizar los lavados de los pedazos de papel filtro, resultó en una baja concentración de veneno (Figura 12).



**Figura 12.** Separación electroforética de los venenos de la familia Pompilidae por SDS PAGE al 12 %. Los carriles 1 al 6, ejemplares de la tribu Pompilini, carril 7 ejemplar del género *Pepsis*.

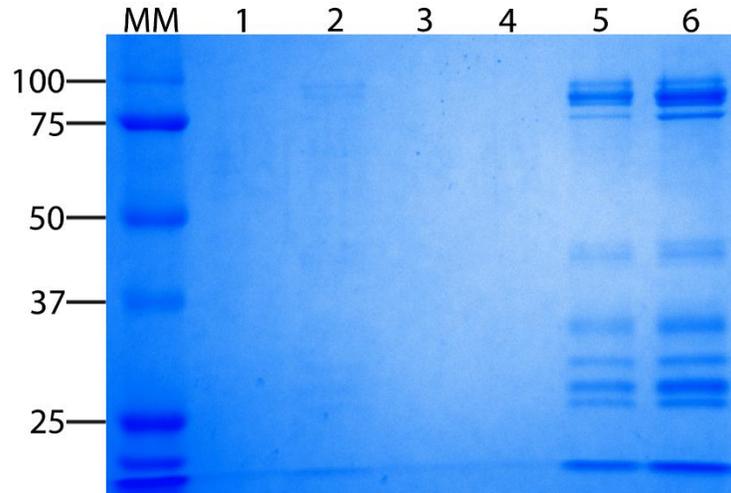
El segundo gel se trató de la extracción de veneno de tres avispas en dos días diferentes dejando pasar 5 días entre la primera y la segunda extracción, utilizando

ambos métodos de extracción (papel filtro y micropipeta). Los patrones de las bandas en el gel no cambiaron en las muestras después de los 5 días transcurridos (Figura 13), sin embargo, seguimos observando la deficiencia del método 2 al momento de los lavados del papel filtro.



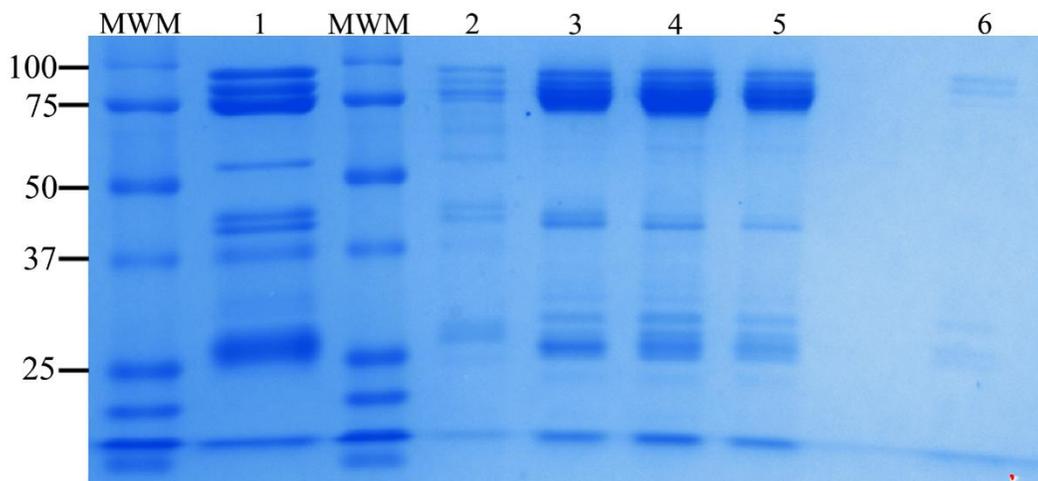
**Figura 13.** Separación electroforética de los venenos de la familia Pompilidae por SDS PAGE al 12 %. Los carriles 1, 2, 3, 6 y 7 contienen; el veneno de dos avispas de la tribu Pompilini utilizando el método de extracción con micropipeta. Los carriles 4 y 5, veneno de ejemplar del género *Pepsis* (Pepsinae) utilizando el método de recolección con papel filtro.

Una vez evaluada la eficiencia de ambos métodos, se decidió continuar con la técnica por micropipeta. Se procedió a realizar una evaluación de tiempo de espera para las extracciones para saber cuánto tiempo es necesario dejar pasar entre cada extracción en el mismo ejemplar para que la glándula de veneno produzca todos los componentes. Se utilizó un ejemplar de la tribu Pompilini para extraer veneno el mismo día en tres horas diferentes y después de tres días de descanso, de nuevo se extrajo veneno en dos días seguidos (Figura 14). Podemos observar que es necesario que las avispas se recuperen de las extracciones al menos un día para realizar una nueva extracción.



**Figura 14.** Separación electroforética de un veneno de un ejemplar de la tribu Pompilinae por SDS PAGE al 12 %. Los carriles 1-4 son extracciones el mismo día a diferentes horas, solo en el carril 2 se puede ver presencia de bandas de proteínas. En los carriles 5 y 6 se observa el mismo patrón de bandas.

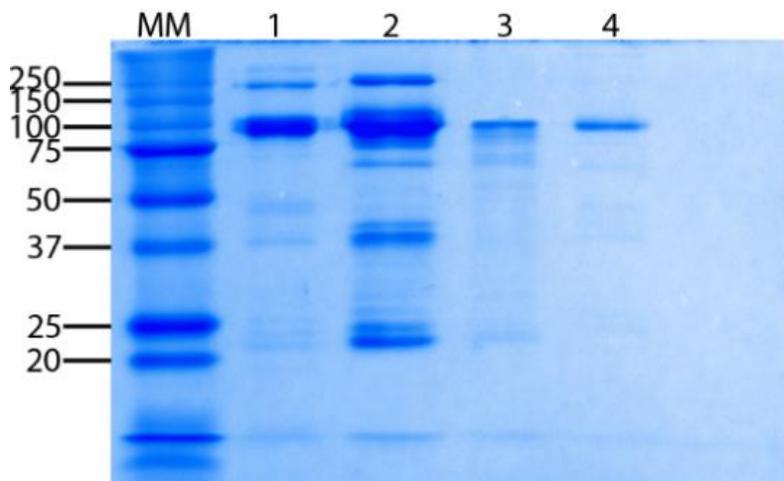
Se realizó un gel con muestras de veneno elegidas para los análisis cromatográficos y los ensayos de las diferentes actividades enzimáticas y antimicrobiana (Figura 15).



**Figura 15.** Separación electroforética de los venenos de la familia Pompilidae por SDS PAGE al 12 %. Los carriles 1 y 2, *P. mexicana*; 3, 4 y 5, *P. terminata*; 6, *A. nigrilus*.

El gel al 16% mostró cambio en el número de bandas presentes en el veneno de *P. mexicana* y *P. terminata* ya que se observa una banda sobre los 250 KDa que no se

había presentado en ninguno de los geles al 12% mostrados anteriormente (Figura 16).



**Figura 16.** Separación electroforética de los venenos de la familia Pompilidae por SDS PAGE al 16%. Presencia de nuevas bandas en las muestras de veneno de *P. mexicana* (carril 2) y *P. terminata* (carril 1) con peso molecular de aproximadamente 250 KDa. Carriles 3 y 4 ejemplares de la tribu Pepsini.

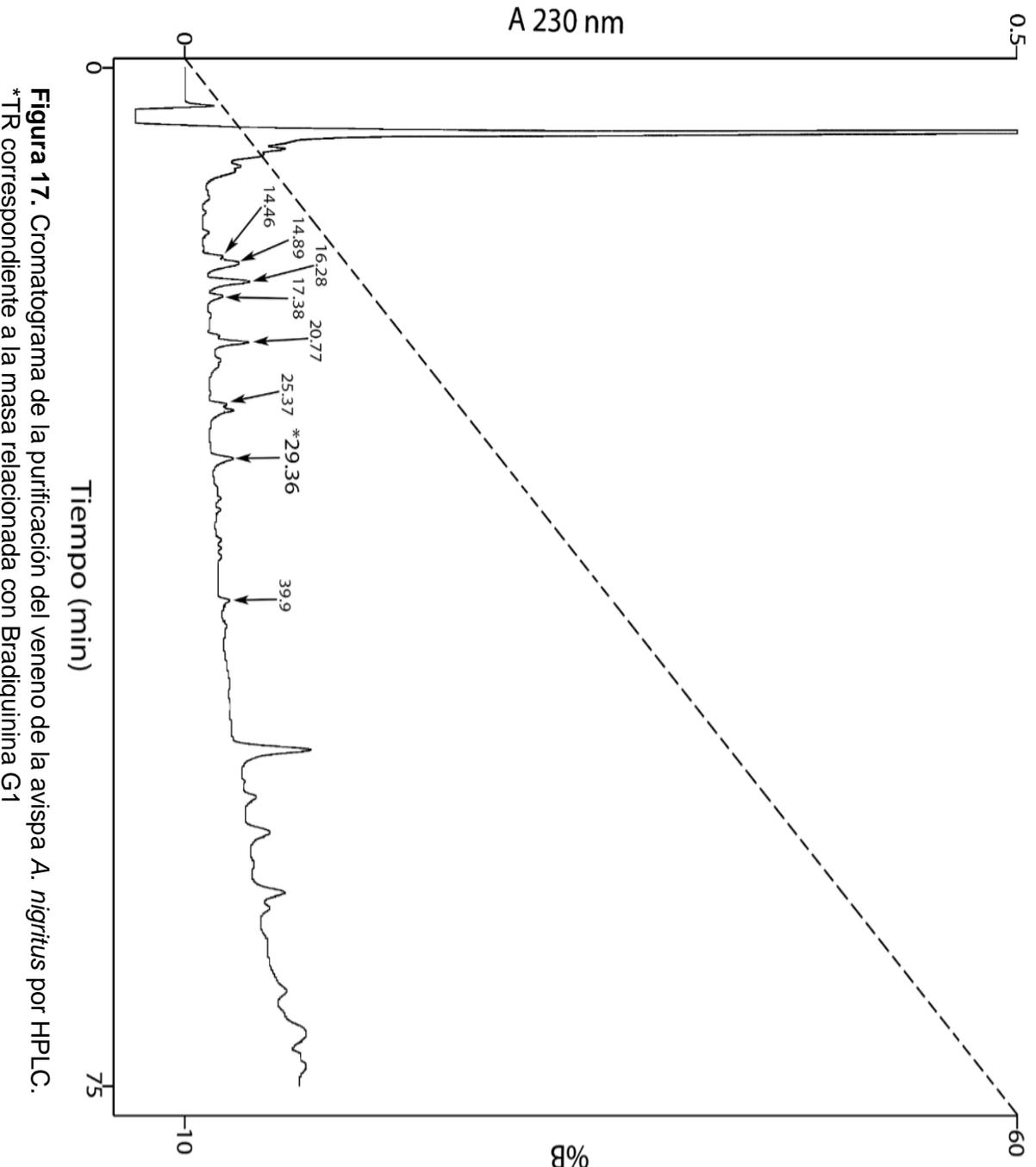
### 5.5.2. Perfiles cromatográficos

De la purificación realizada por HPLC del veneno de *A. nigrinus* se obtuvieron un total de 21 fracciones (Figura 17) de las cuales se eligieron los 11 picos intermedios del cromatograma, con tiempos de retención entre 14 a 40 minutos aproximadamente para analizar sus masas. El pico marcado con el tiempo de retención 29.36 señalado con un asterisco en la Figura 17 mostró una masa relacionada con Bradiquinina G1.

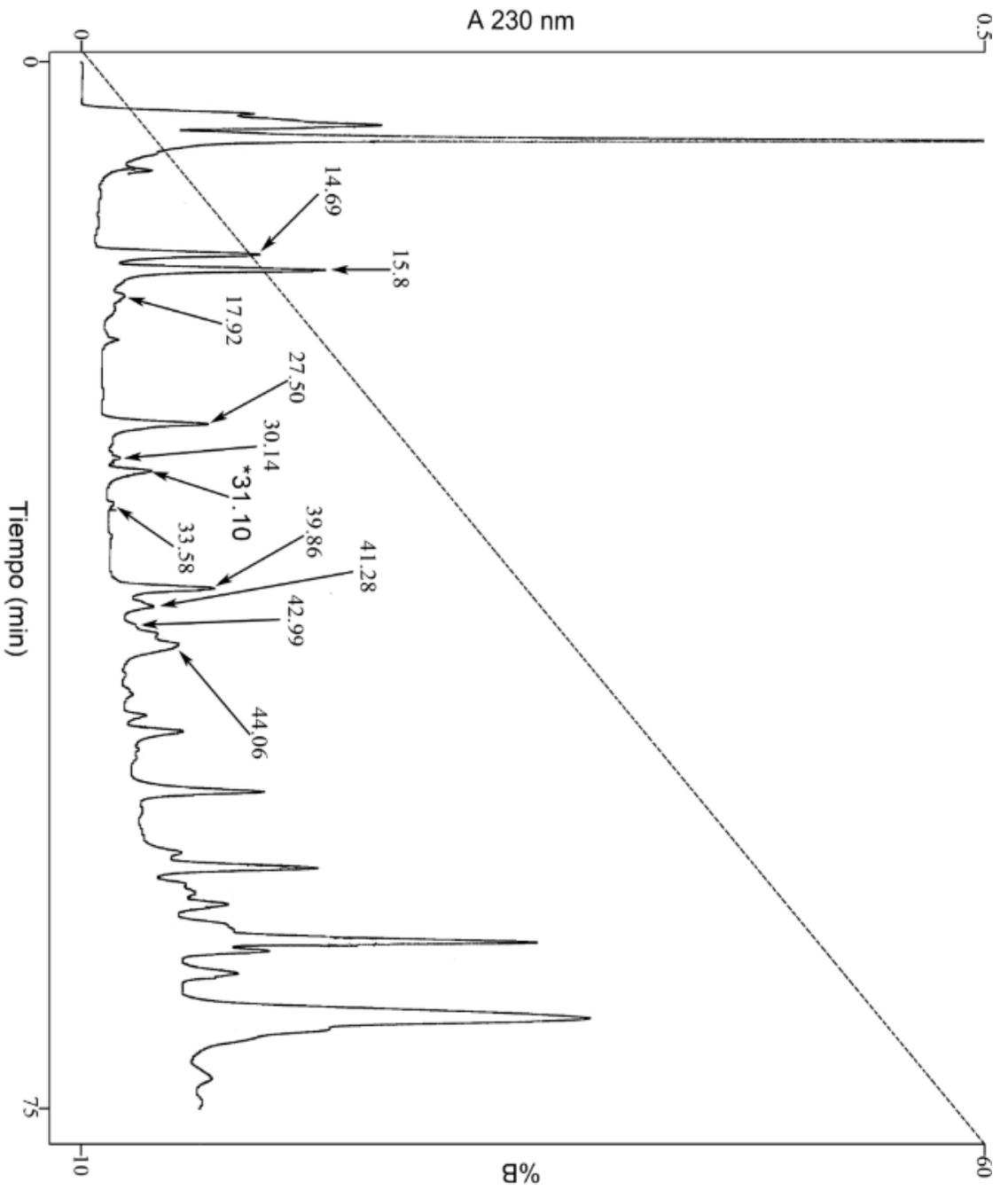
De la purificación por HPLC del veneno de *P. terminata* se obtuvieron cerca de 40 fracciones, pero solo las eluidas entre los tiempos de retención entre 14 y 44 minutos se usaron para determinar sus masas (20 picos; ver Figura 18). La fracción eluida en el tiempo de retención 31.10 se usó para determinar su secuencia de aminoácidos por degradación de Edman.

La purificación por HPLC del veneno de *P. mexicana* mostró cerca de 30 fracciones pero solo 16 se usaron para determinar su masa molecular (Figura 19). De las cuales la fracción eluida en el tiempo de retención 28.19 se usó para determinar su secuencia de aminoácidos por degradación de Edman. El veneno de *P. mexicana* analizado en

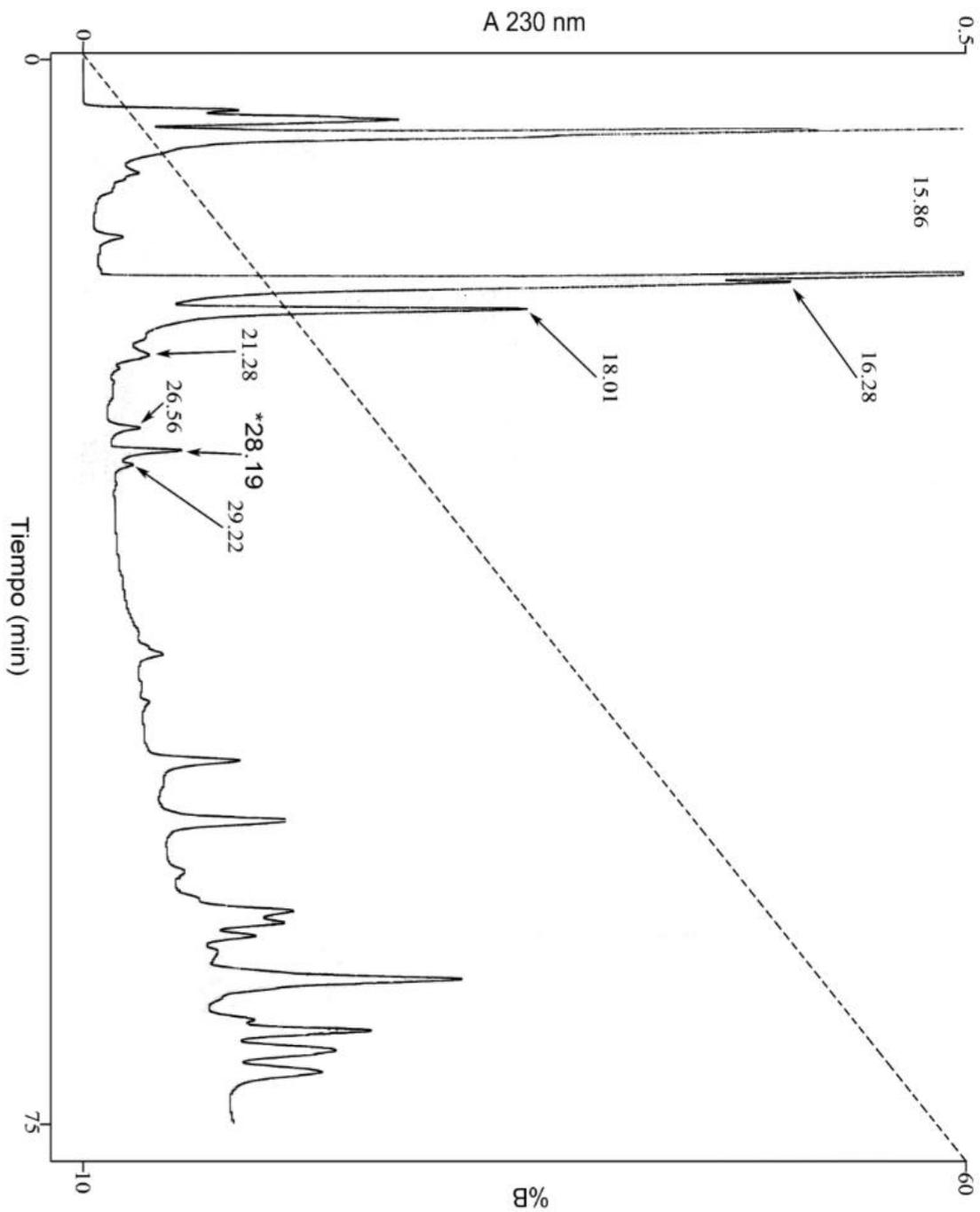
el mes de junio mostró cambios en el cromatograma debido a que la muestra fue filtrada (Figura 20) y probablemente varios de los componentes se quedaron pegados en el filtro.



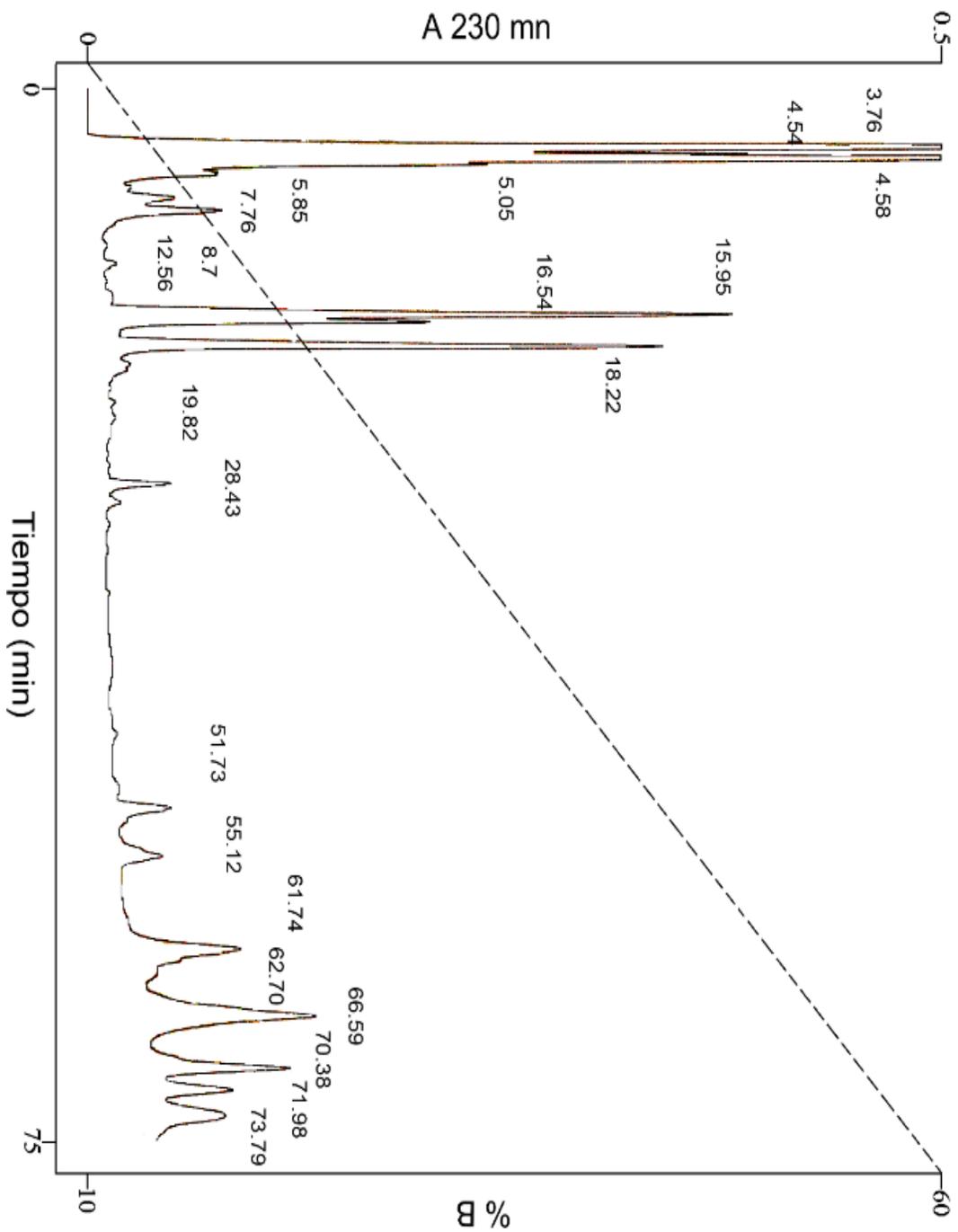
**Figura 17.** Cromatograma de la purificación del veneno de la avispa *A. nigritus* por HPLC.  
\*TR correspondiente a la masa relacionada con Bradiquinina G1



**Figura 18.** Cromatograma de la purificación del veneno de *P. terminata* por HPLC. \*TR secuenciada por degradación de Edman



**Figura 19.** Cromatograma de la primera purificación del veneno de *P. mexicana* por HPLC.  
 \*TR de fracción secuenciada con método de degradación de Edman



**Figura 20.** Cromatograma de la purificación del veneno de *P. mexicana* por HPLC previamente filtrado, muestra pérdida de fracciones y disminución de concentración de picos que se conservaron en comparación con la Figura 19.

### 5.5.3. Masas obtenidas

Se obtuvieron un total de 47 datos de masas de los cuales 11 pertenecen al veneno de *A. nigrinus*, 20 a *P. terminata* y 16 a *P. mexicana* (Cuadro 5). Como se puede observar en dicha tabla, existen algunas fracciones obtenidas por HPLC que presentan más de un resultado de masa, esto se puede deber a que el pico colectado no está puro y presenta más de un componente. Para lograr una mejor resolución de algunas de estas fracciones es necesario probar otras condiciones de separación o repurificar cada una de las fracciones que no están puras.

La comparación entre las masas reportadas en la literatura con las masas obtenidas no mostró similitudes con excepción de la fracción colectada en el TR 29.36 del veneno de la avispa *A. nigrinus* con un valor de masa de 1116.86, que fue comparada con la masa reportada para Bradiquinina G1 la cual es de 1117.2 (Prado *et al.*, 1966).

### 5.5.4. Secuenciación por degradación de Edman

Se obtuvieron cuatro secuencias del veneno de *P. mexicana* y una secuencia del veneno de *P. terminata*, resultado de las bandas transferidas a membrana de PVDF y de las purificaciones por HPLC (Cuadro 6). Las secuencias obtenidas de las bandas de la membrana de PVDF, no pudieron ser comparadas con las bases de datos por ser muy cortas. La fracción del TR. 31. 10 de *P. mexicana* resultó en una secuencia de 35 aa la cual fue comparada con las bases de datos UniProt y NCBI, al igual que la secuencia de la fracción del TR. 28.19 de *P. terminata* con 36 aa.

**Cuadro 5.** Masas obtenidas de los venenos de *A. nigrurus*, *P. terminata* y *P. mexicana*.

Especie	TR. (min)	masa
<i>A. nigrurus</i>	14.46	1042.25
	14.89	557, 521, 477
	16.28	1051.7
	17.38	1054.6
	20.77	899.64, 541.3
	25.37	1132.3
	29.36	<b>*1116.86</b>
	39.9	1234
<i>P. terminata</i>	14.69	1023.5
	15.8	648, 1023.5
	17.92	1023.5, 648
	21.28	1400
	27.5	4593.69
	30.14	4099.13, 4261.12
	31.1	4940.53
	33.58	3926.56, 4088.73
	39.86	4481.1, 4319.01
	41.28	9403.54, 9593.67
	42.99, 43.31	6704.53, 9521.09
	44.06	6705.54
	49.42	14000~
<i>P. mexicana</i>	15.86	648.4, 939.5
	16.28	648.3, 939.1
	18.01	537.25
	21.28	648.3, 939.5
	26.56	4386.6, 4548.5
	28.19	5041.05
	29.22	4019.63, 5040.92
	42.70, 42.91	4092.6, 4254.6, 4286.4, 4446.9

\* masa que coincide con Bradiquinina G1

**Cuadro 6.** Secuencias obtenidas por medio de la técnica de degradación de Edman de las tres especies de avispas

Especie	Muestra analizada	Secuencia de aa.
<i>P. mexicana</i>	Banda 70 Kda	VNEIF
	Banda 55 Kda	SANALVTFXVGMA
	Banda 25 Kda	VANAVGAFVCVM
	T.R. 31.10	KDEEYIHLPGKTCEDAPPCPNGR PCVMAAARCNIQ
<i>P. terminata</i>	T.R. 28.19	VEEYIHLPGKSCEEAPPCPDNRPC VMACARCNLQ

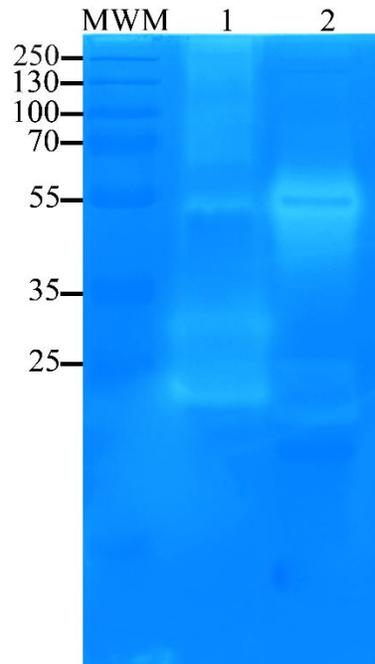
Se realizó una búsqueda con el programa BlastP en la base de datos de proteínas no redundantes para determinar si la secuencia del TR 31.10 de *P. mexicana* presentaba una identidad con alguna secuencia reportada, esta búsqueda mostró que presenta una identidad del 82 %, 94% de cobertura y un e-valor  $2e^{-11}$  con la proteína LOC112464087 (número de acceso ID XP\_024886650) de la hormiga *Termnothorax curvispinosus*. El péptido de la avispa *P. terminata* obtenido de la fracción con TR 28.19, mostró una identidad de 81%, 94% de cobertura y un e-valor  $2e^{-10}$  con la proteína hipotética WN55\_04000 (número de acceso ID KZC12462) de la abeja solitaria *Duforea novaeangliae*.

### 5.5.5. Ensayos de actividades enzimáticas

#### 5.5.5.1. Actividad Proteolítica

El zimograma del veneno de *P. mexicana* presentó actividad proteolítica del sustrato de gelatina, mostrando un barrido de actividad desde la banda de aproximadamente 250 KDa hasta la banda de aproximadamente 23 KDa con mayor intensidad en las bandas de 55, 31 y 23. El control positivo (veneno de *B. asper*), mostró actividad

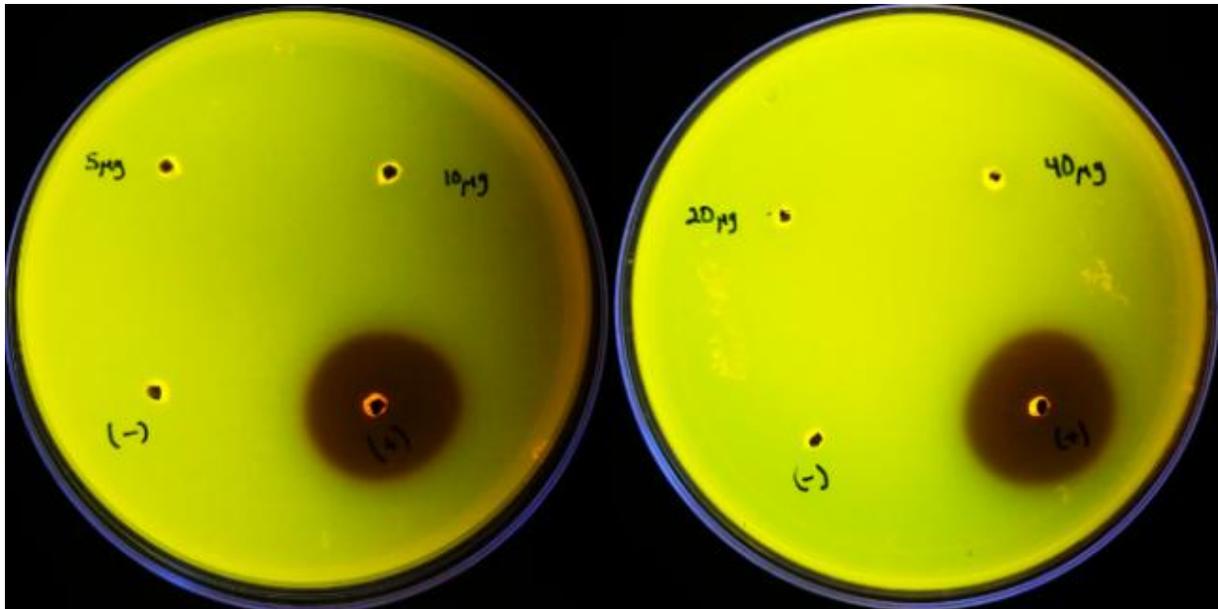
proteolítica alrededor de las bandas de, 25 y 55 KDa (Figura 21). El veneno de *P. mexicana* aparentemente contiene más compuestos encargados de realizar esta actividad que el veneno de nuestro control positivo.



**Figura 21.** Zimograma de gelatina en gel al 12%. Carril 1: veneno de *P. mexicana*; carril 2: veneno de *B. asper*

#### 5.5.5.2. Actividad Fosfolipasa A2

El veneno de *P. mexicana* no mostró tener actividad de fosfolipasas A2 como se ha reportado en otras especies de himenópteros parasitoides en ninguna de las concentraciones probadas en este ensayo (Figura 22). El control positivo muestra un halo en el que claramente se observa la hidrólisis del sustrato a base de yema de huevo (rico en fosfolípidos).



**Figura 22.** Ensayo para la detección de actividad de fosfolipasa en veneno de *P. mexicana* utilizando cuanto diferentes cantidades de veneno expresadas en  $\mu\text{g}$  de proteína (5, 10, 20 y 40). No se muestra actividad de fosfolipasas A2 en pozos con veneno de *P. mexicana* en ninguna de las concentraciones probadas, mientras que el control positivo si muestra actividad (veneno de *B. asper*).

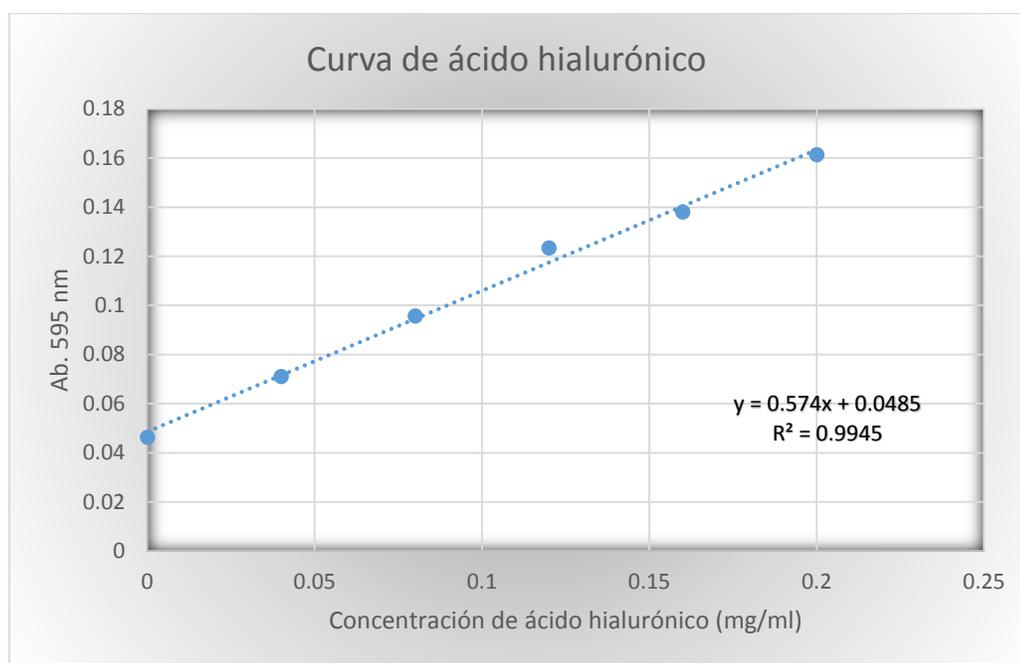
### 5.5.5.3. Hidrolisis de ácido hialurónico

Para determinar la actividad hialuronidasa en la muestra de veneno de *P. mexicana* fue necesario realizar una curva de calibración con diferentes concentraciones de ácido hialurónico y se leyó su absorbancia a 595nm (Cuadro 7). Tanto la concentración como el promedio de las absorbancias se graficaron para obtener la ecuación de la recta (Figura 23) y así determinar el porcentaje de ácido hialurónico que es capaz de hidrolizar los 40  $\mu\text{g}$  de veneno de *P. mexicana* utilizando el ensayo, el cual logro hidrolizar el 90.85 % de ácido hialurónico.

Cuadro 7. Absorbancias registradas (por triplicado) en la curva de ácido hialurónico para medición de actividad

Concentración mg/ml	Abs. 595 nm		
0	0.048	0.045	0.046
0.04	0.071	0.068	0.074
0.08	0.097	0.093	0.097
0.12	0.123	0.125	0.122
0.16	0.137	0.133	0.144
*0.2	0.156	0.169	0.159

\* Cantidad de ácido hialurónico considerado como 100 % a hidrolizar.



**Figura 23.** Gráfica de la curva de calibración de ácido hialurónico. Se muestra la ecuación de la recta usada para calcular el porcentaje de ácido hialurónico hidrolizado por el veneno de *P. mexicana*.

#### 5.5.5.4. Actividad antimicrobiana

El veneno de *P. mexicana* no mostró tener actividad antimicrobiana con una cantidad de 40 µg de acuerdo a las absorbancias registradas en el ensayo (Cuadro 8), en la cual podemos observar que el blanco y el control positivo se mantienen con la misma

absorbancia en las tres lecturas, mientras que el control negativo y el veneno de *P. mexicana* muestran proliferación de células bacterianas elevadas a cada lectura.

**Cuadro 8.** Registro de lecturas a 605 nm de la muestra de veneno de *P. mexicana* puesta a prueba contra la cepa ATCC-2932 de *S. aureus*.

Muestra	0 horas		4 horas		19 horas	
	x1	x2	x1	x2	x1	x2
<i>P. mexicana</i>	0.085	0.083	0.167	0.168	0.437	0.438
Control (+)	0.099	0.085	0.099	0.085	0.099	0.085
Control (-)	0.084	0.085	0.166	0.168	0.446	0.448
Blanco	0.081	0.079	0.081	0.079	0.081	0.079

## 6. DISCUSIÓN.

### 6.1. *Pepsis mexicana* en el Sureste mexicano.

No solo en la región sureste hay una escases de información referente a la presencia del género *Pepsis* (especie central de este trabajo), sino en todo el país. Aunque desde 1952 se menciona eventos de avistamiento o captura de ejemplares de *Pepsis mexicana* en Chihuahua y Morelos (Hurd Jr., 1952), no existe literatura específica dedicada a la presencia y distribución de la especie en el país. Aun cuando (Vardy, 2000) reporta un mapa con una amplia distribución de *P. mexicana* para México, no se ha reportado la presencia de esta especie en estudios faunísticos realizados sobre la familia Pompilidae ni el género *Pepsis*. Vanoye-Eligio, Meléndez-Ramírez, Ayala, Navarro, y Delfín-González, 2014 reportan la presencia de sólo una especie del género *Pepsis* en la Península de Yucatán: *P. thisbe*, misma especie que reportan un año después (Vanoye-Eligio *et al.*, 2015) para el estado de Yucatán. No existen más trabajos para la Península y ninguno para el estado de Campeche. De este modo la captura de especímenes de *Pepsis mexicana* y las georeferencias se convierten en datos importantes de presencia y distribución de la especie en el país. En este trabajo reportamos la incidencia de *P. mexicana* en flores de marañón (*Ananacardium occidentale*), *Waltheria indica*, huaxin (*Leucaena leucocephala*), y árboles de caoba (*Swietenia macrophylla*), ésta última preferida exclusivamente por machos de *P. mexicana*. Vardy, (2000) menciona que las avispas del género *Pepsis* se sienten especialmente atraídas por flores de especies de *Asclepias*, sin embargo ningún ejemplar fue visto cerca de estas flores a pesar de su abundante presencia en las zonas de colecta, por lo que podemos decir que tuvieron preferencia a las plantas mencionadas con anterioridad.

## 6.2. Captura de avispas

El avistamiento de individuos en los sitios visitados fue muy diverso. Pudimos notar que el comportamiento de las avispas de la familia Pompilidae varía entre las especies aunque tengan el mismo estilo de vida.

Teniendo en cuenta que no se cuenta con información específica para cada especie de avispa, se consultó la bibliografía de especies de la familia y del género para tomar de referencia los hábitos y horarios, lo cual nos indicó que estas avispas tienen hábitos crepusculares y nocturnos (De la Fuente, 2000). En el sitio de colecta en la reserva estatal de Balamkú, encontramos una gran cantidad de ejemplares en un horario aproximado de 12:00 a 14:00 horas, grupo en el cual se encontraban ejemplares de ambas subfamilias, sin embargo, de las 35 avispas atrapadas en ese sitio, solo tres fueron de la subfamilia Pepsinae. En cuanto al comportamiento, los ejemplares de la familia Pompilinae caminaban por el suelo y volaban cerca de él, mientras que los ejemplares de la familia Pepsinae parecían detenerse solo a descansar de su vuelo en las ramas de árboles.

En el sitio de colecta ubicado en los senderos de frutales de ColPos en el poblado de Sihochac, se observaron ejemplares de ambas familias caminando en la tierra, libando y en pleno vuelo. La mayoría de los ejemplares vistos fueron machos de la subfamilia Pepsinae, los cuales se encontraron ocultándose del sol de mediodía entre las ramas de árboles de caoba (*Swietenia macrophylla*). En las zonas de siembra y área mecanizada, destacó la presencia de avispas en los surcos de marañón, por lo que las colectas se centraron en esa área. Ambas subfamilias dieron a notar su gusto por el néctar de las flores de esta especie y el avistamiento fue mayor en un horario de las 18:00 a las 20:00 horas.

En el sitio de colecta ubicado en la ciudad de Campeche, se observaron ejemplares de ambas subfamilias predominando los ejemplares de la subfamilia Pepsinae libando en flores de *Waltheria indica* alrededor de las 12:00 horas. En el sitio de Calakmul, se

capturaron ejemplares de la familia Pepsinae en caminos y en la carretera que lleva a la zona arqueológica entre las 8:00 y 10:00 horas.

Con esta información podemos darnos cuenta de lo variado que son los hábitos y comportamientos de los miembros de la familia Pompilidae, por lo que no basta solo basarnos en lo que encontramos en la literatura, ya que aún existen muchos espacios por llenar en el vacío de información acerca de estas avispa. Sin embargo, estos datos son una aportación al conocimiento sobre estos individuos.

### **6.3. Identificación de avispa**

La familia Pompilidae es un grupo complicado de estudiar morfológicamente. Existen diversas publicaciones sobre taxonomía, sin embargo de las más de 500 especies de *Pepsis* descritas, la mayoría resultaron ser sinonimias, por lo que Vardy (2000), menciona que existen 133 especies dentro del género.

Además de las sinonimias, las especies de *Pepsis* suelen presentar variaciones principalmente de tamaño y colores. Tal fue el caso con la especie encontrada en este trabajo descrita como *P. terminata*, la cual se menciona en las claves que las alas son totalmente negras, pero una variación importante es el color de las alas ámbar con un borde oscuro, esto sucede en todas las *P. terminata* de México y América central. En el caso de *P. mexicana*, la variación presentada fue el largo del cuerpo.

*A. nigrinus* fue identificada con las claves de (Wasbauer y Kimsey, 1985) y las claves de (Evans, 1966). En las claves de Evans, la especie aparece como *A. relativus* la cual resultó sinónima de *A. nigrinus* (Day, 1977).

### **6.4. Métodos de extracción de veneno**

El primer método probado en este trabajo, fue pensando en poder recuperar el veneno directamente en un tubo de 1.5 ml, sin embargo esto no resultó como fue planeado, ya

que la superficie de Parafilm® que cubría el tubo fue demasiado grande tomando en cuenta la cantidad de veneno que se puede extraer a una avispa, el cual oscila en un rango que va desde 0.1 hasta 4 µl y este nunca quedo en la superficie del tubo, si no embarrado en el parafilm. Otro inconveniente que nos orilló a tomar la decisión de descartar este método, fue que la avispa al despertar del proceso de enfriamiento, movía repetidamente el abdomen y desgarraba el parafilm con el agujijón. Se reporta un método similar por (Nolasco *et al.*, 2018), en el cual sujetan con las pinzas a la avispa y acercar el agujijón al parafilm en el tubo, tal como hicimos en nuestras pruebas, a diferencia de que mencionan tomar a la avispa sin adormecerla de ninguna forma, lo cual de acuerdo al comportamiento observado en las avispas con las que trabajamos, a pesar de no hacer el intento por salir de sus recipientes contenedores y no reaccionar violentamente cuando se les ofrecía agua y alimento, no nos fue posible tomarlas con las pinzas sin antes estar inconscientes por el proceso de enfriamiento a -20°C. Esto nos indica que este método de extracción que dicho autor reporta, no es funcional con todas las especies de Pompilidae, e incluso tampoco con otras especies del género *Pepsis*, ya que expresan diversos comportamientos.

Por lo contrario, el método de extracción aspirando con la micropipeta, nos resultó exitoso con tres especies de dos subfamilias las cuales fueron también de tamaños diferentes. A pesar de que (Nolasco *et al.*, 2018), reporta un promedio de vida de cuatro meses en las avispas que no fueron sometidas a enfriamiento, nuestro promedio de vida de tres meses no se aleja demasiado de ese dato, además de tener la gran ventaja de que funciona con más de una especie de avispas.

## **6.5. Caracterización del veneno**

Según los patrones de bandeo observados en el gel de una dimensión por la técnica de SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes (gel de acrilamida al 12% y 16 %), los venenos de las tres avispas identificadas presentan un promedio de doce bandas, siendo la muestra de *P. mexicana* en la que se pueden apreciar una mayor cantidad de bandas en comparación con el veneno de la avispa *A. nigrinus*.

En los ensayos de actividad, a pesar de tener reportes sobre actividad hialuronidasa en himenópteros, no tenemos reportes de la presencia de esta enzima en avispa de la familia Pompilidae, por lo que este es el primer trabajo donde se reporta esta actividad.

En cuanto a las metaloproteinasas, el primer reporte en un himenóptero fue en la avispa parasitoide *Pimpla hypochondriaca*, en donde se describe la proteína rep1 de 40KDa, la cual es similar a la reprotolisina reportada para venenos de serpientes (Parkinson *et al.*, 2002) sin embargo aunque mencionan que la función de rep1 es evitar la encapsulación del huevo por parte del hospedero, no se realizaron ensayos para probar esta teoría. En el parasitoide *Eulophus pennicornis* se describen las proteínas EpMP1; EpMP2, EpMP3 de aproximadamente 46 KDa la cual intervienen en el desarrollo del hospedero retardando el cambio de instar, para así tener disponible el alimento por más tiempo (Price *et al.*, 2009). En el parasitoide *Microplitis mediator*, se reporta la metaloproteinasa VRF1, homóloga a la reprotolisina la cual interviene en la modulación de las cascadas de respuesta del sistema inmune de su hospedero para así evitar la encapsulación de sus huevos (Lin *et al.*, 2018). En el ensayo de actividad realizado con el veneno de *P. mexicana* la actividad se muestra a partir de la banda de aproximadamente 23 KDa hasta la banda de 250 KDa, por lo que se sugiere que cuenta con más de un compuesto con actividad metaloproteinasa, por lo que sería de gran importancia realizar la caracterización de las posibles proteínas con esta actividad para determinar su función.

En el caso de la actividad fosfolipasa A2 y la actividad antimicrobiana, no podemos descartar que el veneno de *P. mexicana* pueda tener estas actividades ya que como se mencionó anteriormente, el veneno usado para estos ensayos fue previamente filtrado, lo cual pudo causar pérdida de componentes activos, así como causo la pérdida de fracciones en el análisis por HPLC y mostro una menor concentración en las que sí estuvieron, esto a pesar de haberse cargado casi el doble de veneno comparado con el que se corrió en la primera cromatografía del veneno de *P. mexicana*. Sin embargo, la anoplina, la cual es un péptido antimicrobiano ya ha sido

reportado para *Anoplius samariensis* quien es miembro de la familia Pompilidae por lo que podríamos pensar que el veneno de *P. mexicana* tiene probabilidad de contener algún péptido antimicrobiano como la anoplina. Cabe resaltar que el paso de filtración con una membrana de polietilensulfona aparentemente afectó el análisis de los compuestos presentes en el veneno de las avispas estudiadas, sin embargo este paso se realizó como una medida para evitar la contaminación de las muestras con células de levaduras principalmente, las cuales ven favorecido su crecimiento en la miel fermentada que se usó como alimento para los especímenes. Sin embargo aunque en las especificaciones de los filtros menciona que es recomendable para esterilizar muestras proteicas sin retención de las mismas, específicamente en el caso de los venenos aquí estudiados aparentemente si hubo afinidad por algunos de sus componentes.

De las 47 masas obtenidas en total de los venenos de las tres especies de avispas, solo la masa correspondiente al TR. 29.36 de la avispa *A. nigrinus*, tuvo coincidencia con un componente ya descrito denominado Bradiquinina G1 (Prado *et al.*, 1966), con una ligera variación de 0.34 Da, por lo que las 46 masas restantes podrían ser componentes nuevos no descritos para ninguna especie de himenóptero ya que sus masas no coinciden con lo reportado en bases de datos de UniProt y EROP-Moscow.

Como se ha mencionado previamente el grupo de las Bradiquininas son péptidos neurotóxicos que actúan a nivel del sistema nervioso central de los insectos, en este caso de las arañas, bloqueando la transmisión sináptica de los receptores nicotínicos de acetilcolina, presentando a su vez un amplio potencial farmacológico.

En cuanto a la secuenciación de péptidos, las secuencias obtenidas a partir de las bandas transferidas a la membrana de PVDF, son muy cortas y no coincidieron con ningún péptido o proteína reportado, por lo que pensamos que podrían ser fragmentos de grandes proteínas, tomando en cuenta que las bandas tenían pesos aproximados de 25 a 70 KDa.

Al realizar la búsqueda por homología usando la base de datos de proteínas no redundantes de NCBI con el algoritmo BlastP, se pudieron identificar proteínas hipotéticas de la hormiga *Termnothorax curvispinosus* para la secuencia de *P. mexicana* y en cuanto a la secuencia de *P. terminata* hubo una identidad de arriba del 90 % con una proteína hipotética de la abeja solitaria *Duforea novaeangliae*. Sin embargo, no hay reportes funcionales de ninguna de las secuencias hasta el momento. Esta ausencia de similitud entre las masas previamente reportadas y las encontradas en este trabajo lejos de implicar un resultado negativo apunta a que existe una alta probabilidad de que los componentes de los venenos analizados tengan una amplia diversidad de biomoléculas no antes reportadas.

## 7. CONCLUSIONES

Se identificaron tres avispas de las que obtuvimos muestras de veneno. La identidad de las avispas corresponde a *Pepsis mexicana*, *Pepsis terminata* y *Anoplius nigrinus*.

Se estandarizó un método efectivo de extracción de veneno para especies de avispas de tamaño moderadamente pequeño (11mm) a muy grande (65mm), el cual nos sirvió para poder evaluar la composición del veneno de *P. mexicana*.

El veneno presentó un promedio de 12 bandas de proteínas de entre 25 a 250 KDa en el caso de *P. mexicana* y *P. terminata*. Para *A. nigrinus* se observaron al menos seis bandas de las cuales tres se encuentran en el rango de los 25 KDa y otras tres en el rango de 100 KDa. Se obtuvieron 21 fracciones del veneno con la técnica de HPLC de *A. nigrinus*, 31 fracciones de *P. terminata* y 28 fracciones *P. mexicana*, de los cuales se obtuvieron 11, 20 y 16 datos de masas respectivamente.

El veneno de *P. mexicana*, tiene compuestos similares a otras avispas, tales como enzimas con actividad hialuronidasa, las cuales son enzimas capaces de degradar ácido hialurónico; metaloproteinasas, que son proteasas dependientes de iones bivalentes; y se logró identificar una proteína con identidad a una proteína hipotética de la abeja solitaria *Dufourea novaeangliae*. Este veneno también mostró un contenido diferente que no se tenía caracterizado previo a este trabajo, como las masas obtenidas por espectrometría de masas.

Esta caracterización preliminar de la composición del fluido paralizante de distintas avispas solitarias, nos mostró que existe una gran necesidad de estudiar a un nivel funcional las proteínas y los péptidos preliminarmente descritos en este trabajo. Para lograr dicho análisis se propone a manera de perspectiva, primero afinar las técnicas analíticas empleadas en este trabajo (variaciones al método de separación por HPLC aquí reportado, espectrometría de masas de alta resolución, etc), y una vez lograda una mejor separación de los componentes continuar con los ensayos enzimáticos.

## 8. LITERATURA CITADA

- Asgari, S., 2006. Venom Proteins From Polydnavirus-Producing Endoparasitoids: Their Role in Host-Parasite Interactions.
- Asgari, S., Rivers, D.B., 2011. Venom Proteins from Endoparasitoid Wasps and Their Role in Host-Parasite Interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 56, 313–335. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120709-144849>
- Asgari, S., Zhang, G., Zareie, R., Schmidt, O., 2003. A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 1017–1024. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00116-4](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00116-4)
- Ayerbe, S., Guerrero-Vargas, J.A., Rivas-Pava, M. del P., 2003. Introducción a la toxinología. Importancia en la conservación de especies consideradas peligrosas por ser venenosas. *Manejo Fauna Silv. en Amaz. y Latinoamérica.*
- Badii, M.H., Abreu, J.L., 2006. Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *Int. J. Good Consciene* 1, 82–89. <https://doi.org/1870-557X>
- Baek, J.H., Lee, S.H., 2010a. Differential gene expression profiles in the venom gland/sac of *Eumenes pomiformis* (Hymenoptera: Eumenidae). *Toxicon* 55, 1147–1156. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.004>
- Baek, J.H., Lee, S.H., 2010b. Identification and characterization of venom proteins of two solitary wasps, *Eumenes pomiformis* and *Orancistrocerus drewseni*. *Toxicon* 56, 554–562. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.05.014>
- Baek, J.H., Lee, S.H., Kim, W.Y., Kim, M.G., 2016. An insulin-binding protein from the venom of a solitary wasp *Eumenes pomiformis* binds to apolipoprotein III in lepidopteran hemolymph. *Toxicon* 111, 62–64. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.12.019>
- Baek, J.H., Oh, J.H., Kim, Y.H., Lee, S.H., 2013. Comparative transcriptome analysis of the venom sac and gland of social wasp *Vespa tropica* and solitary wasp

- Rhynchium brunneum. J. Asia. Pac. Entomol. 16, 497–502.  
<https://doi.org/10.1016/j.aspen.2013.08.003>
- Baek, J.H., Woo, T.H., Kim, C.B., Park, J.H., Kim, H., Lee, S., Lee, S.H., 2009. Differential gene expression profiles in the venom gland/ sac of *orancistrocerus drewseni* (Hymenoptera: Eumenidae). Arch. Insect Biochem. Physiol. 71, 205–222. <https://doi.org/10.1002/arch.20316>
- Baptista-Saidemberg, N.B., Saidemberg, D.M., Ribeiro, R.A., Arcuri, H.A., Palma, M.S., Carneiro, E.M., 2012. Agelaia MP-I: A peptide isolated from the venom of the social wasp, *Agelaia pallipes pallipes*, enhances insulin secretion in mice pancreatic islets. Toxicon 60, 596–602. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.05.027>
- Bernal, J., 2007. (PDF) Biología, Ecología y Etología de Parasitoides.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Carballo, M., 2002. Manejo de insectos mediante parasitoides. Manejo Integr. Plagas y Agroecol. (Costa Rica) 66, 118–122.
- Copperi, S., Pompozzi, G., Barneche, J., Ferretti, N., 2011. Datos preliminares acerca de interacciones entre dos avispas pompílidas y tarántulas en el sur de buenos aires, argentina. BioScriba 4, 13–20.
- Corro, P.E., Cambra, R.A., 2011. Diversidad De Avispas (Hymenoptera: Pompilidae) Cazadoras De Arañas Del Parque Nacional Darién, República De Panamá. Tecnociencia 13, 77–90.
- Crockett, C.D., Lucky, A., Liburd, O.E., Kester, K.M., Kester, K., 2017. A Parasitoid Wasp *Cotesia congregata* (Say) (Insecta: Hymenoptera: Braconidae) 1 1–5.
- Day, M.C., 1977. Notes on some Pompilidae (Hymenoptera) of incorrectly reported type–locality. Entomol. Mon. Mag. 112, 71–74.
- De Graaf, D.C., Aerts, M., Brunain, M., Desjardins, C.A., Jacobs, F.J., Werren, J.H.,

- Devreese, B., 2010. Insights into the venom composition of the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis* from bioinformatic and proteomic studies. *Insect Mol. Biol.* 19, 11–26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00914.x>
- De Oliveira, L., Cunha, A.O.S., Mortari, M.R., Pizzo, A.B., Miranda, A., Coimbra, N.C., Dos Santos, W.F., 2005. Effects of microinjections of neurotoxin AvTx8, isolated from the social wasp *Agelaia vicina* (Hymenoptera, Vespidae) venom, on GABAergic nigrotectal pathways. *Brain Res.* 1031, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.10.027>
- De la Fuente Coello, D., 2000. Los pompilidos: un exitoso ejemplo de predoparasitismo. *Rev. Iber. Arachnol.* 1, 73–76.
- Dias Batista, N., Monson De Souza, B., Gomes, P.C., Brigatte, P., Palma, M.S., 2015. Peptidome profiling of venom from the social wasp *Polybia paulista*. *Toxicon* 107, 290–303. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.08.013>
- Dohtsu, K., Okumura, K., Hagiwara, K., Palma, M.S., Nakajima, T., 1993. Isolation and sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectarina sylveirae* (hymenoptera-vespidae). *Nat. Toxins* 1, 271–276. <https://doi.org/10.1002/nt.2620010503>
- Evans, H.E., 1966. A Revision of the Mexican and Central American Spider Wasps of the Subfamily Pompilinae (Hymenoptera: Pompilidae). *Mem. Am. Entomol. Soc.* 20, 1–442.
- Fernández, F., 2006. Familia Pompilidae, in: *Introducción a Los Himenoptera de La Región Neotropical*. <https://doi.org/10.13140/2.1.4412.0646>
- Fischbein, D., 2012. Introducción a la teoría del control biológico de plagas. *Cuad. 15 INTA (manejo Integr. plagas For.* 15, 277–284.
- Fry, B.G., Roelants, K., Champagne, D.E., Scheib, H., Tyndall, J.D.A., King, F.G., Nevalainen, T.J., Norman, J.A., Lewis, R.J., Norton, R.S., Renjifo, C., Rodríguez de la Vega, R.C., 2009. The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 483–511.

<https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164356>

Gaona García, G., Ruíz Cancino, E., Myartseva, S.N., Trjapitzin, V.A., Coronado Blanco, J.M., Mora Olivo, A., Cancino, E.R., Myartseva, S.N., Trjapitzin, V.A., María, J., Blanco, C., Olivo, A.M., 2006. Himenópteros parasitoides (Chalcidoidea) de Coccoidea (Homoptera) en Cd. Victoria, Tamaulipas, México. *Acta zoológica Mex.* 22, 9–16.

Goulet, H., Huber, J.T., 1993. *Hymenoptera of the world: An identification guide to families*, Agricultur. ed. 1993, Ottawa, Ontario.

Guerrero-Vargas, Jimmy Alexander; Liberio, Michelle; S. Castro, M., 2008. Aplicación biotecnológica de la toxinología; la importancia del veneno de escorpiones y la secreción cutánea de anuros. *Innovación y Cienc.*

Gutierrez-Ramírez, A., Robles Bermudez, A., Santillan-Ortega, C., Ortíz Catón, M., Cambrero-Campos, O.P., 2013. Control biológico como herramienta sustentable en el manejo de plagas y su uso en el estado de Nayarit, México. *Bio ciencias* 52, 335–389. <https://doi.org/10.1201/9781315119205>

Habermann, E., Hardt, K.L., 1972. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Anal. Biochem.* 50, 163–173. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90495-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90495-2)

Hajek, A.E., 2004. *Natural Enemies. An introduction to biological control*, Cambridge. ed. New York.

Heraty, J., 2009. Parasitoid and insect pest management. *Insect Biodivers. Sci. Soc.* 445–462.

Hisada, M., Satake, H., Masuda, K., Aoyama, M., Murata, K., Shinada, T., Iwashita, T., Ohfuné, Y., Nakajima, T., 2005. Molecular components and toxicity of the venom of the solitary wasp, *Anoplius samariensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 1048–1054. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.087>

Hrčěk, J., Godfray, H.C.J., 2015. What do molecular methods bring to host-parasitoid food webs? *Trends Parasitol.* 31, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.10.008>

- Hurd Jr., P.D., 1952. Revision of the nearctic species of the pompilidae genus pepsis (Hymenoptera, Pompilidae). Bull. Am. museum Nat. histpry 98.
- Iacovone, A., French, A.S., Tellier, F., Cusumano, A., Clément, G., Gaertner, C., Conti, E., Salerno, G., Marion-Poll, F., 2016. The role of contact chemoreception in the host location process of an egg parasitoid. J. Insect Physiol. 91–92, 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.07.001>
- Johnson, M.W., 2000. Nature and Scope of Biological Control. Biol. Control Pests, ENTO 675, 1–5.
- Justo Jacomini, D.L., Campos Pereira, F.D., Aparecido dos Santos Pinto, J.R., dos Santos, L.D., da Silva Neto, A.J., Giratto, D.T., Palma, M.S., de Lima Zollner, R., Brochetto Braga, M.R., 2013. Hyaluronidase from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae): Cloning, structural modeling, purification, and immunological analysis. Toxicon 64, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.12.019>
- Kalyanasundaram, M., Kamala, I.M., 2016. Parasitoids, in: Omkar (Ed.), Ecofriendly Pest Management for Food Security. pp. 109–138. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803265-7.00004-X>
- Konno, K., Hisada, M., Itagaki, Y., Naoki, H., Kawai, N., Miwa, A., Yasuhara, T., Takayama, H., 1998. Isolation and structure of pompilidotoxins, novel peptide neurotoxins in solitary wasp venoms. Biochem. Biophys. Res. Commun. 250, 612–616. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9299>
- Konno, K., Hisada, M., Naoki, H., Itagaki, Y., Fontana, R., Rangel, M., Oliveira, J.S., Cabrera, M.P. dos S., Neto, J.R., Hide, I., Nakata, Y., Yasuhara, T., Nakajima, T., 2006. Eumenitin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*. Peptides 27, 2624–2631. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.04.013>
- Konno, K., Hisada, M., Naoki, H., Itagaki, Y., Kawai, N., Miwa, A., Yasuhara, T., Morimoto, Y., Nakata, Y., 2000. Structure and biological activities of eumenine mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of

- the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). *Toxicon* 38, 1505–1515. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00083-0](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00083-0)
- Konno, K., Hisada, M., Naoki, H., Itagaki, Y., Yasuhara, T., Juliano, M.A., Juliano, L., Palma, M.S., Yamane, T., Nakajima, T., 2001a. Isolation and sequence determination of peptides in the venom of the spider wasp (*Cyphononyx dorsalis*) guided by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Toxicon* 39, 1257–1260. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00262-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00262-2)
- Konno, K., Palma, M.S., Hitara, I.Y., Juliano, M.A., Juliano, L., Yasuhara, T., 2001b. Identification of bradykinins in solitary wasp venoms. *Toxicon* 40, 309–312. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00230-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00230-6)
- Konno, K., Rangel, M., Oliveira, J.S., dos Santos Cabrera, M.P., Fontana, R., Hirata, I.Y., Hide, I., Nakata, Y., Mori, K., Kawano, M., Fuchino, H., Sekita, S., Neto, J.R., 2007. Decoralin, a novel linear cationic  $\alpha$ -helical peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Oreumenes decoratus*. *Peptides* 28, 2320–2327. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.09.017>
- LaSalle, J., Gauld, I.D., 1993. Hymenoptera: their diversity and their impact on the diversity of other organisms, in: LaSalle, J., Gauld, I.D. (Eds.), *Hymenoptera and Biodiversity*. CABI, United Kingdom, pp. 1–26.
- Libersat, F., 2003. Wasp uses venom cocktail to manipulate the behavior of its cockroach prey. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 189, 497–508. <https://doi.org/10.1007/s00359-003-0432-0>
- Lin, C.H., Tzen, J.T.C., Shyu, C.L., Yang, M.J., Tu, W.C., 2011. Structural and biological characterization of mastoparans in the venom of *Vespa* species in Taiwan. *Peptides* 32, 2027–2036. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.08.015>
- Lin, Z., Cheng, Y., Wang, R.-J., Du, J., Volovych, O., Li, J.-C., Hu, Y., Lu, Z.-Y., Lu, Z., Zou, Z., 2018. A Metalloprotease Homolog Venom Protein From a Parasitoid Wasp Suppresses the Toll Pathway in Host Hemocytes. *Front. Immunol.* 9, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02301>

- Manzoor, A., UIAbdin, Z., Webb, B.A., Arif, M.J., Jamil, A., 2016. De novo sequencing and transcriptome analysis of female venom glands of ectoparasitoid *Bracon hebetor* (Say.) (Hymenoptera: Braconidae). *Comp. Biochem. Physiol. - Part D Genomics Proteomics* 20, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2016.08.002>
- Martinson, E.O., Wheeler, D., Wright, J., Mrinalini, Siebert, A.L., Werren, J.H., 2014. *Nasonia vitripennis* venom causes targeted gene expression changes in its fly host. *Mol. Ecol.* 23, 5918–5930. <https://doi.org/10.1111/mec.12967>
- Mason, W.R.M., Huber, J.T., 1993. Order Hymenoptera, in: Goulet, H., Huber, J.T. (Eds.), *Hymenoptera of the World: A Identification Guide to Families*. Agriculture Canada, Canada, pp. 4–12.
- Mendes, M.A., De Souza, B.M., Palma, M.S., 2005. Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). *Toxicon* 45, 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.09.015>
- Mendes, M.A., Palma, M.S., 2006. Two new bradykinin-related peptides from the venom of the social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). *Peptides* 27, 2632–2639. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.05.018>
- Mitroiu, M.-D., Noyes, J., Cetkovic, A., Nonveiller, G., Radchenko, A., Polaszek, A., Ronquist, F., Forshage, M., Pagliano, G., Gusenleitner, J., Bartalucci, M., Olmi, M., Fusu, L., Madl, M., Johnson, N., Jansta, P., Wahis, R., Soon, V., Rosa, P., Osten, T., Barbier, Y., de Jong, Y., 2015. Fauna Europaea: Hymenoptera – Apocrita (excl. Ichneumonoidea). *Biodivers. Data J.* 3, e4186. <https://doi.org/10.3897/BDJ.3.e4186>
- Moreau, S.J.M., Asgari, S., 2015. Venom proteins from parasitoid wasps and their biological functions. *Toxins (Basel)*. 7, 2385–2412. <https://doi.org/10.3390/toxins7072385>
- Morgenstern, D., King, G.F., 2013. The venom optimization hypothesis revisited. *Toxicon* 63, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.11.022>

- Mrinalini, Siebert, A.L., Wright, J., Martinson, E., Wheeler, D., Werren, J.H., 2015. Parasitoid venom induces metabolic cascades in fly hosts. *Metabolomics* 11, 350–366. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0697-z>
- Murata, K., Shinada, T., Ohfune, Y., Hisada, M., Yasuda, A., Naoki, H., Nakajima, T., 2009. Novel mastoparan and protonectin analogs isolated from a solitary wasp, *Orancistrocerus drewseni drewseni*. *Amino Acids* 37, 389–394. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0166-y>
- Nakajima, T., 1986. Pharmacological chemistry of Vespid venoms, in: *Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological , and Behavioural Aspects*. pp. 309–329. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-554770-3.50010-3>
- Nicholls-Estrada, C., 2008. Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico.
- Nieves-Aldrey, J.L., Sharkey, M., 2012. Himenópteros, in: Vargas-Gómez, P., Zardoya, R. (Eds.), *El Árbol de La Vida: Sistemática y Evolución de Los Seres Vivos*. Madrid, pp. 323–333.
- Nolasco, M., Biondi, I., Pimenta, D.C., Branco, A., 2018. Extraction and preliminary chemical characterization of the venom of the spider wasp *Pepsis decorata* (Hymenoptera: Pompilidae). *Toxicon* 150, 74–76. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.04.023>
- Palma, M.S., 2006. Insect Venom Peptides. *Handb. Biol. Act. Pept.* 389–396. <https://doi.org/10.1016/B978-012369442-3/50059-3>
- Parkinson, N., Conyers, C., Smith, I., 2002. A venom protein from the endoparasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* is similar to snake venom reprotolysin-type metalloproteases. *J. Invertebr. Pathol.* 79, 129–131. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(02\)00033-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(02)00033-2)
- Parkinson, N., Smith, I., Weaver, R., Edwards, J.P., 2001. A new form of arthropod phenoloxidase is abundant in venom of the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 57–63. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00105-3](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00105-3)

- Picolo, G., Hisada, M., Moura, A.B., Machado, M.F.M., Sciani, J.M., Conceição, I.M., Melo, R.L., Oliveira, V., Lima-Landman, M.T.R., Cury, Y., Konno, K., Hayashi, M.A.F., 2010. Bradykinin-related peptides in the venom of the solitary wasp *Cyphononyx fulvognathus*. *Biochem. Pharmacol.* 79, 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.08.020>
- Piek, T., 2000. Wasp Kinins and Kinin analogues, in: *Animal Toxins*. p. 376.
- Piek, T., Hue, B., Mantel, P., Nakajima, T., Pelhate, M., Yasuhara, T., 1990. Threonine 6-bradykinin in the venom of the wasp *Colpa interrupta* (F.) Presynaptically blocks nicotinic synaptic transmission in the insect CNS. *Comp. Biochem. Physiol.* 96C, 157–162.
- Piek, T., Spanjer, W., 1986. Chemistry and pharmacology of solitary wasp venoms. Tom Piek, in: *Venoms of the Hymenoptera*. p. 570.
- Pizzo, A.B., Belebony, R.O., Fontana, A.C.K., Ribeiro, A.M., Miranda, A., Coutinho-Netto, J., dos Santos, W.F., 2004. Characterization of the actions of AvTx7 isolated from *Agelaia vicina* (hymenoptera: Vespidae) wasp venom on synaptosomal glutamate uptake and release. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 18, 61–68. <https://doi.org/10.1002/jbt.20014>
- Prado, J.L., Tamura, Z., Furano, E., Pisano, J.J., Udenfriend, S., 1966. Characterization of Kinins in Wasp Venom, in: *Hypotensive Peptides*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 93–104. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-94965-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-642-94965-4_11)
- Price, D.R.G., Bell, H.A., Hinchliffe, G., Fitches, E., Weaver, R., Gatehouse, J.A., 2009. A venom metalloproteinase from the parasitic wasp *Eulophus pennicornis* is toxic towards its host, tomato moth (*Lacanobia oleraceae*). *Insect Mol. Biol.* 18, 195–202. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00864.x>
- Ríos-Casanova, L., 2011. ¿Que son los Parasitoides? *Ciencia* 20–25.
- Rodríguez, A., Guillen, C., Uva, V., Segura, R., Laprade, S., Sandoval, J., 2010. Aspectos a Considerar Sobre El Control Biológico. *Corbana* 2–3.

<https://doi.org/10.1088/0953-4075/49/24/245204>

Ruiz Cancino, E., Kasparyan, D.R., Coronado Blanco, J.M., Myartseva, S.N., Trjapitzin, V., A., Hernández Aguilar, S.G., García Jiménez, J., 2010. Hymenopterans in “El Cielo” Reserve, Tamaulipas, Mexico. *Dugesiana* 17, 53–71.

Schmidt, J.O., 2004. Venom and the Good Life in Tarantula Hawks (Hymenoptera: Pompilidae): How to Eat, Not be Eaten, and Live Long. *J. Kansas Entomol. Soc.* 77, 402–413. <https://doi.org/10.2317/E-39.1>

Souza, B.M., Mendes, M.A., Santos, L.D., Marques, M.R., César, L.M.M., Almeida, R.N.A., Pagnocca, F.C., Konno, K., Palma, M.S., 2005. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*, *Peptides*. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.04.026>

Townes, H., 1957. Nearctic wasps of the subfamilies Pepsinae and Ceropalinae. *United States Natl. Museum Bull.* 209, 1–272.

Vanoye-Eligio, M., Meléndez-Ramírez, V., Ayala, R., Navarro-Alberto, J., Delfín-González, H., 2015. Avispas depredadoras de áreas naturales protegidas del estado de Yucatán, México. *Rev. Mex. Biodivers.* 86, 989–997. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.04.037>

Vanoye-Eligio, M., Meléndez-Ramírez, V., Ayala, R., Navarro, J., Delfín-González, H., 2014. Predatory Wasps (Hymenoptera) of the Yucatan Peninsula, in: *Southwestern Entomologist*. pp. 635–646. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3958/059.039.0322>

Vardy, C.R., 2002. The New World tarantula-hawk wasp genus *Pepsis* Fabricius (Hymenoptera : Pompilidae ). Part 2 . The *P. grossa*- to *P. deurata*-groups, *World*.

Vardy, C.R., 2000. The New World tarantula-hawk wasp genus *Pepsis* Fabricius (Hymenoptera : Pompilidae ). Part 1 . Introduction and the *P. rubra* species-group. *Zool. Verh. Leiden* 332.

Vargas Flores, T.I., Rojas Coca, K.J., 2014. Venenos vegetales y animales. *Rev. Actual. clínica* 43, 2251–2255.

- Waage, J.K., Hassell, M.P., 1982. Parasitoids as biological control agents - a fundamental approach. *Parasitology* 241–268.
- Waichert, C., Rodriguez, J., Wasbauer, M.S., von Dohlen, C.D., Pitts, J.P., 2015. Molecular phylogeny and systematics of spider wasps (Hymenoptera: Pompilidae): Redefining subfamily boundaries and the origin of the family. *Zool. J. Linn. Soc.* 175, 271–287. <https://doi.org/10.1111/zoj.12272>
- Wasbauer, M.S., Kimsey, L.S., 1985. California Spider Wasps of the Subfamily Pompilinae.
- Wu, M. li, Ye, G. yin, Zhu, J. ying, Chen, X. xin, Hu, C., 2008. Isolation and characterization of an immunosuppressive protein from venom of the pupa-specific endoparasitoid *Pteromalus puparum*. *J. Invertebr. Pathol.* 99, 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.07.005>
- Yamamoto, T., Arimoto, H., Kinumi, T., Oba, Y., Uemura, D., 2007. Identification of proteins from venom of the paralytic spider wasp, *Cyphononyx dorsalis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.12.001>
- Yoon, K.A., Kim, K., Nguyen, P., Seo, J.B., Park, Y.H., Kim, K.G., Seo, H.Y., Koh, Y.H., Lee, S.H., 2015. Comparative functional venomomics of social hornets *Vespa crabro* and *Vespa analis*. *J. Asia. Pac. Entomol.* 18, 815–823. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2015.10.005>

## 9. ANEXOS

### Identificación de avispas

Las estructuras utilizadas para separar a las avispas en las dos Subfamilias fueron: la forma de las espinas al final de las tibias, las cuales para Pepsinae se presentaron cuatro espinas del mismo tamaño y una distribución simétrica, para Pompilinae las espinas se observaron de distintos tamaños y una distribución asimétrica (Figura 6C); la parte frontal de la tibia, en Pepsinae presenta una fila de espinas gruesas en forma de sierra, mientras que la tibia de Pompilinae presenta cerdas delgadas distribuidas en toda la superficie de la tibia (Figura 6B); las cerdas en el tarso apical, en Pepsinae se observaron dos líneas laterales, mientras que en Pompilinae se mostraron acomodadas en una línea central (Figura 6D); la vena radial en la celda marginal de las alas, en Pepsinae forma una curva que prácticamente no toca la costa, en Pompilinae se encuentra formando un pico angulado cuando llega a la costa (Figura 6A). Estas estructuras se encuentran señaladas en la Figura 6.

### Determinación de especies.

#### *Anoplius (Arachnoproctonus) nigritus*

Longitud 11-21 mm; Cabeza alrededor de 1.10 -1.15 X (veces) tan ancho como alto; clípeo 2.6-3.0 X tan ancho como alto, su margen apical ligeramente cóncavo; frente moderadamente ancha; distancia interocular media 0.54-0.64 X de la distancia transfacial; distancia interocular superior (distancia mínima entre los ojos en su parte superior) 0.82-0.95 X de la distancia interocular menor (distancia mínima entre los ojos cerca de sus fondos); segmento antenal tres, igual a de 0.65 a 0.95 X de la distancia interocular superior. Dorso del tórax escasamente peludo; propodeo con una cantidad considerable de cerdas erectas; especialmente a los lados. El margen posterior del pronoto varía desde arqueado hasta un ángulo amplio; propodeo con un declive oblicuo bien definido. Ala frontal: celda submarginal 3 se estrecha arriba por al menos dos tercios de su ancho en la parte inferior, a menudo subtriangular.

### ***Pepsis terminata***

Longitud 17-30 (40) mm; cuerpo y piernas negras con brillo azul-verde o azul-violeta. Alas ámbar, siempre con al menos un rastro de un borde negro que termina a una distancia variable del vértice, que es siempre blanco; celda submarginal 3 más corta de lo normal y con un ángulo postero-distal redondeado. Tergo 1 inflamado (acampanado). Extensión lateral de la ranura del esternón 2 vestigial o ausente. Tibia trasera con espolón interno que llega a 0.25-0.35 de la longitud del basitarso (igual al segmento tarsal 3 o ligeramente más corto), y 1.2-1.3 veces más largo que el espolón externo.

**Variación:** En otras partes del mundo *P. terminata* presenta alas de color negro, en México siempre tiene alas de color ámbar con borde oscuro, lo cual la puede confundir con otras especies de alas ámbar (Vardy 2002); básalmente las alas también presentan coloración negra. Las características del tergo 1 y esternón 2 son indispensables para la identificación.

### ***Pepsis mexicana***

Longitud 46 mm; cuerpo y patas negras con brillo azul-verde-violeta. Antenas negras. Alas negras con reflejos azul-violetas y usualmente un borde apical hialino y estrecho (a menudo más ancho en las alas posteriores que en las anteriores). El surco del metapostnoto suele ser muy amplio y profundo. Surco medio del propodeo generalmente fuerte.